

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS-UFMG
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

**Resposta imune humoral e celular de crianças e adolescentes com baixa carga
parasitária na infecção por *Schistosoma mansoni***

Vanessa Normandio de Castro

Belo Horizonte

2021

Vanessa Normandio de Castro

Resposta imune humoral e celular de crianças e adolescentes com baixa carga parasitária na infecção por *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do título de Doutora em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientador: Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

Coorientadora: Prof^{ca}. Dr^a. Lilian Lacerda Bueno

Belo Horizonte

2021

- 043 Castro, Vanessa Normandio de.
Resposta imune humoral e celular de crianças e adolescentes com baixa carga parasitária na infecção por *Schistosoma mansoni* [manuscrito] / Vanessa Normandio de Castro. - 2021.
159 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientador: Prof. Dr. Stefan Michael Geiger. Coorientadora: Profa. Dra. Lilian Lacerda Bueno.
- Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.
1. Parasitologia. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Carga Parasitária. 4. Linfócitos T CD4-Positivos. 5. Interleucina-9. I. Geiger, Stefan Michael. II. Bueno, Lilian Lacerda. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.
- CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

**“RESPOSTA IMUNE HUMORAL E CELULAR DE CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM BAIXA CARGA
PARASITÁRIA NA INFECÇÃO POR
SCHISTOSOMA MANSONI“**

VANESSA NORMANDIO DE CASTRO

Tese apresentada no Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia, como pré-requisito para obtenção do Título de Doutor em Ciências - área de concentração Imunoparasitologia, Biologia Celular e Molecular de Parasitos.

Orientador: Dr. Stefan Michael Geiger

Co-orientadora: Dra. Lílian Lacerda Bueno

Data da defesa: **17/06/2021**

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Stefan Michael Geiger - Orientador (UFMG)

Dr^a. Lílian Lacerda Bueno - Coorientadora (UFMG)

Dr^a. Andrea Teixeira (IRR/FIOCRUZ - MG)

Dr^a. Soraya Torres Gaze (IRR/FIOCRUZ)

Dr. Thiago Almeida Pereira (Universidade de Stanford, California, EU)

Dr^a. Élide Mara Leite Rabelo (UFMG)

Belo Horizonte, 26 de Novembro de 2021

Profa. Héliida Monteiro de Andrade
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Parasitologia – ICB/UFMG



Documento assinado eletronicamente por **Helida Monteiro de Andrade, Coordenador(a)**, em 26/11/2021, às 15:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1108026** e o código CRC **9104FF24**.

O presente trabalho faz parte de um projeto maior intitulado “Otimização da estratégia para diagnosticar e controlar a esquistossomose intestinal em áreas de baixa e moderada endemicidade no Brasil”, financiado pela FAPEMIG e British Medical Council (CONFAP/MRC, Fundo Newton Inglaterra, 2016-2019), sendo coordenado no Brasil pelo Prof. Ricardo Toshio Fujiwara.

O doutorado foi desenvolvido no Laboratório de Helmintoses Intestinais e Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do ICB-UFMG do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, sob a orientação do Professor Dr. Stefan Michael Geiger e coorientação da Professora Dra. Lilian Lacerda Bueno.

Colaboradores:

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

MSc. Thaís Silva Eloi

Dra. Luisa Mourão Dias Magalhães

Dra. Michelle Rezende

Agências financiadoras:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES
- CONFAP/ Fundação Newton (Medical Research Council, Inglaterra)
 - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG

*“O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, mas sim a ilusão de
conhecimento”*
STEPHEN HAWKING

*Dedico esse trabalho
à todos os indivíduos que sofrem
com Doenças Negligenciadas.
Aos macambúzios do Brasil!*

Agradecimentos

Primeiramente, quero agradecer imensamente ao Manoel Augusto Pirajá da Silva, naturalista, médico e pesquisador brasileiro, o irrefutável descobridor do *Schistosoma mansoni*, por nos proporcionar o estudo desse parasito tão formidável.

A minha eterna gratidão aos 7 anos de trajetória, junto ao meu orientador Stefan Michael Geiger, ao qual agradeço a disposição, paciência, conhecimento e verdadeira orientação. Por eu ter podido fazer parte de trabalhos tão maravilhosos e importantes para a sociedade e por me mostrar a realidade de algumas populações que ainda vivem e sofrem com as doenças negligenciadas.

À minha coorientadora Lilian Lacerda Bueno, por todos os ensinamentos, conhecimentos adquiridos no doutorado, pelos inúmeros auxílios nos experimentos e pelas conversas de ânimo. Por nos manter estimuladas na pandemia e principalmente por sempre nos lembrar que somos mulheres fortes e conquistamos o que queremos.

Aos alunos do laboratório de Helmintoses Intestinais (Paulo Ricardo, Roney Elias, Karine e Dayane), pelo companheirismo e aprendizado.

Aos integrantes do laboratório de Imunologia e Genômica de Parasito. A Dra Luisa Magalhães pelos conhecimentos adquiridos e a minha dupla de experimentos Dra. Thaís Eloi, agradeço o companheirismo e conhecimentos adquiridos.

Ao laboratório de Imunologia de Helmintos pela colaboração na produção de antígeno solúvel do verme adulto de *Schistosoma mansoni* (SWAP).

Ao laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores (LINBIO), Plataforma de Citometria, onde foi realizada toda a leitura da citometria.

Ao financiamento de todo o meu projeto pela CONFAP/ Fundação Newton (Medical Research Council, Inglaterra e FAPEMIG) coordenado no Brasil pelo Prof. Ricardo Toshio Fujiwara.

À CAPES, pela bolsa que me permitiu dedicar exclusivamente à pesquisa.

Ao Departamento e aos professores da Pós- Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

Às secretárias Sumara e Sibebe, sempre dedicadas e atenciosas.

Às equipes de endemias e a Secretária de Saúde de Januária, as quais foram fundamentais para a realização do trabalho na região.

À população dos distritos e localidades de Brejo do Amparo, Riacho da Cruz, Pandeiros, Alegre, Barreiro, Pindaibal, São Joaquim e Ovo D-ema.

Agradeço à Deus que me manteve forte nesse momento tão complexo da pandemia.

Ao meu esposo Saulo e aos meus dois filhos de quatro patas Wilson Felinus e Juju Felinus, por sempre estar comigo em todos os momentos, me dando força e incentivo.

À minha mãe Beatriz e ao meu Pai Antônio, ambos são trabalhadores rurais e estudaram só até o ensino fundamental e dos quais tenho muito orgulho de ser filha. A educação e a Ciência mudaram a minha vida completamente.

Aos meus irmãos Ana Paula, João Paulo e Juninho que sempre me apoiaram.

Aos meus amigos do mestrado para a vida, Samira, Vinícius, Daniela, Elis e Dayane.

E à todos que fizeram parte dessa conquista, o meu Muito Obrigada!

RESUMO

O novo panorama epidemiológico da esquistossomose no Brasil é caracterizado por um aumento de áreas de baixa a média endemicidade e geralmente populações com baixas cargas parasitárias, e como consequência, de difícil diagnóstico por métodos parasitológicos convencionais. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar a resposta imune celular e humoral em indivíduos infectados com *Schistosoma mansoni* em busca de possíveis marcadores imunológicos que possam diferenciar indivíduos de baixa carga parasitária, daqueles ovo-negativos de área endêmica. Foi realizado a coleta de fezes e urina, para os exames de Kato-Katz e o teste rápido para antígeno catódico circulante, POC-CCA. Coletamos sangue periférico para confecção de hemogramas e obtenção de plasma para ensaios imunológicos (ELISA), tais como detecção de citocinas (Th1, Th2, Th17 e regulatória) e anticorpos anti-SWAP (IgG1, IgG4 e IgE específicos). Além disso, a resposta imune celular foi avaliada, *in vitro*, em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), usando citometria de fluxo e com foco em linfócitos TCD4+. Utilizamos um protocolo para avaliar estas células em relação à ativação celular (marcadores CD69 e HLA-DR), exaustão (PD-1 e TIM-3), painel Th2/TCD4+ produtoras de IL-9 (IL-4, IL-9 e IL-10) e participação de células Th17 (CCR6, ROR γ T, IL-17). O uso dos PBMCs em sobrenadantes de cultura para a detecção de citocinas nos grupos NE (negativo endêmico), CB (baixa carga parasitária), CMA (média/alta carga parasitária) sem estímulo (SE) e com estímulo antígeno solúvel do verme adulto (SWAP) antes do tratamento (T0) e após o tratamento (T30d). A aplicação do questionário socioeconômico e comportamental indicou alguns fatores de risco para a infecção. O hemograma no T0, observamos um aumento de monócitos do grupo CB em comparação ao NE e maiores concentrações de eritrócitos em comparação ao CMA. Já que as plaquetas foram maiores nos grupos infectados (CB, CMA) em comparação ao ovo-negativo (NE). No T30d, apresentou uma diminuição nas concentrações de plaquetas e eritrócitos apenas no grupo CMA. Na resposta imune humoral demonstrou que os níveis de IgG1, IgG4 específicos foram maiores no grupo CB e CMA. Entretanto a IgE foi maior no grupo CMA, do que, nos grupos CB e NE no T0. Portanto, no T30d o grupo CB aumentou os níveis IgG1 e IgE, enquanto, o grupo CMA aumentou os níveis de IgG1 e diminuiu os de IgG4. A avaliação da resposta imune celular demonstrou que no T0, os PBMCs do grupo NE demonstraram uma maior ativação de linfócitos TCD4+, enquanto o grupo CB não induziu marcadores de ativação recente CD69 e tardio HLA-DR. No painel de exaustão, após tratamento, apresentou o aumento na expressão de PD-1 nos indivíduos infectados (grupos CB e CMA). Já o painel Th2/TCD4 produtoras de IL-9, o grupo CB, induziu uma resposta do tipo 2, mas não, a expressão de IL-9. Esse tipo de perfil continuou após o tratamento, entretanto, houve um aumento na expressão de IL-9. Para o painel Th17, observamos um aumento dos marcadores de linfócitos Th17 nos grupos NE e CMA, mas não, no grupo CB. Mesmo após tratamento, não houve um aumento de marcadores nos grupos CMA e CB. Na dosagem de citocinas e quimiocinas dos sobrenadantes de PBMCs, do grupo CB após tratamento, resultou em uma diminuição de citocinas inflamatórias e o aumento da citocina IL-10. Enquanto o grupo CMA, apresentou um aumento na secreção de TNF- α , IL-13, CCL17 (TARC) e IL-10. No modelo multivariado, um dos resultados mais relevantes do presente estudo demonstrou que, indivíduos com baixa carga parasitária, exibiram uma resposta imune celular distinta através de células T CD4+, em comparação aos indivíduos ovo negativos, e essa diferença se manteve 30 dias após tratamento. Contudo, nesses indivíduos infectados por *S. mansoni*, não observamos características da esquistossomose grave. Desta forma, sugerimos que esses indivíduos poderiam ser definidos como crianças e adolescentes assintomáticos, com a forma mais

leve da infecção. Ademais, os marcadores imunológicos indicaram uma resposta imune celular do tipo 2, mas com a participação de IL-10 e sem uma produção acentuada de citocinas inflamatórias.

Palavras- chave: *Schistosoma mansoni*; baixa carga parasitária; ativação; exaustão, Th17; TCD4+ produtoras de IL-9.

ABSTRACT

The new epidemiological panorama of schistosomiasis in Brazil is characterized by an increase in areas of low to medium endemicity and generally populations with low parasitic loads, as a consequence, these individuals are difficult to diagnose by the common parasitological methods. Therefore, the objective of the present study was to characterize the cellular and humoral immune response in individuals infected with *Schistosoma mansoni* in search of possible immunological biomarkers that can differentiate individuals with low parasitic burden, from those egg-negative in an endemic area. Feces and urine were collected for the detection of eggs in Kato-Katz slides and for the detection of circulating cathodic antigen in a rapid urine test, POC-CCA. A sample of peripheral blood was used for a hemogram and for the separation of plasma for immunological assays (ELISA), for the detection of various cytokines (Th1, Th2, Th17 and regulatory) and specific anti-SWAP antibodies (IgG1, IgG4 and IgE). Furthermore, the cellular immune response was evaluated, in vitro, in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), using flow cytometry and focusing on TCD4 + lymphocytes. We used a protocol to evaluate these cells in relation to cell activation (CD69 and HLA-DR markers), exhaustion (PD-1 and TIM-3), panel Th2 / TCD4 + IL-9 producers (IL-4, IL-9 and IL-10) and participation of Th17 cells (CCR6, ROR γ T, IL-17). The use of PBMCs in culture supernatants for the detection of cytokines in the NE (endemic negative), CB (low parasitic load), CMA (medium / high parasitic load) groups without stimulation (SE) and with adult worm stimulation (SWAP) before treatment (T0) and after treatment (T30d). The application of the socioeconomic and behavioral questionnaire indicated some risk factors for the infection. The blood count at T0, we observed an increase in monocytes in the CB group compared to the NE and higher concentrations of erythrocytes compared to the CMA. Since platelets were higher in the infected groups (CB, CMA) compared to egg-negative (NE). At T30d, there was a decrease in platelet and erythrocyte concentrations only in the CMA group. The humoral immune response demonstrated that the levels of specific IgG1, IgG4 were higher in the CB and CMA group. However, IgE was higher in the CMA group than in the CB and NE groups at T0. Therefore, at T30d, the CB group increased IgG1 and IgE levels, while the CMA group increased IgG1 levels and decreased IgG4 levels. The evaluation of the cellular immune response demonstrated that at T0, the PBMCs of the NE group demonstrated a greater activation of TCD4 + lymphocytes, while the CB group did not induce recent activation markers CD69 and late HLA-DR. After treatment, there was only an increase in the marker of recent activation in the CB group. In the exhaustion panel, after treatment, he showed an increase in the expression of PD-1 in infected individuals (groups CB and CMA). The panel Th2 / TCD4 producing IL-9, the CB group, induced a type 2 response, but not, the expression of IL-9. This type of profile continued after treatment, however, there was an increase in IL-9 expression. For the Th17 panel, we observed an increase in Th17 lymphocyte markers in the NE and CMA groups, but not in the CB group. Even after treatment, there was no increase in markers in the CMA and CB groups. In the dosage of cytokines and chemokines of PBMCs supernatants, of the CB group after treatment, resulted in a decrease in inflammatory cytokines and an increase in the cytokine IL-10. While the CMA group, it showed an increase in the secretion of TNF- α , IL-13, CCL17 (TARC) and IL-10. In the multivariate model, one of the most relevant results of the present study demonstrated that, individuals with low parasitic load, exhibited a distinct cellular immune response through CD4 + T cells, compared to egg negative individuals, and this difference was maintained 30 days after treatment. However, in these individuals infected

with *S. mansoni*, we did not observe characteristics of severe schistosomiasis. Thus, we suggest that these individuals could be defined as asymptomatic children and adolescents, with the mildest intestinal form of the infection. In addition, the immunological markers indicated a type 2 cellular immune response, but with the participation of IL-10 and without a marked production of inflammatory cytokines.

Keywords: *Schistosoma mansoni*; low parasitic load; activation; exhaustion, Th17; TCD4+ IL-9 producers.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAMs - Macrófagos alternativamente ativados
AMCase - Membro da família quitinase
APCs - Células apresentadoras de antígenos
Arg-1 - Enzima arginase-1
CAMs - Macrófagos ativados pela via clássica
CB- Baixa carga parasitária
CCL - Quimiocinas CCL
CCR - quimiocinas C-C
CD69 - Marcador de ativação celular
CD206 - Receptor de manose
CMA- Média a alta carga parasitária
ConA - Concanavalina A
CXCL - Quimiocinas CXCL
EDN -Neurotoxina derivada de eosinófilos
ECP - Proteína catiônica eosinofílica
EPO - Peroxidase de eosinófilos
FcR1 - Receptores de imunoglobulinas
Foxp3⁺ - Fator de transcrição de células T reguladoras (Forkhead box P3)
GATA - Fator de transcrição (Zinc-finger)
ICAM- Moléculas de adesão celular
Ig - Imunoglobulina
IL - Interleucina
IL-2R - Receptor da interleucina IL-2
ILC - Células linfoides inatas
INF- α – Interferon- alpha
iNOS- óxido nítrico sintase induzida
IRF4 - Fator de resposta ao interferon 4
K-K - Método de Kato-Katz
LysM^{cre} IL-4^{-flox} - linhagens de camundongos deficientes na ativação de macrófagos alternativamente ativados.
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
MIP-1A - Proteínas Inflamatórias de Macrófagos
MBP - Proteína básica principal
MMR - Receptor de manose
NE-Negativo endêmico
NK - Células naturais Killer
NO - Oxido nítrico
OPG - ovos por grama de fezes
PAMPs - Padrões moleculares associados à patógenos
PBMCs - Células mononucleares do sangue periférico
PCE - Programa de controle da esquistossomose
PCA- Análise de componente principal
PDL - ligante de morte programada
RANTES - Quimiocina CCL5
ROR γ t - Fator de transcrição de Th17
ROS - Espécies reativas ao oxigênio

SE- Sem estímulo

SEA - Antígeno solúvel do ovo de *Schistosoma mansoni*

STAT - Transdutor de sinal e ativador de transcrição

SWAP – Antígeno solúvel do verme adulto de *Schistosoma mansoni*

T-bet - Fator de transcrição de células T do tipo 1.

T0- Antes do tratamento

T30d- 30 dias após tratamento

TGF- β - Fator de transformação de crescimento

Th - Linfócitos *T helper*

TNF α - Fator de necrose tumoral- alfa

TSLP - Linfopoetina estromal tímica

YM - Membro da família quitinase

^{-/-} - depleção

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i> . Fonte: Adaptado de McManus et al., 2018.	25
Figura 2 - Heterogeneidade de linfócitos TCD4 ⁺ na imunopatologia em modelos murinos na infecção por <i>Schistosoma</i> spp. Adaptado de Zheng et al., 2020.....	33
Figura 3 - Resposta imunológica nas patologias causadas por <i>Schistosoma mansoni</i> . Fonte: Adaptado de Larkin et al., 2012.	34
Figura 4 - Mapa da localização do Estado de Minas Gerais (laranja). A localização do município de Januária no Norte do estado de Minas Gerais (vermelho) e o mapa da extensão de Januária, com os distritos e localidades. Fonte: Cardoso, 2018.	38
Figura 5 – Fluxograma do delineamento do estudo.	39
Figura 6 - Confeção das lâminas de Kato-Katz. Fonte: fotografia da autora.	41
Figura 7 -Teste rápido de urina POC-CCA (teste de antígeno catódico circulante) para detecção da esquistossomose mansoni em duas amostras de urina. O cassete da esquerda é considerado negativo ou não-reagente e o da direita considerado positivo ou reagente. Fonte: fotografia da autora.	42
Figura 8 - Avaliação do índice de massa corporal obtidos os escores z conforme recomendação da OMS (WHO, 2005), a saber: normal (> -2 a < +1); déficit nutricional (z < -2); excesso nutricional (z ≥ + 2). Padrão de curva em crianças e adolescentes de 6 a 19 anos pela OMS (Linha verde), curva das crianças e adolescentes do nosso estudo (Linha vermelha). (A) grupo Infectado com <i>S. mansoni</i> n=47; (B) grupo NE negativo endêmico n=29.	52
Figura 9 - Resultados do hemograma no T0 (antes do tratamento) e comparação dos valores entre os grupos NE (n=29), CB (n=26), CMA (n=12). As linhas pontilhadas vermelhas marcam a referência de níveis normais para cada população celular, descrita entre colchetes. (A) Eosinófilos [50- 500 mm ³]; (B) Neutrófilos [1800 a 8000 mm ³]; (C) Linfócitos [900 a 2900 mm ³]; (D) Monócitos [300 a 900 mm ³]; (E) Eritrócitos [4,40 a 6,0 milhões/ mm ³] e (F) Plaquetas [140.000 a 450.000]. Os resultados são expressos por mediana e interquartil. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Os símbolos *, **, *** e ns. indicam p ≤ 0,05, p ≤0,01, p ≤ 0,001, não significativo, respectivamente.	61
Figura 10 - Pareamento entre a contagem das células do sangue periférico nos grupos positivos para <i>S. mansoni</i> , CB (n=26), CMA (n=12), antes do tratamento (T0) e trinta dias	

após tratamento (T30d). (A-B) Eosinófilos; (C-D) Neutrófilos; (E-F) Linfócitos; (G-H) Monócitos; (I-J) Eritrócitos, (K-L) Plaquetas. Nos dados paramétricos foi usado o teste T pareado e nos dados não paramétricos Wilcoxon pareado, com ns não significativo e $**p \leq 0,001$	63
Figura 11 -Concentrações de citocinas (pg/ml), no plasma dos grupos NE (n=29); CB (n=26); CMA (n=12) no T0. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's, com valores de ns não significativo entre os grupos.	65
Figura 12 - Perfil de detecção das imunoglobulinas (A) IgG1; (B) IgG4 (C) IgE anti-SWAP. Pareamento entre os grupos e imunoglobulinas no T0 e T30 dias (D-E) . O ponto de corte foi determinado a partir da análise da curva ROC (linha pontilhada preta). Os símbolos **, *** e **** indicam, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's e Wilcoxon pareado....	66
Figura 13 - Correlação entre o opg e a imunoglobulina (A) IgG1; (B) IgG4; (C) IgE anti-SWAP. O teste realizado foi a Correlação de Spearman com o valor de p indicado em cada gráfico.....	67
Figura 14 - Resumo da detecção de imunoglobulinas no plasma, IgG1; IgG4 e IgE anti-SWAP. NE n=29, CB n= 26 e CMA n=12 (A) Grupo NE T0 (Negativo endêmico) antes do tratamento, diminuição de todas as imunoglobulinas (B) Grupo CB T0 (carga baixa) antes do tratamento, aumento de IgG1 e IgG4 e diminuição da imunoglobulina IgE e CB T30d (carga baixa) após tratamento, aumento de IgG1 e IgE. (C) Grupo CMA T0 (média a alta carga parasitária) antes do tratamento, aumento de IgG1, IgG4 e IgE e CMA T30d (média a alta carga parasitária) após tratamento, aumento de IgG1 e diminuição de IgG4.	68
Figura 15 - Ilustração dos painéis estabelecidos: (A) Painel ativação de linfócitos com os marcadores de células TCD4 ⁺ (CD3 ⁺ , CD4 ⁺), HLA-DR e CD69. (B) Painel de Exaustão PD-1 e TIM-3. (C-D) Painel Th2 / e linfócitos produtores de IL-9 (E) Painel Th17, CCR-6 e ROR γ T.....	76
Figura 16 - Estratégia de análise dos diferentes painéis: (A) Análise comum a todos os painéis, Singlets, Viabilidade, SSC-A/FSC-A (tamanho e granulosidade) para linfócitos e duplo positivo CD3-CD4. (B) painel ativação, TCD4 ⁺ / CD69 e TCD4 ⁺ / HLA-DR. (C) painel exaustão TCD4 ⁺ / PD-1 e TIM-3. (D) painel Th2 e linfócitos produtores de IL-9, TCD4 ⁺ / IL-4, TCD4 ⁺ / IL-9, TCD4 ⁺ / IL-10, TCD4 ⁺ / IL-4 ⁺ IL-9 ⁺ e TCD4 ⁺ / IL-9 ⁺ IL-10 ⁺ conforme descrito por Anuradha & Babu 2017. (E) painel Th17, TCD4 ⁺ / CCR-6 e ROR γ T/ IL17.....	77

Figura 17 - Painel Ativação de linfócitos TCD4⁺, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo NE na coluna branca no T0 (n=10); CB na coluna azul no T0 (n=10); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de CD69, (B) porcentagem de HLA-DR, (C) Intensidade média de fluorescência (MIF) de CD69, (D) MIF de HLA-DR, (E) linfócitos absolutos CD69 (F) linfócitos absolutos de HLA-DR. Os resultados são expressos por mediana e interquartis. Os símbolos *, **, *** e **** indicam p ≤ 0,05, p ≤ 0,01, p ≤ 0,001 e p ≤ 0,0001, respectivamente. o teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's..... 80

Figura 18- Painel Ativação de linfócitos TCD4⁺, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo CB na coluna azul no T0 (n=10) e T30d (n=8); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9) e T30d (n=8), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de CD69, (B) porcentagem de HLA-DR, (C) média intensidade de fluorescência (MIF) de CD69, (D) MIF de HLA-DR, (E) linfócitos absolutos CD69 (F) linfócitos absolutos de HLA-DR. Os resultados são expressos por mediana e interquartis. Os símbolos * e ** indicam p ≤ 0,05 e p ≤ 0,01, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. 81

Figura 19 - Painel Exaustão de linfócitos TCD4⁺, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE) O grupo NE na coluna branca no T0 (n=10); CB na coluna azul no T0 (n=10); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de TCD4⁺ PD-1⁺; (B) porcentagem de TIM-3 [TCD4⁺ PD-1], (C) MIF PD-1, (D) MIF de TIM-3, (E) linfócitos absolutos PD-1, (F) linfócitos absolutos TIM-3. Os resultados são expressos como mediana e interquartis. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Todos os dados acima são ns (p ≥ 0,05)..... 83

Figura 20- Painel Exaustão de linfócitos TCD4⁺, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo CB na coluna azul no T0 (n=10) e T30d (n=8); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9) e T30d (n=8), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de TCD4⁺ PD-1⁺; (B) MIF PD-1, (C) linfócitos absolutos PD-1. Os resultados são expressos por mediana e interquartis. Os símbolos * e ** indicam p ≤ 0,05 e p ≤ 0,01, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. 83

Figura 21 - Paineis Th2 e TCD4⁺ produtoras de IL-9, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo NE na coluna branca no T0

(n=10); CB na coluna azul no T0 (n=10); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de IL-9; (B) porcentagem de IL-4; (C) porcentagem de IL-10; (D) MIF de IL-9; (E) MIF de IL-4; (F) MIF de IL-10; (G) linfócitos absolutos de IL-9; (H) linfócitos absolutos de IL-4; (I) linfócitos absolutos de IL-10. Os resultados são expressos com mediana e interquartis. Os símbolos * e ** indicam $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. 85

Figura 22- Painéis Th2 e TCD4⁺ produtoras de IL-9, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo CB na coluna azul no T0 (n=10) e T30d (n=8); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9) e T30d (n=8), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de IL-9; (B) porcentagem de IL-4; (C) porcentagem de IL-10; (D) MIF de IL-9; (E) MIF de IL-4; (F) MIF de IL-10; (G) linfócitos absolutos IL-9; (H) linfócitos absolutos IL-4; (I) linfócitos absolutos IL-10. Os resultados são expressos com mediana e interquartis. Os símbolos *, ** e *** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. 87

Figura 23 - Painel Th17, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo NE na coluna branca no T0 (n=10); CB na coluna azul no T0 (n=10); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE) (A) porcentagem de ROR γ T/ IL-17; (B) porcentagem de CCR6; (C) MIF de IL-17; (D) MIF de ROR γ T; (E) MIF de CCR6 (F) linfócitos absolutos de ROR γ T/ IL-17; (G) linfócitos absolutos de CCR6. Os resultados são expressos com mediana e interquartis. Os símbolos *, ** e *** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. 89

Figura 24- Painel Th17, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo CB na coluna azul no T0 (n=10) e T30d (n=8); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9) e T30d (n=8), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de ROR γ T/ IL-17; (B) porcentagem de CCR6; (C) MIF de IL-17; (D) MIF de ROR γ T; (E) MIF de CCR6; (F) linfócitos absolutos de ROR γ T/ IL-17; (G) linfócitos absolutos de CCR6. Os resultados são expressos com mediana e interquartis. Os símbolos * e ** indicam $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. 90

Figura 25- Detecção de citocinas e quimiocinas (pg/mL), em sobrenadante de PBMCs, nos diferentes tempos, estímulos e incubações. (A) detecção de citocinas e quimiocinas

sem estímulo (SE) no tempo zero (T0), com 48 h (linha contínua) e 72h (linha tracejada); (B) detecção de citocinas e quimiocinas com estímulo (SWAP) no tempo zero (T0), com 48 e 72h; (C) detecção de citocinas e quimiocinas sem estímulo (SE) no tempo (T30d), com 48 h e 72h; (D) detecção de citocinas e quimiocinas com estímulo (SWAP) no tempo (T30d), com 48 h e 72h. 91

Figura 26- Perfil de respondedores (%) de citocinas e quimiocinas (pg/mL). (A) grupo NE no T0, sem estímulo SE (Linha contínua) e com estímulo SWAP (linha tracejada); (B) grupo CB no T0 e T30d sem estímulo SE e com estímulo SWAP ;(C) grupo CMA no T0 e T30d sem estímulo SE e com estímulo SWAP. As zonas do radar indicadas correspondem aos valores de 25,50,75, 100 (%). Foram considerados respondedores, aqueles com valores acima de 10 pg/mL (último ponto da curva) em cada citocina e quimiocina. Os símbolos *, **, *** e **** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$ respectivamente. O teste usado foi de Fisher's. O símbolo (▪) significa que as citocinas IL-13 e IL-10 foram dosadas em sobrenadantes após incubação de 48 h o SE no T0 e SWAP no T30d. O restante foi dosado em sobrenadantes após incubação de 72h 93

Figura 27- Concentrações de citocinas e quimiocinas (pg/mL), indicadas em escala logarítmica (log 10), em sobrenadantes estimulados com SWAP com os melhores tempos de incubação. Grupo NE com n=10 (bola branca), CB n=10 (bola azul) e CMA n=9 (bola vermelha), sem estímulo (SE) e com estímulo (SWAP). Os resultados são expressos com mediana e interquartis. Os símbolos *, ** e *** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Observação: Não foi detectado concentrações da quimiocina CCL11..... 95

Figura 28- Concentrações de citocinas e quimiocinas (pg/mL), indicadas em escala logarítmica (log 10), em sobrenadantes estimulados com SWAP com os melhores tempos de incubação. Grupo NE com n=10 (bola branca), CB n=10 (bola azul) e CMA n=9 (bola vermelha), sem estímulo (SE) e com estímulo (SWAP) no T0 e T30d. Os resultados são expressos com mediana e interquartis. Os símbolos *, **, *** e **** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$ respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Observação: Não foi detectado concentrações da quimiocina CCL11. 96

Figura 29- Análise de Componentes principais entre a porcentagens de CD69, HLA-DR, PD-1/TIM-3, RO γ T/IL-17, CCR6, IL-9, IL-4 e IL-10. (A) grupos NE, CB, CMA, sem estímulo (SE) e com estímulo (SWAP) no T0; (B) grupos NE (T0), CB, CMA sem estímulo (SE) e com estímulo (SWAP), no T30d. 98

Figura 30- Análise de Componentes principais (PCA), e mapa de calor entre a porcentagens de CD69, HLA-DR, PD-1/TIM-3, RO γ T/IL-17, CCR6, IL-9, IL-4 e IL-10. **(A)** PCA: grupos CB, CMA e NE T0 e T30 (SE), **(B)** mapa de calor: grupos NE T0, CB, CMA T30d (SE); **(C)** PCA: NE T0, CB, CMA T30d (SWAP); **(D)** mapa de calor: NE T0, CB, CMA T30d (SWAP). 99

Figura 31- Resumo da análise univariada dos marcadores dos painéis ativação, exaustão, Th2/TCD4+ produtoras de IL-9 e Th17, em PBMCs após 24 horas de incubação e a produção de citocinas e quimiocina em sobrenadantes da cultura celular após 48-72h de incubação. NE negativo endêmico; CB baixa carga parasitária; CMA média a alta carga parasitária; SE sem estímulo; SWAP antígeno solúvel do verme adulto; T0 antes do tratamento; T30d após tratamento. 100

Figura 32- Modelo Multivariado, com as semelhanças e dissemelhanças entre a porcentagem dos marcadores nos grupos NE, CB e CMA antes e após tratamento. NE negativo endêmico; CB baixa carga parasitária; CMA média a alta carga parasitária; SE sem estímulo; SWAP antígeno solúvel do verme adulto; T0 antes do tratamento; T30d após tratamento..... 100

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos indivíduos residentes no Norte de Minas Gerais, Município de Januária- Brasil.	44
Tabela 2 - Caracterização dos indivíduos quanto à sua escolaridade, trabalho do responsável e da estrutura de seu domicílio (parte interna).....	45
Tabela 3 - Variáveis contínuas relacionadas ao número de membros e cômodos de cada residência.....	46
Tabela 4 - Característica do peridomicílio, água para consumo e instalações sanitárias dos indivíduos do estudo.	47
Tabela 5 - Características dos indivíduos em relação à higienização pessoal e alimentação.	48
Tabela 6 - Análise dos antecedentes patológicos dos indivíduos do estudo	49
Tabela 7 - Parâmetros do estado físico no grupo NE e no Infectado por <i>S. mansoni</i>	50
Tabela 8 - Parâmetro Antropométrico: Medianas e interquartis de circunferência abdominal nos grupos NE e infectado por <i>S. mansoni</i>	51
Tabela 9 - Nova caracterização do grupo positivo na infecção por <i>S. mansoni</i> pelo método de Kato-Katz, separados conforme a sua carga parasitária	53
Tabela 10 - Paineis ativação de linfócitos	75
Tabela 11 - Paineis exaustão de linfócitos	75
Tabela 12 - Paineis Th2/TCD4+ produtoras de IL-9	75
Tabela 13 - Paineis Th17.....	76
Tabela 14 - Correlação da intensidade da infecção (opg), com a produção de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de PBMCs.....	97

SUMÁRIO

1.	Revisão bibliográfica	22
1.1.	Distribuição da esquistossomose	22
1.2.	Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	24
1.3.	Manifestações clínicas	25
1.4.	Diagnóstico da infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	26
1.5.	Resposta imunológica durante a infecção por <i>S. mansoni</i>	28
2.	Justificativa	35
3.	Objetivos.....	36
3.1.	Objetivo geral	36
4.	Materiais e Métodos:	38
4.1.	População e área de estudo - Capítulo 1	38
4.2.	Considerações éticas.....	39
4.3.	Questionário	40
4.4.	Obtenção do material biológico e métodos de diagnóstico da esquistossomose	40
4.5.	Teste rápido para detecção de antígeno catódico circulante de <i>S. mansoni</i> (POC-CCA)	41
4.6.	Análise de dados.....	43
5.	Resultados:	44
5.1.	Parte descritiva da população	44
5.2.	Questionário: fatores socioeconômicos e comportamentais.....	44
5.3.	Dados antropométricos	50
5.4.	Nova classificação do grupo Infectado de acordo com a carga parasitária.....	52
6.	Discussão: Capítulo 1	54
7.	Materiais e Métodos: capítulo 2	57
7.1.	Avaliação dos parâmetros hematológicos nos indivíduos infectados e não infectados por <i>S. mansoni</i>	57
7.2.	Elisa para a detecção de citocinas no plasma de indivíduos infectados e não infectados por <i>S. mansoni</i>	57
7.3.	Detecção de imunoglobulinas específicas contra antígeno solúvel do verme adulto de <i>S. mansoni</i> (SWAP)	58
8.	Resultados: Capítulo 2.....	60
8.1.	Perfil hematológico dos indivíduos dos grupos NE, CB e CMA antes do tratamento com praziquantel (T0).	60

8.2.	Perfil hematológico dos indivíduos dos grupos NE, CB e CMA após o tratamento com praziquantel.....	61
8.3.	Perfil imunológico de citocinas nos grupos NE, CB e CMA, antes do tratamento com praziquantel (T0).	64
8.4.	Perfil de imunoglobulinas nos indivíduos dos grupos NE, CB e CMA antes e após o tratamento com praziquantel.	66
9.	Discussão:Capítulo 2	69
10.	Materiais e Métodos: Capítulo 3	73
10.1.	Obtenção do antígeno do verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> (SWAP).....	73
10.2.	Separação de células mononucleares do sangue periférico	73
10.3.	Imunofenotipagem dos linfócitos TCD4+	74
11.	Resultados: Capítulo 3	79
11.1.	Ativação de linfócitos T CD4+ antes do tratamento com praziquantel T0.	79
11.2.	Ativação de linfócitos T CD4+ após o tratamento com praziquantel T30d.	80
11.3.	Exaustão de linfócitos TCD4+ antes do tratamento com praziquantel T0.	82
11.4.	Exaustão de linfócitos TCD4+ após o tratamento com praziquantel T30d.	83
11.5.	Painel Th2 e TCD4+ produtoras de IL-9 antes do tratamento com praziquantel T0. 84	
11.6.	Painel Th2 e TCD4+ produtoras de IL-9: após o tratamento com praziquantel T30. 85	
11.7.	Painel Th17 antes do tratamento com praziquantel T0	88
11.8.	Painel Th17 após o tratamento com praziquantel T30d.	89
11.9.	Avaliação e comparação da produção de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de PBMCs estimulados com SWAP nos grupos NE, CB e CMA antes e após o tratamento com praziquantel.	91
11.10.	Respondedores de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes antes e após o tratamento com praziquantel.	92
11.11.	Detecção de citocinas e quimiocinas na infecção por <i>S. mansoni</i> antes do tratamento com praziquantel T0.	94
11.12.	Detecção de citocinas e quimiocinas na infecção por <i>S. mansoni</i> , antes e após o tratamento com praziquantel.	95
11.13.	Correlação entre a intensidade de infecção(opg), citocinas e quimiocinas.	97
11.14.	Análise multivariada de marcadores celulares	97
12.	Discussão: Capítulo 3	101
13.	Conclusão	111
14.	Referências	112
15.	Apêndice	138
15.1.	Apêndice A- Questionário	138

15.2. Apêndice B- Análise de medianas e interquartis de sobrenadantes de PBMCs dos grupos NE, CB e CMA sem estímulo (SE) e com estímulos positivo (PMA+I), antes do tratamento (T0) e 30 dias após tratamento (T30d).	140
15.3. Apêndice C- Análise da frequência de respondedores dos sobrenadantes de PBMCs dos grupos NE, CB e CMA sem estímulo (SE) e com estímulos (SWAP), antes do tratamento (T0) e 30 dias após tratamento (T30d).	142
16. Anexo	145
16.1. Anexo 1- Artigo produzido sobre indivíduos com baixa carga parasitária na infecção por <i>S. mansoni</i> durante o doutoramento.....	145
16.2. Anexo 2- Artigos produzidos em colaborações durante o doutoramento.	145
16.3. Anexo 3 Comitê de ética da UFMG	147
16.4. Anexo 4- Termo de Assentimento TCLE.....	152

1. Revisão Bibliográfica

1.1. Distribuição da esquistossomose

A esquistossomose é uma doença crônica de grande importância global, causada por trematódeos de diferentes espécies do gênero *Schistosoma* (KING, 2010).

Estimativas mais recentes da Organização Mundial da Saúde, quantificaram o impacto da doença na saúde da população e demonstraram que a esquistossomose é responsável por 2,5 milhões de DALYS (do inglês Disability Adjusted Life Years -anos de vida perdidos por incapacidade), calculados de 2000-2016, e que acomete homens e mulheres na faixa etária de 30 a 49 anos (WHO, 2018).

No mundo, existem seis principais espécies que podem infectar os seres humanos: *Schistosoma intercalatum* (FISCHER, 1934); *Schistosoma mekongi* (VOGE, BRICKNER & BRUCE, 1978); *Schistosoma malayensis* (GREER 1988); *Schistosoma haematobium* (BILHARZ, 1852); *Schistosoma japonicum* (KATSURADA, 1904) e *Schistosoma mansoni* (SAMBON, 1907). O *S. haematobium* e *S. mansoni*, encontram-se distribuídos no continente africano, sendo o último também a única espécie encontrada nas Américas. O *S. japonicum* é encontrado no continente asiático (COLLEY et al., 2014), assim como o *S. mekongi*, o qual é encontrado na bacia do Rio Mekong, localizado no sudeste do continente. As outras duas espécies, *S. intercalatum* e *S. malayensis* são encontradas na África ocidental e na região central da China, cuja transmissão é caracterizada por focos limitados e com menor importância epidemiológica (GRYSSELS, 2006; COLLEY et al. 2014; WHO, 2017).

A esquistossomose é endêmica em áreas tropicais e subtropicais do globo, principalmente em regiões pobres, onde o saneamento básico é precário (COLLEY et al. 2014). No continente africano, a prevalência em crianças com idade escolar é acima de 70%, o que compromete o seu desenvolvimento físico e cognitivo (VAN DER WERF et al., 2003; BUSTINDUY et al., 2016). Estima-se que 800 milhões de pessoas vivem em áreas de risco pelo mundo e mais de 200 milhões de pessoas estão infectadas, das quais, 20 milhões são sintomáticas e apresentam a forma grave da doença (STEINMANN et al., 2006; GRIMES et al., 2014). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que em 2014, aproximadamente 258 milhões de pessoas necessitavam de tratamento, mas apenas 61,6 milhões conseguiram o tratamento preconizado (WHO, 2014). Nas áreas de alta

endemicidade, a estratégia usada para diminuir a transmissão e minimizar a morbidade é o tratamento em massa com o quimioterápico praziquantel, independente da realização dos exames parasitológicos de fezes e/ou urina (WHO, 2014; SESAY et al., 2014).

No Brasil, estima-se que 25 milhões de pessoas vivem em área de risco (BRASIL, 2014) e aproximadamente 1,5 milhão estão infectadas pelo *S. mansoni*. Entre os anos 2000 e 2011, a esquistossomose mostrou-se como a segunda causa de mortes em doenças tropicais negligenciadas (DTNs), (MARTINS-MELO et al., 2016). Em 2016, no país o DALYS observado no país para DTNs, teve como infecções mais importantes, a Doença de Chagas (141,640 DALYS), seguida pela esquistossomose (102.259 DALYS) e a dengue (92.538 DALYS) (MARTINS- MELO et al., 2018).

Os principais fatores de risco que contribuem para a manutenção da doença no país são a falta de saneamento básico, que cria um ambiente favorável para o desenvolvimento do hospedeiro intermediário, o molusco do gênero *Biomphalaria*; a migração de pessoas infectadas para áreas isentas da doença; e os hábitos da população endêmica, como o contato frequente com coleções hídricas, contendo o hospedeiro intermediário, em conjunto, com a defecação em áreas abertas (NOYA et al., 2015). As áreas endêmicas brasileiras estão localizadas nos Estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Pernambuco, Ceará, Distrito Federal, Maranhão, Pará, Rio de Janeiro e São Paulo (BRASIL, 2014).

A distribuição da esquistossomose no Brasil sofreu uma mudança epidemiológica, com a implementação do Programa de Controle da esquistossomose, que tem como medidas o diagnóstico precoce, através de exames parasitológicos de fezes usando o Kato-Katz, e a quimioterapia individual dos pacientes positivos com praziquantel. Essas medidas promoveram a diminuição de áreas de alta endemicidade para áreas de baixa endemicidade, através da redução da carga parasitária da população e de casos clínicos graves (BARBOSA et al., 2008). Estudos recentes demonstraram que a taxa de positividade nas áreas endêmicas para a esquistossomose, reduziram de 10,09% em 1949, para 9,24% em 1977, com estimativas mais atuais em 1,79% (BRASIL., 2014; KATZ, 2018).

1.2. Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni* é um trematódeo da subclasse Digenea (que faz referência ao seu parasitismo) que requer a presença de dois hospedeiros para completar o seu ciclo biológico. A reprodução sexuada é realizada no hospedeiro definitivo, que são os seres humanos e outros mamíferos, sendo o humano o principal hospedeiro definitivo e com maior importância epidemiológica (GRYSEELS et al. 2006). Enquanto a reprodução assexuada é realizada nos hospedeiros intermediários, isto é, moluscos da família Planorbidae e do gênero *Biomphalaria* (MODENA et al. 2008). No Brasil, há três principais espécies de planorbídeos que são encontradas infectadas naturalmente por *S. mansoni*: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea* (GRYSEELS et al. 2006).

As fezes eliminadas pelo hospedeiro definitivo infectado, contêm ovos maduros do parasito, que ao entrar em contato com a água (lagoas, rios ou riachos) induzem a eclosão dos miracídios (larvas ciliadas) (Figura 1). Em condições adequadas de temperatura e luminosidade, o miracídio em contato com o meio aquático, nada e penetra ativamente no hospedeiro intermediário, perdendo, em seguida, seus cílios. No hospedeiro intermediário, tem início então a reprodução assexuada, que dará origem à esporocistos, e posteriormente, a centenas e milhares de cercárias, as quais são liberadas no meio ambiente através de vesículas formadas no tegumento do molusco. Tal processo se inicia entre 4 e 6 semanas após a infecção (GRYSEELS, 2006). As cercárias, por sua vez, nadam e penetram ativamente no hospedeiro definitivo pela pele ou mucosa, através de movimentos vibratórios e da secreção de enzimas histolíticas (STIREWALT, 1974). Uma vez dentro do hospedeiro definitivo, as cercárias perdem a cauda, diferenciando-se em esquistossômulos, os quais entram na circulação sanguínea venosa e são transportados para o coração e pulmão, entrando então na circulação arterial. Posteriormente, os parasitos chegam ao sistema porta-hepático e migram para as veias mesentéricas, onde se transformam em vermes adultos, machos e fêmeas. Os adultos acasalam-se e migram para as veias mesentéricas inferiores, local onde ocorre a postura dos ovos.

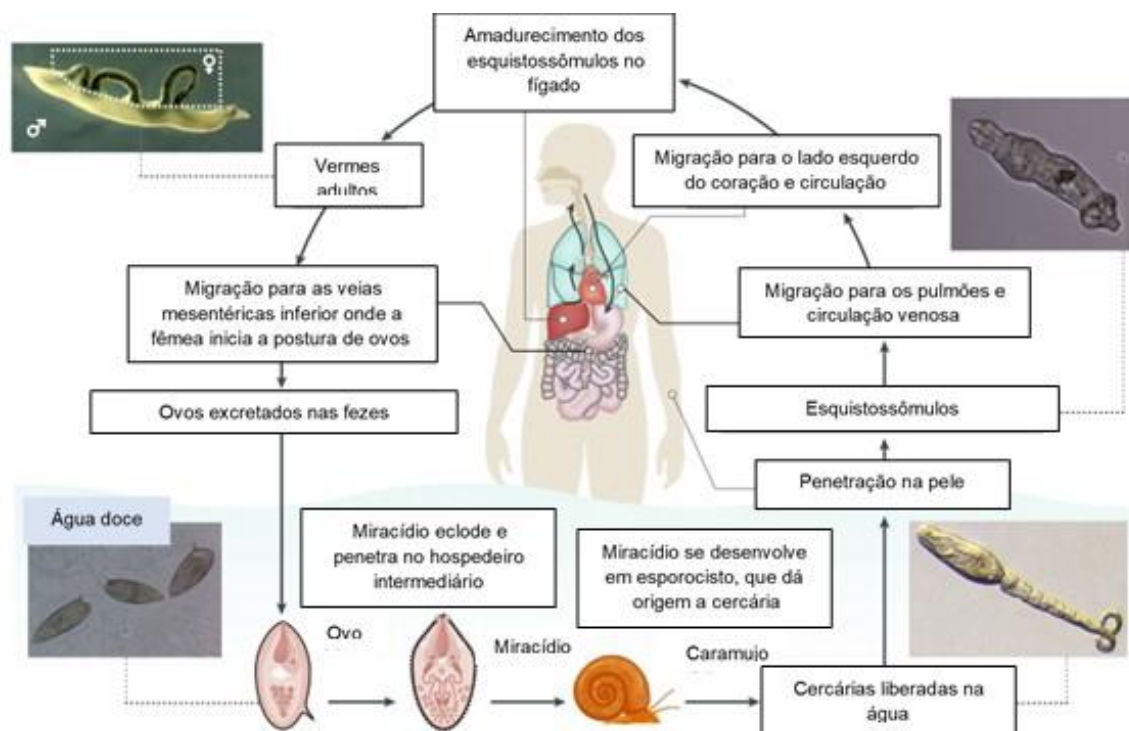


Figura 1 - Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Adaptado de McManus et al., 2018.

A fêmea de *S. mansoni* tem a capacidade de eliminar aproximadamente 400 ovos por dia, decaindo com o envelhecimento dos vermes, que vivem em média de 5 a 10 anos (FULFORD et al., 1995). Os primeiros ovos são encontrados nas fezes em torno de 40 dias após a infecção (DUNNE & COOKE, 2005; LENZI et al., 2008; SOUZA et al., 2011; COLLEY et al., 2014; MACMANUS et al., 2018) e cerca de 40% dos ovos depositados conseguem atravessar o epitélio intestinal, sendo eliminados para o meio ambiente juntamente com o bolo fecal. Os ovos que ficam retidos são carreados pela corrente sanguínea e podem aderir ao intestino, fígado ou outros órgãos. O acúmulo de ovos e a embolização tecidual, conduzem a uma intensa inflamação, diretamente relacionada aos antígenos secretados pelos miracídeos dentro dos ovos e a resposta imune do próprio hospedeiro definitivo, resultando na formação do granuloma esquistossomótico (PEARCE & MACDONALD, 2002; TURNER et al., 2011; CHUAH et al., 2014)

1.3. Manifestações clínicas

Os sintomas da fase aguda da infecção podem ser leves e passageiros, com a presença de febre, mal-estar geral, mialgia, dor de cabeça e sintomas intestinais. Esses sintomas podem ser confundidos com outras doenças de curso infeccioso e febril, como

a malária, salmonelose ou hepatites agudas. Após 2 a 10 semanas, esses sintomas podem desaparecer ou seguir para um perfil mais grave, com a presença de dispneia, diarreia, eosinofilia, indisposição, anorexia, dores abdominais, tosse, sudorese, disenteria, entre outros (CLERINX & VAN GOMPEL, 2011). A sintomatologia descrita acima, pode se manifestar após a exposição às cercárias ou aproximadamente um mês depois, com o início da eliminação dos ovos nas fezes. Contudo, a fase aguda pode ser pré-postural ou pós-postural (HYATT et al., 1979).

Com o passar do tempo, observa-se formas anatomoclínicas, denominadas hepatointestinal e hepatoesplênicas. A fase crônica da esquistossomose hepatointestinal, pode ser denominada como forma leve, devido à frequente benignidade da sintomatologia, podendo os pacientes apresentarem episódios de diarreia e frequente muco e/ ou sangue nas fezes (PEIXINHO et al., 1986; PRATA, 2001). A outra forma hepatoesplênica, é designada como o principal indicador de morbidade da esquistossomose, confirmada pelo aumento da fibrose no fígado, o que leva à hipertensão portal acentuada, endurecimento do baço e ao comprometimento da circulação com o desenvolvimento de varizes esofágicas (LAMBERTUCCI et al., 2005). Outras patologias incluem ascite, atraso no crescimento físico/cognitivo e anemia grave (STRAUSS, 2002). Esses sintomas são mais frequentes em adultos e adolescentes que vivem em áreas de alta transmissão da doença e em indivíduos com altas cargas parasitárias (VENNERVALD et al., 2004). Em relação às áreas endêmicas no Brasil, a maioria das pessoas infectadas apresentam geralmente a forma crônica leve, assintomáticas ou com sintomas bem discretos (CALDAS et al., 2008).

1.4. Diagnóstico da infecção por *Schistosoma mansoni*

O diagnóstico da esquistossomose se baseia na detecção de ovos nas fezes por diferentes métodos parasitológicos de fezes. O teste considerado como referência (WHO, 2009) é o método de Kato-Katz (K-K), que consiste na confecção de duas lâminas de fezes de uma amostra fecal, que são posteriormente analisadas por um microscopista experiente (KATZ et al., 1972). No entanto, apesar de ser recomendado pela OMS, esse método tem uma baixa sensibilidade para o diagnóstico de indivíduos em áreas endêmicas que estão na fase crônica da infecção e apresentam baixa carga parasitária (< 100 opg) ou para os casos de controle de cura após o tratamento (WHO, 2009; GRENFELL et al., 2013).

Diante das falhas existentes no teste de referência, vários autores buscam combinações de métodos que sejam específicos, mais sensíveis e que contribuam para minimizar a porcentagem de indivíduos não detectados (falso negativo). Entre os métodos avaliados encontra-se o Helmintex®, que utiliza 30 gramas de fezes por indivíduo (TEIXEIRA et al., 2007; FAVERO et al., 2017) e o Gradiente Salínico que purifica as fezes por meio de um fluxo contínuo e lento de solução concentrada de salina (COELHO et al., 2009), os quais apresentaram um bom desempenho em regiões de baixa endemicidade com populações de baixa carga parasitária, em comparação ao método de K-K (LINDHOLZ et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

Além dos testes parasitológicos, alguns estudos se baseiam em métodos imunológicos para detectar antígenos do parasito. No hospedeiro humano, o *S. mansoni* se alimenta dos glóbulos vermelhos e, posteriormente, regurgita produtos proteoglicanos conhecidos como antígeno circulante anódico (CAA – do inglês *circulating anodic antigen*) e antígeno circulante catódico (CCA – do inglês *circulating cathodic antigen*) (DEELDER et al., 1980; VAN DAM et al., 2015). Esses antígenos estão diretamente relacionados à intensidade da infecção (VAN LIESHOUT et al., 1995), e podem ser detectados no soro, plasma e urina dos indivíduos, pelos ensaios imunoenzimático (ELISA) e imunológico (POC-CCA® e POC-CAA®) (VAN DAM et al., 2013). O POC-CCA é um teste que vem sendo utilizado nas pesquisas em áreas endêmicas do Brasil, juntamente com o teste de referência K-K, por ser um teste de fácil aplicabilidade em campo e rapidez no diagnóstico. Além disso, acredita-se que pode ser um importante teste de triagem na detecção de infecções ativas (com a presença do parasito vivo), bem antes da presença dos ovos nas fezes (VAN DAM et al., 1996; VAN DAM et al., 2004). O uso do antígeno circulante confirma uma excelente ferramenta na epidemiologia da esquistossomose, porém, deve-se questionar esses diagnósticos quando se trata de pacientes com poucos parasitos e em infecções crônicas (ROSS et al., 2007).

A sorologia também é uma importante ferramenta na detecção de anticorpos contra os antígenos, porém, não consegue diferenciar infecções atuais ou passadas em áreas endêmicas para a esquistossomose, onde a população tem constante exposição e permanecem soropositivas por muitos anos, após o tratamento (DOENHOFF et al., 2004).

Por sua vez, a reação de cadeia da polimerase (PCR) é um teste muito sensível, que visa a detecção do DNA do parasito nas fezes dos pacientes infectados, entretanto,

devido o seu preço elevado, esse método não pode ser empregado no diagnóstico em locais com recursos limitados (MEURS et al., 2015).

Outra linha de pesquisa promissora é a procura por biomarcadores para infecções agudas, crônicas ou casos clínicos graves das esquistossomoses. Estas pesquisas incluem, por exemplo, diferentes marcadores de fibrose hepática e/ou indicadores anatomopatológicos induzidos pela infecção por *S. mansoni* e *S. haematobium* (RAMAROKOTO et al., 2014; WEERAKOON et al., 2015).

O estudo da resposta imune, bem como da interação parasito/hospedeiro e de seus compostos (proteínas, citocinas, quimiocinas, anticorpos, moléculas), podem fornecer análises promissoras de potenciais biomarcadores para infecções graves e/ou assintomáticas, das diferentes espécies de *Schistosoma* spp (ONILE et al., 2017; ADEBAYO et al., 2018; CASTRO et al., 2018; SILVA- MORAES et al., 2019).

1.5. Resposta imunológica durante a infecção por *S. mansoni*

A partir das primeiras 12 horas após a penetração das cercárias, uma intensa inflamação acontece na epiderme e na derme, com alguns indivíduos desenvolvendo uma dermatite cercariana, devido à hipersensibilidade mediada por IgE e outros componentes da resposta imune, tais como: leucócitos polimorfonucleares, mononucleares e células de Langerhans, sendo a primeira barreira inata.

Recentemente, uma população celular denominada de células linfoides inatas (ILC1, ILC2, ILC3) foi descoberta, as quais desempenham um papel importante nos tecidos não linfoides, como pulmão, pele, fígado e tecido adiposo. Embora apresentem funções efetoras, essas células dependem do sinal de outras células para interpretar os sinais do ambiente (ARTIS et al., 2015; MORTHA & BURROWS, 2018). Dessa forma, na infecção por *S. mansoni*, as ILC2 podem interagir com as células TCD4⁺ e ativar, principalmente, as citocinas chamadas alarminas, como IL-33, IL-25 e TSLP, que começam a induzir a produção das citocinas IL-5 e IL-13 (FALLON & SCHWARTZ, 2018). Esse processo efetua o recrutamento de eosinófilos e macrófagos que produzem IL-13, IL-5 e IL-9 (HUANG & PAUL, 2015).

A ampliação da resposta imune celular, perante a entrada de cercárias e/ou esquistossômulos, promove o aumento de células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos, células dendríticas e de marcadores de ativação MHC classe II e CD86 (HOGG et al., 2003; MOUNTFORD et al., 2004; KUMKATE et al., 2007). As APCs

possuem um mecanismo molecular responsável pela inibição da resposta imune adaptativa, nos modelos murinos e seres humanos, chamado de ligante de morte programada (PDL-1), uma importante proteína e marcador regulatório que é responsável pela supressão da resposta imune e/ou tolerância imunológica. Com a presença de antígenos do parasito no organismo, ocorre a proliferação de células T auxiliares, e a anergia promovida pelo ligante PDL-1 (KEIR et al., 2008; FRANCISCO et al., 2009). Recentemente, Winkel e colaboradores (2018) analisaram pela primeira vez, a capacidade de cercárias atenuadas e não-atenuadas penetrarem na pele humana. Esse estudo demonstrou que a invasão das cercárias de *S. mansoni* não atenuadas desencadeou um aumento da expressão de PDL-1, PDL-2 e IL-10 em células dendríticas da pele, o que foi registrado em menor frequência na infecção por cercárias atenuadas.

Com a migração dos esquistossômulos até a maturação dos vermes adultos, que acontece entre 28 a 30 dias após a infecção (SOUZA et al., 2011), ocorre o aumento na produção de citocinas da resposta do tipo 1, como IFN- γ ; IL-2; IL-12; TNF- α ; IL-1 β ; IL-6 e da quimiocina CCL3/MIP-1 α (SILVEIRA et al., 2004; GRYSEELS et al., 2006; JENKINS et al., 2007; CALDAS et al., 2008), assim como o aumento de anticorpos específicos de IgM no início e, posteriormente, das imunoglobulinas IgG e IgA contra o parasito (RABELLO et al., 1997; LAMBERTUCCI, 2010; ALLEN & MAIZELS., 2011; LUNDY & LUKACS, 2013). No entanto, essa resposta pode provocar surtos de necrose, arterite e hepatite aguda. No curso da infecção por *S. mansoni* ocorre uma resposta imune inicialmente chamada tipo 1 mediada por linfócitos T auxiliares, cuja função é eliminar o parasito (PEARCE & MACDONALD, 2002). Essa resposta é caracterizada pela polarização a partir da citocina IL-12 produzidas pelas células inatas, as quais irão induzir e aumentar a produção de IFN- γ e TNF- α por essas mesmas células, além de estimular fagócitos microbicidas com a produção de óxido nítrico (NO) e a formação de células gigantes multinucleadas

Com o passar do tempo, dá-se início à fase postural, na qual os ovos do parasito, juntamente com os antígenos produzidos pelo mesmo, são os principais causadores das reações inflamatórias e lesões (granulomas), desencadeando uma resposta inflamatória intensa através do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, (PAMPs) (SMITHERS et al., 1982; PEARCE et al., 1991; LUKACS & BOROS, 1993; STADECKER et al., 2004; CASS et al., 2007; CALDAS et al., 2008; HAEBERLEIN et al., 2017). O primeiro estágio do granuloma acontece na fase aguda e a sua formação é

dependente de moléculas de adesão celular (ICAM-1), com predominância de citocinas do tipo 1 e células como eosinófilos, linfócitos, neutrófilos e células gigantes multinucleadas. Após a fase aguda e início da fase crônica, o granuloma diminui de tamanho, ocorrendo uma imunomodulação (SMITHERS et al., 1982; PEARCE et al., 1991) e as células naturais Killer e células dendríticas produzem a citocina regulatória IL-10, que, por sua vez, inibe os níveis de IL-12 e aumentam a resposta do tipo 2 (OLIVEIRA et al., 2006). Os linfócitos encontrados nos granulomas são específicos para o antígeno SEA, e possuem marcadores de ativação celular CD69 e IL-2R, que produzem IL-2, IL-4 e INF- γ (WANG et al., 1992). Trabalho de Jakubzick e colaboradores (2004), demonstraram que a neutralização de CCL17/TARC e CCL22 resulta em um menor grau de fibrose. Os pacientes com manifestação crônica da doença apresentaram altos níveis de CCL-3/MIP-1, CCL5/RANTES e CCL24.

As imunoglobulinas também interferem na modulação do granuloma. A IgG1 é observada na fase crônica leve da infecção, entretanto, as IgG2, IgG3 e IgG4 são encontradas nos casos crônicos mais graves, enquanto a IgE é encontrada na fase aguda e crônica e tem papel protetor na esquistossomose (ROTTMAN, 1999; FALCÃO et al., 2002).

O desenvolvimento da imunidade do tipo 2 é direcionado por um conjunto de células de defesa que desempenham várias funções, além do aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-13 (SMITHERS et al., 1982; PEARCE et al., 1991). Para suprimir e modular a resposta imune do tipo 1, é necessário a presença de macrófagos alternativamente ativados (AAMs), que são dependentes de uma imunomodulação gradativa durante a fase crônica da infecção para a resposta do tipo 2 (VANNELLA et al., 2014). De'Broski e colaboradores (2004), revelaram que camundongos deficientes de $LysM^{cre} IL-4^{-/flox}$ e camundongos deficientes de $IL-4^{-/-}$, ambos com deficiência na ativação de macrófagos alternativamente ativados (AAMs) e com uma maior capacidade de ativação de macrófagos classicamente ativados (CAMs) na produção de (iNOS2). Os autores observaram que camundongos selvagens tinham maiores concentrações de arginase e menores granulomas hepáticos, comparados com ambos os camundongos deficientes. Da mesma forma, foi observado em outro estudo a ocorrência de lesões hemorrágicas na mucosa intestinal em camundongos Arg-1, o que não ocorreu em camundongos selvagens. Esses achados demonstraram a importância dos AAMs na esquistossomose intestinal, pois, a ausência da Arg-1 exacerba a resposta do tipo 1 (CHIARAMONTE et

al., 1999; DE'BROSKI et al., 2010). Portanto, a presença dessas células é primordial para o sucesso no controle e reparação dos tecidos durante a infecção (RANI et al., 2012; GORDON & MARTINEZ, 2010; NASCIMENTO et al., 2014). Outra importante célula de defesa são os eosinófilos, os quais têm a capacidade de eliminar o parasito através de grânulos como peroxidase de eosinófilos (EPO), a proteína básica principal (MBP), a neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) e a proteína catiônica eosinofílica (ECP) (BEHM & OVINGTON, 2000). Masure e colaboradores (2013) relataram que os eosinófilos são células de defesa contra larvas de *Ascaris suum*. Outros modelos de helmintos contribuíram para confirmar o papel protetor dos eosinófilos, incluindo *Strongyloides stercoralis* (GALIOTO et al., 2006), *Nippostrongylus brasiliensis* (HOLMES et al., 2015) e *Heligmosomoides polygyrus* (HEWITSON et al., 2015). Entretanto, nas infecções por *Toxocara canis* e *Trichinella spiralis*, o papel protetor dos eosinófilos não foi confirmado (ROCKEY et al., 1983). Embora estudos confirmem o papel crucial dos eosinófilos na proteção contra alguns helmintos, os grânulos liberados por eles podem causar lesões nos tecidos do hospedeiro (GLEICH et al., 1979; KLION & NUTMAN, 2004; NAIR et al., 2005; GAUSE et al., 2013; DATE et al., 2014).

Recentemente foram descobertas outras subpopulações de células TCD4+, que poderiam estar ligadas à resposta imune na infecção por *S. mansoni*, sendo denominadas células do tipo Th9 (VELDHOEN et al., 2008; KAPLAN, 2013) e Th17 (BETTELLI et al., 2007; KORN et al., 2009; ZHU et al., 2010). Alguns estudos com modelos murinos mostraram que na infecção por *S. japonicum*, os camundongos infectados apresentaram um aumento na expressão de IL-9 por células Th9 no fígado e no soro (ZAHN et al., 2017), e que a mesma citocina poderia estar envolvida na imunopatologia murina (LI et al., 2017). Em humanos, a investigação sorológica de IL-9, mostrou não haver diferenças em pacientes na fase aguda ou crônica da infecção por *S. mansoni* (MATOS et al., 2016). Apesar da IL-9 estar envolvida nas infecções helmínticas, poucos são os estudos que analisaram o papel da Th9 em doenças parasitárias em humanos (LI et al., 2011; TUXUN et al., 2015).

Em relação à Th17, a neutralização pelo anticorpo anti-IL-17A em tratamento com modelo murino, mostrou uma inibição na inflamação do granuloma hepático (RUTITZKY et al., 2005). Também foi analisada a função das citocinas IL-17A e INF- γ na imunopatologia da esquistossomose, com a utilização de camundongos depletados de uma ou de ambas, sendo demonstrado que camundongos com deficiência da citocina IL-

IL-17A apresentaram uma imunopatologia significativamente reduzida com a combinação dos níveis aumentados de INF- γ . Entretanto, camundongos deficientes de INF- γ , apresentaram uma patologia acentuada, com o aumento dos níveis da citocina IL-17 A. Esses resultados mostraram que a IL-17 A é uma poderosa citocina inflamatória na patologia da esquistossomose murina (RUTITZKY et al., 2008; RUTITZKY et al., 2011). Desta forma, foi demonstrado que as citocinas IL-23, IL-1 β e IL-17 desempenham um papel importante nas patologias graves das esquistossomoses (SHAINHEIT et al., 2011).

Por fim, na fase mais tardia da esquistossomose mansoni, observa-se o aumento dos níveis de citocinas regulatórias como TGF- β e IL-10, as quais têm a capacidade de diminuir a inflamação causada pelas respostas tipo Th1, Th2, Th9 e Th17 (DUNNE & COOKE, 2005; TAYLOR et al., 2012). Essa adaptabilidade relacionada aos helmintos, principalmente ao *S. mansoni*, promove a indução de células regulatórias, como as células B regulatórias, importantes grupos de células que minimizam a inflamação (AMU et al., 2010). Variedades de células como os basófilos, células NK, células T, células B, células dendríticas, mastócitos e macrófagos, expressam o ligante CD40, o qual induz a expressão de IL-10 por células B, o que leva a um estado de hiporresponsividade imunológica (MAURI et al., 2003; YANABA et al., 2008; MION et al., 2014; ROSSER & MAURI, 2015; MENON et al., 2016 ;). Mais detalhes sobre a resposta imune na infecção por *S. mansoni* são mostrados nas figuras 2 e 3.

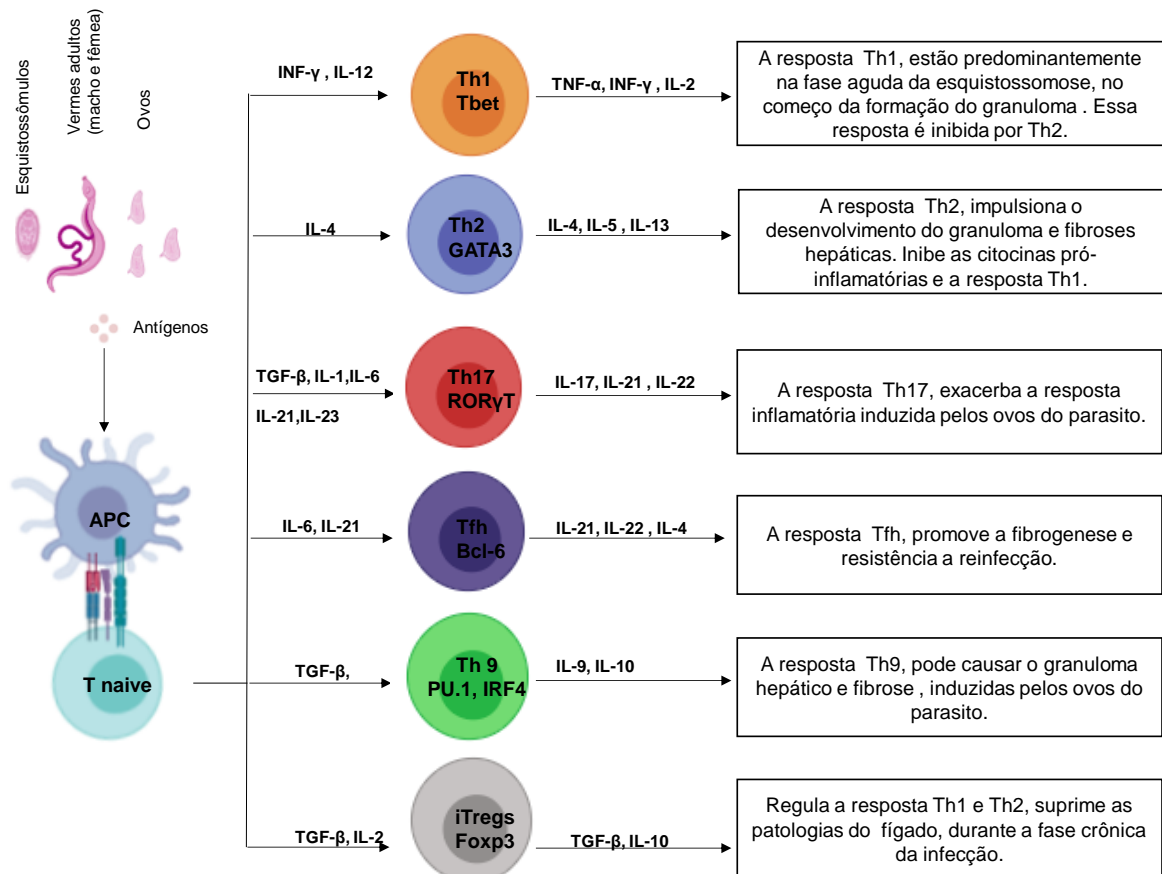


Figura 2- Heterogeneidade de linfócitos TCD4⁺ na imunopatologia em modelos murinos na infecção por *Schistosoma* spp. Adaptado de Zheng et al., 2020.

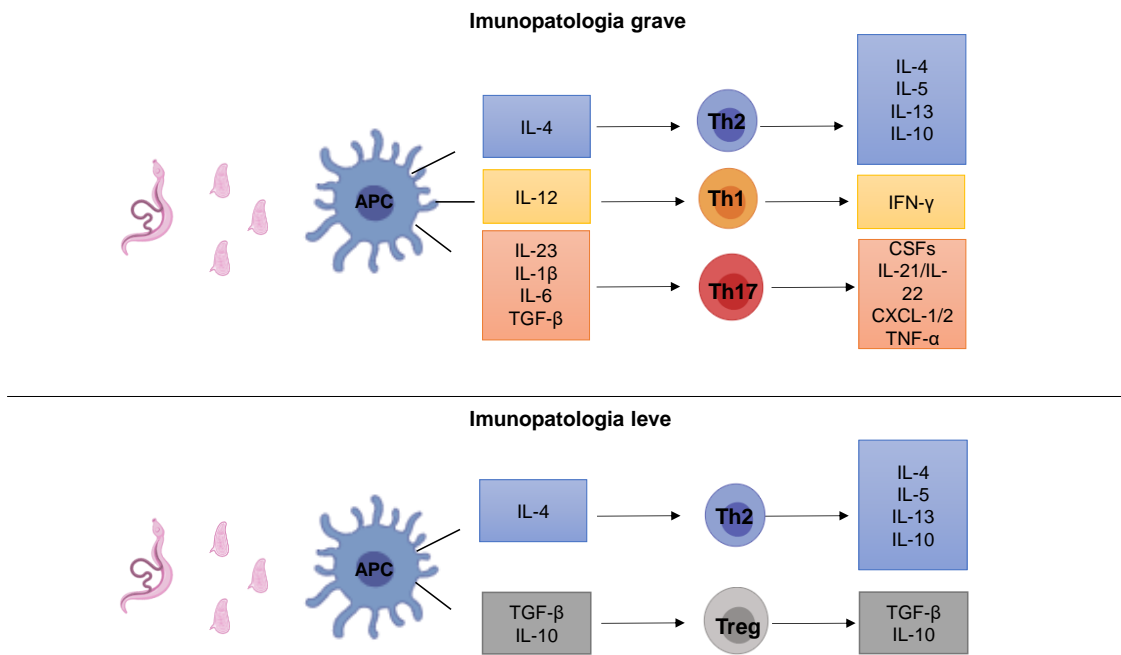


Figura 3 - Resposta imunológica nas patologias causadas por *Schistosoma mansoni*. Fonte: Adaptado de Larkin et al., 2012.

2. Justificativa

A esquistossomose é uma importante doença parasitária humana que acomete populações residentes em países tropicais e em desenvolvimento (HOTEZ et al., 2009).

No Brasil, as ações de controle e vigilância, mudanças no aspecto social e econômico da população, além do tratamento com quimioterápico rotineiro, diminuíram a prevalência e a mortalidade da esquistossomose. Entretanto, essas características favoreceram o aumento de áreas de baixa e média endemicidade, com populações que apresentam uma baixa carga parasitária na infecção por *S. mansoni* (COURA et al., 2004; MARTINS et al., 2014). Por conseguinte, indivíduos dessas populações, podem erroneamente ser considerados ovo-negativo, pelo método de diagnóstico de referência, Kato-Katz (BERHE et al, 2004; TEIXEIRA et al., 2007; ENK, 2008).

Além disso, indivíduos residentes de área endêmica, principalmente os que albergam baixas cargas parasitárias, apresentam uma resposta imune adaptativa predominantemente do tipo 2, com o aumento da ativação de eosinófilos e a produção de imunoglobulina IgE (CALDAS et al., 2000; CALDAS et al., 2008). Dessa forma, devido à anos de exposição aos antígenos do parasito, tratamentos consecutivos e reinfecções, tais indivíduos adquirem uma resposta imune que confere uma certa proteção, sendo considerados assintomáticos, ou seja, sem a gravidade da doença (BLACK et al., 2010).

Portanto, embora o paradigma da resposta Th1/Th2 na infecção por *S. mansoni* seja bem documentado, o envolvimento da resposta Th9 e Th17 em indivíduos com baixas cargas parasitárias, ainda necessita ser elucidado. Nesse contexto, o presente trabalho busca determinar o perfil fenotípico de linfócitos TCD4+ em indivíduos com baixa carga parasitária em relação aos mecanismos de ativação/inflamação/regulação, que possam diferenciá-los de indivíduos ovo-negativos.

Hipótese: A resposta imune adaptativa avaliada em subpopulações de células TCD4+ em crianças e adolescentes com baixa carga parasitária na infecção por *S. mansoni* induz a uma resposta regulatória e diferenciada de indivíduos ovo negativos de área endêmica.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Analisar e caracterizar a resposta imune humoral e celular frente ao antígeno solúvel do verme adulto de *S. mansoni* (SWAP), em indivíduos com baixa carga parasitária, em comparação à indivíduos ovo-negativos, em busca de marcadores imunológicos, que possam indicar a presença do parasito.

A tese está dividida em três Capítulos:

Capítulo 1- Análise descritiva de crianças e adolescentes residentes em área endêmica para a esquistossomose mansoni.

Capítulo 2- Marcadores hematológicos, citocinas plasmáticas e resposta imune humoral nos diferentes grupos de crianças e adolescentes, antes e após o tratamento com o quimioterápico praziquantel.

Capítulo 3- Resposta imune celular *in vitro* nos diferentes grupos de crianças e adolescentes, antes e após o tratamento com o quimioterápico praziquantel.

Capítulo 1

Análise descritiva de crianças e adolescentes residentes em área endêmica
para a esquistossomose mansoni

Objetivos específicos:

- Descrever e analisar fatores socioeconômicos, comportamentais e antropométricos em indivíduos dos grupos ovo negativos da área endêmica (NE), ovo positivos de baixa carga parasitária (CB) e ovo positivos de média a alta carga parasitária (CMA), para determinar as características favoráveis para adquirir a infecção por *Schistosoma mansoni*;
- Classificar os indivíduos ovo positivos pela carga parasitária: CB (<100 opg) e CMA (\geq 100 opg).

4. Materiais e métodos:

4.1. População e área de estudo - Capítulo 1

O estudo foi realizado no município de Januária (MG), situado no Norte do estado, a 600 km de Belo Horizonte (Figura 4). Em Januária, os locais selecionados para a realização do estudo foram escolas municipais e estaduais localizadas nos distritos/localidades de Brejo do Amparo, Riacho da Cruz, Pandeiros, Alegre, Barreiro, Pindaibal, São Joaquim e Ovo D-ema.

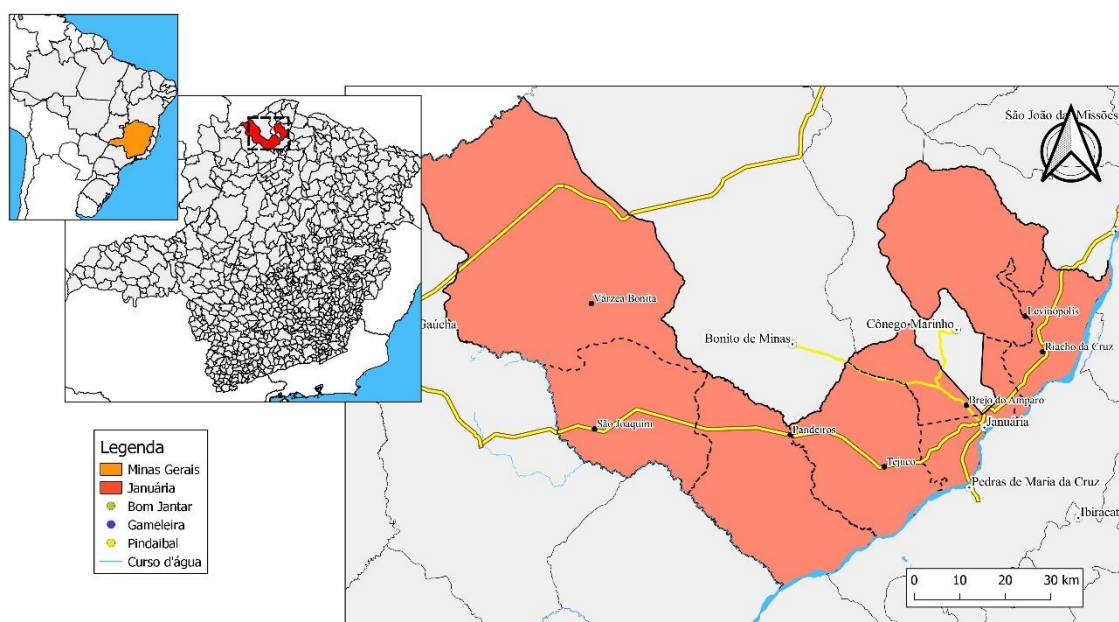


Figura 4 - Mapa da localização do Estado de Minas Gerais (laranja). A localização do município de Januária no Norte do estado de Minas Gerais (vermelho) e o mapa da extensão de Januária, com os distritos e localidades. Fonte: Cardoso, 2018.

Nas escolas, inicialmente foram realizadas palestras educativas para explicar a importância da doença e as medidas profiláticas. Em seguida, exames parasitológicos de fezes, pelo método de Kato-Katz, e exames de urina, com POC-CCA para antígeno circulante de *S. mansoni*, foram realizados em 2.000 crianças e adolescentes, com idade entre 06 e 19 anos, estudantes do Ensino Fundamental e Médio. Dentre as crianças testadas, 47 indivíduos positivos e 29 negativos em ambos os testes foram selecionados para participar da pesquisa, nos quais também foi aplicado um questionário e realizada a coleta de sangue para os hemogramas e ensaios imunológicos.

Dos 47 indivíduos positivos, nove apresentaram resultados discrepantes em seus exames, isto é, K-K negativo e POC-CCA positivo, os quais foram incluídos apenas no

mesmos, juntamente com os pais ou guardiões, assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 4).

4.3. Questionário

O questionário (Apêndice A) utilizado foi elaborado tendo como base o estudo de Gazzinelli e colaboradores (2006). Com o documento foram coletados os dados antropométricos, socioeconômicos e comportamentais dos participantes da pesquisa, juntamente com os aspectos ambientais em que estão inseridos, e as características da doença na área de estudo.

4.4. Obtenção do material biológico e métodos de diagnóstico da esquistossomose

Para a realização do teste de Kato-Katz foi utilizado o Kit Helm Test (Biomanguinhos, Rio de Janeiro – RJ). Cada participante recebeu três frascos coletores, para a coletarem as fezes em três dias alternados. No total, foram confeccionadas seis lâminas de Kato-Katz por indivíduo (duas lâminas de cada amostra fecal). Para a confecção das lâminas, as fezes foram homogeneizadas e colocadas sobre uma tela, onde com o auxílio de uma espátula, foi realizado o esfregaço das fezes. Em seguida, foi colocada uma lamínula que contém a solução diafanizadora, que possibilita a preservação da amostra e facilita a observação dos ovos (Figura 6). Após a secagem, por no mínimo 60 minutos, as lâminas foram analisadas para a avaliação da presença e a contagem dos ovos de *S. mansoni* e outros possíveis helmintos. A análise quantitativa da carga parasitária de cada indivíduo, expressa em ovos por grama de fezes (opg), foi calculada pela média do número de ovos obtidos nas seis lâminas de Kato-Katz, multiplicadas por 24.

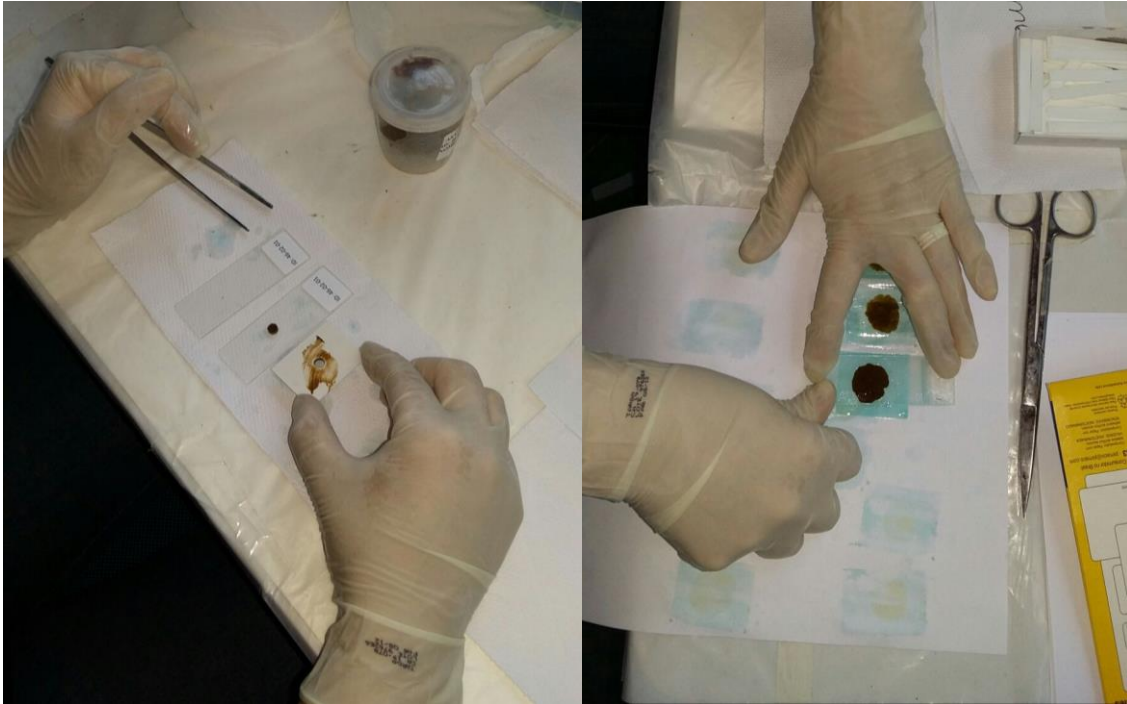


Figura 6 - Confecção das lâminas de Kato-Katz. Fonte: fotografia da autora.

4.5. Teste rápido para detecção de antígeno catódico circulante de *S. mansoni* (POC-CCA)

O POC-CCA (POC-CCA5: lote # 201806011-01 / 2020) é um teste rápido que avalia a infecção ativa da doença causada por *S. mansoni*, sendo o CCA (antígeno catódico circulante) um dos principais antígenos regurgitados pelo verme adulto. Para este teste foram usadas amostras da primeira urina do dia, as quais foram armazenadas em temperatura ambiente. Após a homogeneização, duas gotas da amostra, foram depositadas no cassete com o auxílio de uma pipeta plástica descartável, e após 20 minutos foi realizada a análise visual do resultado, através do sinal de reagente e não reagente. No cassete primeiramente observa-se a linha controle (C), cuja presença é importante para atestar o funcionamento do teste, e passados os 20 minutos, se a linha teste (T) aparecer, o resultado é considerado reagente, ou seja, positivo para a infecção por *S. mansoni*, e caso não apareça, o resultado é dado como não reagente, ou seja, negativo para a infecção por *S. mansoni* (Figura 7).



Figura 7 -Teste rápido de urina POC-CCA (teste de antígeno catódico circulante) para detecção da esquistossomose mansoni em duas amostras de urina. O cassete da esquerda é considerado negativo ou não-reagente e o da direita considerado positivo ou reagente. Fonte: fotografia da autora.

4.6. Análise de dados

Para determinar a normalidade dos dados o teste usado foi de Kolmogorov-Smirnoff. Nos dados com a distribuição normal, usou-se a análise de variância (ANOVA), seguida do teste Benferroni, para a análise das diferenças médias entre os grupos estudados. Para dois grupos o teste usado foi o T pareado e não pareado. Nos dados não paramétricos usou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguindo o teste de Dunn's, para detectar as diferenças entre as medianas dos diferentes grupos, Mann Whitney para dois grupos e Wilcoxon pareado e correlação de Spearman, com nível de significância estabelecido em $p \leq 0,05$. Para a avaliação nutricional por antropometrias indicadores utilizados foram a estatura, peso e índice de massa corporal (IMC), como recomendado pela OMS (DE ONIS et al, 2004). Da mesma maneira foram obtidos os escores z conforme recomendação da OMS (WHO, 1995), a saber: normal (≥ -2 a $\leq +1$); déficit nutricional ($z < -2$) e excesso nutricional ($z \geq + 2$). Para a análise dos dados antropométricos foi usado o software, Anthroplus da OMS (2005) (<http://www.who.int/childgrowth/software/en/>).

O ponto de corte dos ensaios de ELISA indireto foi determinado a partir da análise da curva ROC (Reiceived Opperating Curve), para a obtenção de valores de sensibilidade e especificidade que permitisse classificar os resultados do teste como positivos e negativos.

A análise da citometria de fluxo foi realizada utilizando o software Flowjo 10.1 para dados qualitativos e GraphPad Prism 8 para os dados quantitativos. Para as análises multivariadas, o software ClustVis foi utilizado para a obtenção de Análise de componente principal, com um intervalo de confiança de 95%.

5. Resultados:

5.1. Parte descritiva da população

Nos 29 indivíduos do grupo NE, a média de idade foi de $14,52 \pm 3,16$ anos, sendo 14 (48,3%) do sexo masculino e 15(51,7%) do sexo feminino. No grupo Infectado a média de idade foi de $12,59 \pm 2,61$ anos, sendo 22 (46,8%) do sexo masculino e 25 (53,2%) do sexo feminino. Na análise quantitativa de K-K, observou-se que a mediana da carga parasitária dos indivíduos positivos foi de 48 opg com intervalos interquartis entre 12 e 120 opg (Tabela 1). Entre a carga parasitária, idade e sexo dos participantes, não foi encontrada nenhuma correlação.

Tabela 1 - Caracterização dos indivíduos residentes no Norte de Minas Gerais, Município de Januária-Brasil.

Caracterização	Grupos	
	NE n = 29	Infectado por <i>S. mansoni</i> n= 47
Sexo		
Homens /mulheres (n)	14 /15	22/ 25
%	48,3% / 51,7%	46,8 % / 53,2%
Idade Média \pm DP *	14,52 \pm 3,16	12,59 \pm 2,61
Opg** Mediana (IQR)***	****	48 (12/ 120)

* Desvio padrão
** ovos por grama de fezes
*** interquartis (25,75)
**** sem infecções pelos métodos de Kato-Katz e POC-CCA

5.2. Questionário: fatores socioeconômicos e comportamentais

Em relação à escolaridade do pai/mãe ou responsável, verificou-se que a maioria é analfabeta e/ou com ensino fundamental incompleto, e tratando-se de uma população da zona rural e naturais do local. Além disso, mais de 90% dos indivíduos receberam algum auxílio do governo ou trabalharam informalmente.

As características do domicílio têm como maior frequência as paredes de alvenaria e teto de telha. No grupo NE, a residência de 48,3% dos entrevistados tinha piso sem cerâmica e 51,7% com cerâmica. Por outro lado, no grupo Infectado, o inverso foi

observado, com 59,6% dos entrevistados possuindo piso sem cerâmica e 40,4% piso com cerâmica. Em ambos os grupos, a mãe era responsável pela manutenção da residência (Tabela 2). Não foi encontrada diferenças significativas entre os dados descritos acima.

Tabela 2 - Caracterização dos indivíduos quanto à sua escolaridade, trabalho do responsável e da estrutura de seu domicílio (parte interna).

Variáveis	Grupos		<i>p</i> ¹
	NE n = 29 n (%)	Infectado por <i>S. mansoni</i> n= 47 n (%)	
<i>Escolaridade do pai/mãe</i>			
Fundamental completo e acima	8 (27,6)	6 (12,8)	0,13
Analfabeto e fundamental incompleto	19 (65,5)	39 (83)	
Não sabe	2 (7)	2 (4,2)	
<i>Perímetro</i>			
Rural	29 (100)	43 (91,5)	0,29
Urbano	0	4 (8,5)	
<i>Há quanto tempo a família reside no local</i>			
> 12 meses	28 (96,5)	47 (100)	0,37
< 12 meses	1 (3,4)	0	
<i>Trabalho do provedor de casa</i>			
Carteira assinada	1 (3,4)	4 (8,5)	0,64
Sem carteira assinada (bolsa família, bico)	28(96,6)	43 (91,5)	
<i>Parede</i>			
Alvenaria	29 (100)	43 (91,5)	0,29
Não Alvenaria	0	4 (8,5)	
<i>Teto</i>			
Telha	18 (62)	42 (89,4)	0,2
Não telha (Amianto, lajes)	10 (34,5)	5 (10,6)	
Não sabe	1 (3,4)	0	
<i>Piso</i>			
Cerâmica	15 (51,7)	20 (40,4)	0,64
Sem cerâmica	14(48,3)	27 (59,6)	
<i>Quem cuida da casa – Higiene/Alimentos</i>			
Mãe	26 (89,7)	44 (93,6)	0,69
Outros	3 (10,3)	3 (6,4)	

¹ Teste Fisher's

O número de membros da casa foi semelhante nos dois grupos, sendo a mediana 5 e interquartil (4/6). Em relação ao número de cômodos na casa o grupo NE foi de mediana 6 e interquartil de (5/6) e o grupo Infectado de mediana de 5 e interquartil de (4/6), sem diferenças significativas (Tabela 3).

Tabela 3- Variáveis contínuas relacionadas ao número de membros e cômodos de cada residência

Variáveis	Grupos		valor p^1
	NE n = 29	Infectado por <i>S. mansoni</i> n= 47	
	Mediana (Interquartis)		
<i>Número de membros da casa</i>	5 (4/ 6)	5 (4/ 6)	0.9
<i>Número de cômodos da casa</i>	6 (5/ 6)	5 (4/ 6)	0.7

1- Teste Mann Whitney, com significância de * $p \leq 0.05$

Em relação ao peridomicílio, 24,1% dos entrevistados pertencentes ao grupo NE possuíam horta em casa e no grupo Infectado esse valor foi superior 59,6%, havendo diferença significativa entre ambos os grupos ($p = 0,0004$). Quanto à origem da água para consumo, todos os indivíduos do grupo NE tinham acesso à água limpa e/ou tratada, diferentemente do grupo infectado, em que apenas 59,6% tinham água tratada disponível em suas residências ($p=0,0001$), além de morarem mais perto de coleções hídricas em comparação ao grupo NE ($p=0,0001$). As instalações sanitárias nas residências de 96,6% dos entrevistados do grupo NE eram completas com privada e descarga e para 86,2% o banheiro era no interior dos domicílios. No grupo Infectado, observou-se um menor percentual de indivíduos com instalações sanitárias completas e que possuíam banheiro dentro da residência, 76,6% e 57,4% respectivamente, e para ambas as características foi encontrada diferença significativa entre grupo NE e infectado (instalação completa: $p=0,02$; banheiro em casa: $p=0,007$). Por outro lado, foi encontrada uma maior porcentagem de residências com esgoto a céu aberto nos indivíduos do grupo NE (55,2%), enquanto apenas 36,1% dos indivíduos do grupo Infectado possuíam residências com essa característica. Entretanto, em ambos os grupos, o destino do lixo tem maior frequência a céu aberto (Tabela 4).

Tabela 4 - Característica do peridomicílio, água para consumo e instalações sanitárias dos indivíduos do estudo.

Variáveis	Grupos		p ¹
	NE n = 29 n (%)	Infectado por <i>S. mansoni</i> n= 47 n (%)	
Possuem horta em casa			
Sim	7 (24,1)	28(59,6)	0,0004
Não	22 (75,9)	19 (40,4)	
Origem da água para consumo			
Água limpa e/ou tratada (Mina, Poço artesiano, torneira publica, encanada ou copasa)	29(100)	28 (59,6)	0,0001
Água não tratada (rio, açude, cisterna, córrego)	0	19 (40,4)	
Tempo gasto a pé até a coleção hídrica			
> 15 min	20 (68,9)	20 (42,5)	0,0001
< 15 min	2 (6,9)	26 (55,3)	
Não sabe	7 (24,1)	1 (2,1)	
Falta água na casa			
Sim	8 (27,6)	17 (36)	0,45
Não	21 (72,4)	29 (61,7)	
Não sabe	0	1 (2,1)	
A casa possui reservatório de água			
Sim	29 (100)	45 (95,7)	0,52
Não	0	2 (4,3)	
Tipo de instalação sanitária			
Privada com água e descarga	28 (96,6)	36 (76,6)	0,02
Privada com fossa seca (com assento no chão ou não tem banheiro)	1(3,4)	11 (23,4)	
Localização da instalação sanitária			
Dentro da residência	25 (86,2)	27 (57,4)	0,007
Fora da residência	3 (10,3)	19 (40,4)	
Não sabe	1 (3,4)	1 (2,1)	
Destino do esgoto			
Via pública canalizada	11 (37,9)	27 (57,4)	0,14
Céu aberto	16 (55,2)	17 (36,1)	
Não sabe	2 (6,9)	3 (6,4)	
Destino do lixo da casa			
Coleta pública	2 (6,9)	9 (19,2)	0,19
Céu aberto	27 (93,1)	38 (80,8)	

¹ Teste Fisher's

As respostas dos indivíduos que não souberam responder (viés de memória e/ou viés de informação) não foram usadas nas análises.

Para a avaliação dos participantes em relação à higiene pessoal e alimentação, observou-se que o grupo NE tem uma frequência significativamente maior de higienização das mãos em comparação aos indivíduos Infectados ($p=0,006$). As variáveis andar descalço fora de casa, brincadeiras feitas em coleções hídricas (córrego, riachos e lagoas) e comer alimentos crus sem lavar foram mais frequentes no grupo Infectado em comparação ao NE ($p=0,006$, $p=0,0001$, $p=0,0001$, $p=0,03$, respectivamente), conforme demonstrado na (Tabela 5).

Tabela 5- Características dos indivíduos em relação à higienização pessoal e alimentação.

Variáveis	Grupos		p^1
	NE	Infectado por <i>S. mansoni</i>	
	n = 29 n (%)	n= 47 n (%)	
<i>Lava as mãos</i>			
Sim	17 (58,6)	6 (12,8)	0,006
Não	12 (41,4)	41 (87,2)	
<i>Costuma andar descalço fora de casa</i>			
Sim	8 (27,6)	38 (80,9)	0,0001
Não	21 (72,4)	9 (19,1)	
<i>Brinca em córregos, riachos, lagoas</i>			
Sim	5 (17,2)	37 (78,7)	0,0001
Não	24 (82,8)	10 (21,3)	
<i>Vegetais consumidos crus sem lavar</i>			
Sim	15 (51,7)	10 (21,3)	0,03
Não	14 (48,3)	37 (78,7)	
<i>Gosta de comer carne</i>			
Sim	29 (100)	44 (93,6)	0,29
Não	0	3 (6,4)	
<i>Como voce gosta da carne</i>			
Bem passada	27 (93,1)	43 (91,5)	
Mal passada	1 (3,4)	1 (2,1)	0,99
Não sabe	1 (3,4)	3 (6,4)	

¹ Teste Fisher's

Em ambos os grupos, poucos indivíduos relataram sofrer com doenças crônicas. Contudo, o histórico de esquistossomose e/ou outros helmintos e protozoários foram mínimos no grupo NE. Já no grupo Infectado, 38,3% tiveram algum histórico de infecções com esquistossomose e/ou outros helmintos e protozoários e conseqüentemente, o uso de medicação anti-helmíntica praziquantel ($p=0.0007$, $p=0,004$, $p=0,004$) respectivamente. A frequência de sintomas intestinais (dor abdominal, diarreia, tonteiras ou perda de peso), foi significativamente maior em indivíduos do grupo Infectado, quando comparado ao grupo NE ($p= 0,001$), (Tabela 6).

Tabela 6- Análise dos antecedentes patológicos dos indivíduos do estudo

Variáveis	Grupos		p^1
	NE n = 29 n (%)	Infectado por <i>S. mansoni</i> n= 47 n (%)	
Possui doença crônica			
Sim (Bronquite , sinusite, asma , alergia)	2 (6,9)	8 (17)	0,3
Não	27 (93,1)	39 (82,9)	
Já teve esquistossomose alguma vez			
Sim	1 (3,4)	18 (38,3)	0,0007
Não	28 (96,6)	29 (61,7)	
Já teve outras doença parasitária			
Sim (geohelmintos, protozoários)	3 (10,3)	18 (38,3)	0,004
Não	26 (89,7)	24 (51)	
Não sabe	0	5 (10,6)	
Usou medicação praziquantel			
Sim	3 (10,3)	18 (38,3)	0,004
Não	26 (89,7)	24 (51)	
Não sabe	0	5 (10,6)	
Apresenta algum sintoma			
sintomas (Dor abdominal, diarreia, tonteira , perda de peso)	6 (20,7)	28 (59,6)	0,001
Sem sintomas	23 (79,3)	19 (40,4)	

¹ Teste Fisher's

5.3. Dados antropométricos

A Tabela 7, demonstra o estado nutricional das crianças e adolescentes em idade escolar. A maioria dos indivíduos tinham idade > 10 anos e a diferença de sexo foi semelhante entre os grupos. A estatura de 72,4% dos participantes do grupo NE foi considerada normal para a idade, porém, 27,6% estavam com a estatura baixa. No grupo Infectado, a taxa de indivíduos com estatura normal e baixa para a idade foi de 53,2% e 46,8%, respectivamente. O índice de massa corporal (IMC) por idade do grupo Infectado demonstrou que são poucos os indivíduos com magreza, enquanto o grupo NE apresentou mais indivíduos com excesso de peso, no qual a porcentagem de indivíduos com score $z \geq 2$ foi significativamente maior que no grupo dos Infectados ($p=0,02$). Em relação à circunferência abdominal, os indivíduos com abdômen >70 cm representavam 68,9% do grupo NE e 36,2% dos Infectados, havendo diferença significativa entre os grupos ($p=0,009$). Os dados qualitativos da Tabela 7, podem ser observados nas Figuras 8 A e B.

Tabela 7- Parâmetros do estado físico no grupo NE e no Infectado por *S. mansoni*.

Estado nutricional	Grupos		p^1
	NE n=29 n (%)	Infectado por <i>S. mansoni</i> n=47 n (%)	
Idade			
> 10 anos	27 (93)	43 (91,5)	1
< 10 anos	2 (6,9)	4 (8,5)	
Sexo			
Feminino	14 (48,3)	26 (55,3)	0,63
Masculino	15 (51,7)	21 (44,7)	
E/I			
$z \geq +2$	21 (72,4)	25 (53,2)	0,15
$z \leq -2$	8 (27,6)	22 (46,8)	
IMC/I			
$-1 \leq z \leq +2$	5 (17,2)	28 (59,5)	0,67
$z \leq -2$	4 (13,8)	2 (4,3)	referência
$z \geq +2$	20 (68,9)	17 (36,2)	0,02
Circunferência abdominal			
>70 cm	20 (68,9)	17 (36,2)	0,009
< 70 cm	9 (31)	30 (63,8)	
$-1 \leq z \leq +2$ (normal)	$z \leq -2$ (baixo)	$z \geq +2$ (excesso)	

¹ Teste Fisher's

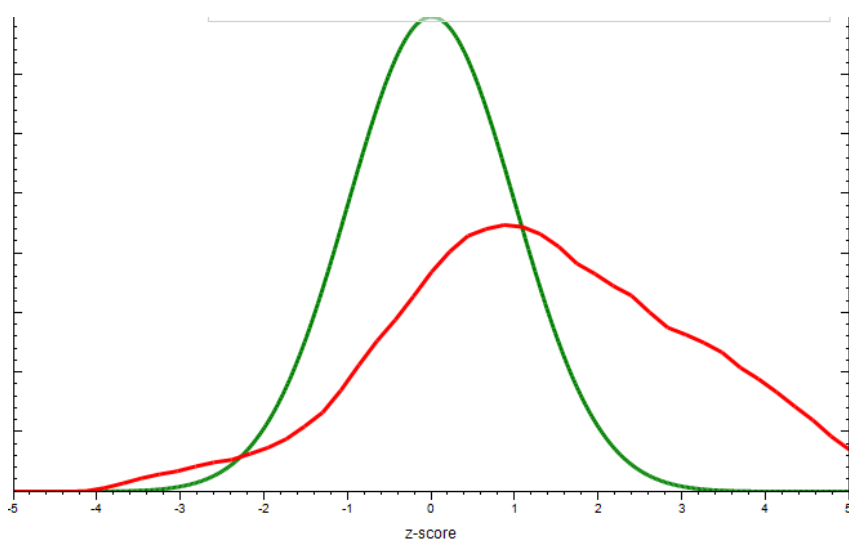
A circunferência abdominal confirmou que o grupo NE possuía uma maior circunferência em comparação ao grupo Infectado, com diferença significativa de $p=0,001$, conforme demonstrado na tabela 8.

Tabela 8- Parâmetro Antropométrico: Medianas e interquartis de circunferência abdominal nos grupos NE e infectado por *S. mansoni*.

Parâmetro	Grupos		p^1
	NE n= 29	Infectado por <i>S. mansoni</i> n=47	
	Mediana (interquartis)		
Circunferência abdominal (cm)	75 (67,5/ 80)	68 (64/ 70)	0,001

¹ Teste de Mann Whitney com valor de $p= \leq 0.001^{**}$

A – Infectados por *S. mansoni*



B- NE negativos endêmicos

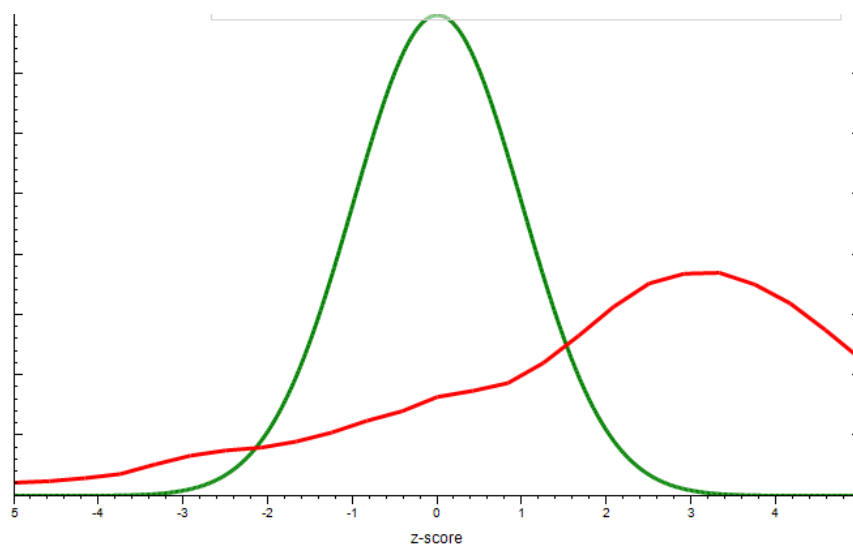


Figura 8- Avaliação do índice de massa corporal obtidos os escores z conforme recomendação da OMS (WHO, 2005), a saber: normal (≥ -2 a $\leq +1$); déficit nutricional ($z < -2$); excesso nutricional ($z \geq +2$). Padrão de curva em crianças e adolescentes de 6 a 19 anos pela OMS (Linha verde), curva das crianças e adolescentes do nosso estudo (Linha vermelha). (A) grupo Infectado com *S. mansoni* n=47; (B) grupo NE negativo endêmico n=29.

Posteriormente, os dados da carga parasitária (opg) foi correlacionado aos dados dos indivíduos com excesso de peso, porém não foi encontrado diferença significativa.

5.4. Nova classificação do grupo infectado de acordo com a carga parasitária

O grupo Infectado por *S. mansoni* (ovo-positivos no teste de K-K, excluindo os nove indivíduos positivos somente no POC-CCA) foi dividido em subgrupos conforme a sua carga parasitária, que foi calculada a partir das 6 lâminas de K-K. Portanto, os 38 participantes positivos na infecção por *S. mansoni*, foram divididos em: baixa carga < 100 opg (CB); média/alta carga ≥ 100 opg (CMA). Dessa forma, o grupo CB (carga parasitária mediana de 12 e intervalos interquartis de 5 – 25,5 opg) possui 26 participantes, 12 (46,1%) do sexo masculino e 14 (53,8%) do sexo feminino, com idade média de $12,54 \pm 3,04$ anos. Por sua vez, o grupo CMA (carga parasitária mediana de 144 e intervalos interquartis de 111 – 306 opg) compreendeu 12 indivíduos, 8 (67%) do sexo masculino e 4 (33%) do sexo feminino, com idade média de $13,08 \pm 2,19$ anos (Tabela 9). Essa nova definição será usada para todos os experimentos realizados no estudo descritos nos demais capítulos.

Tabela 9- Nova caracterização do grupo positivo na infecção por *S. mansoni* pelo método de Kato-Katz, separados conforme a sua carga parasitária

Caracterização	Grupos		
	NE n= 29	CB n=26	CMA n=12
Sexo			
Homens /mulheres (n)	14/15	12/14	8/4
%	48.3% / 51.7%	46.1%/ 53.8%	67% / 33%
Idade Media \pm DP *	14.52 \pm 3.16	12.54 \pm 3.04	13.08 \pm 2.19
Opg** Mediana (IQR)***	****	12 (5/ 25.5)	144 (111/ 306)

* Desvio padrão

** ovos por grama de fezes

*** interquartis (25, 75%)

**** sem infecções pelos métodos de Kato-Katz e POC-CCA

6. Discussão: Capítulo 1

O presente trabalho, foi realizado em uma região, com o ambiente propício à infecção por *S. mansoni*. Diante desse contexto, a caracterização da população, incluindo as descrições das condições sociais, econômicas e comportamentais, tornam-se primordiais para o planejamento, implantação e monitoramento de programas para o controle da esquistossomose na região (INOBAYA et al., 2014).

Portanto os indivíduos negativos eram da localidade de Ovo-Dema, o local com menos casos de esquistossomose na região de Januária. A maioria desses indivíduos tinham acesso à água limpa e tratada, banheiro dentro de casa (com privada e descarga) e as coleções hídricas eram afastadas, fatores que dificultam o contato com o estágio infectante do parasito, conseqüentemente, impedindo a manutenção do ciclo biológico da esquistossomose no local (MASSARA et al., 2004; MASSARA et al., 2006).

A higienização pessoal das crianças e adolescentes são fatores determinantes relacionados à infecção, o que pode ser observado no grupo Infectado, principalmente, ter contato frequente com coleções hídricas, corroborando com vários estudos realizados no Brasil (COSTA et al., 1985; DIAS et al., 1994; RODRIGUES et al., 2000; CONCEIÇÃO et al., 2002; GRAEFF-TEIXEIRA et al., 2004; CONCEIÇÃO et al., 2007) e em outros países (PICQUET et al., 1998; MOIRA et al., 2007;). Essa exposição ao parasito é frequente na região, devido ao clima tropical o ano todo.

Em relação aos antecedentes patológicos, foi observado que dos 47 indivíduos infectados por *S. mansoni*, 18 deles já foram reinfetados e tratados com o quimioterápico praziquantel. Essa informação, obtida pelo questionário, tem muita relevância, visto que, o pico da prevalência e intensidade da infecção em áreas endêmicas são maiores no início da adolescência, decaindo na terceira década de vida. Estudos imunológicos apontam que a diminuição da intensidade é concebida, em parte, pelo desenvolvimento de uma resposta imunológica contra novas infecções (WILKINS et al., 1984; KABATEREINE et al., 1999), ou seja, o verme adulto de *S. mansoni* vive em média entre 5-10 anos (FULFORD et al., 1995) e essa imunidade protetora à reinfecção, acontece quando os vermes da primeira infecção começam a morrer. Tal evidência, gerou a hipótese de que a permanência do verme, não é o que promove a imunidade protetora, mas sim, a sua morte (WOOLHOUSE & HAGAN, 1999). Portanto, alguns estudos revelaram que essa “imunidade adquirida” pode ser desenvolvida mais cedo, em áreas de altas endemicidades ou em áreas com programas para o tratamento da esquistossomose.

Apesar da função do quimioterápico praziquantel seja controlar a morbidade, a morte recorrente do verme adulto, favorece a aceleração e o desenvolvimento da proteção à reinfecção e morte prematura dos vermes (MUTAPI et al., 1997; MUTAPI et al., 1998).

Na análise das características antropométricas das crianças e adolescentes, ambos os grupos possuíam indivíduos com excesso de peso, porém, poucos com magreza. Entretanto, não é possível afirmar que a alimentação desses indivíduos seja saudável ou não, pois esse quesito não foi avaliado no presente trabalho. Diversos estudos em diferentes países mostraram preocupações com crianças e adolescentes em idade escolar sobre o excesso de peso (AVILA-CURIEL et al., 2018; NONBOONYAWAT et al., 2019). No Brasil, na região de Januária, onde foi realizado o trabalho, todos os alunos analisados têm o mesmo hábito de se alimentar da merenda escolar e, portanto, esse dado é um delineamento observacional, o que indica causalidade. No presente estudo não foram encontradas infecções com geohelmintoses e as infecções por *S. mansoni*, em sua maioria era assintomática. Por esta razão, salienta-se a necessidade da realização de outros estudos sobre as características antropométricas em áreas de infecções ativas com *S. mansoni* e geohelmintoses. Alguns estudos mostram que infecções maciças por *S. mansoni*, ancilostomídeos e *Trichuris trichiura*, principalmente em crianças de idade escolar, podem resultar em anemia e/ou magreza acentuada, o que não foi observado nos voluntários aqui avaliados, sugerindo que esses indivíduos poderiam apresentar a forma mais leve da infecção por *S. mansoni* (STURROCK et al., 1998; BRITO et al., 2006).

Capítulo 2

Marcadores hematológicos, citocinas plasmáticas e resposta imune humoral nos diferentes grupos de crianças e adolescentes, antes e após o tratamento com o quimioterápico praziquantel.

Objetivos específicos:

- Comparar o perfil hematológico dos indivíduos dos grupos NE (Negativo endêmico), CB (< 100 opg) e CMA (≥ 100 opg) antes (T0) e 30 dias (T30d) após o tratamento com praziquantel;
- Avaliar o perfil das citocinas Th1, Th2, Th17 e Treg no plasma dos indivíduos dos grupos: NE, CB e CMA antes (T0) e 30 dias (T30d) após o tratamento com praziquantel;
- Analisar o perfil das imunoglobulinas IgG1, IgG4 e IgE específico, contra o antígeno do verme adulto (SWAP) nos indivíduos dos grupos NE, CB e CMA antes (T0) e 30 dias (T30d) após o tratamento com praziquantel;

7. Materiais e métodos: Capítulo 2

7.1. Avaliação dos parâmetros hematológicos nos indivíduos infectados e não infectados por *S. mansoni*.

Para o hemograma completo foram utilizados tubos de 5 mL contendo EDTA para cada criança e adolescente. O exame foi realizado pelo laboratório terceirizado Millenium, situado no município de Januária.

7.2. ELISA para a detecção de citocinas no plasma de indivíduos infectados e não infectados por *S. mansoni*.

Ensaio de Elisa Sanduíche foram realizados para analisar as citocinas no plasma dos indivíduos avaliados. As amostras de sangue coletadas (25 mL por indivíduo) foram armazenadas em tubos heparinizados e transportadas para o Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Primeiramente, assim que as amostras chegavam ao laboratório, as células mononucleares do sangue periférico (PBMCs – do Inglês *peripheral blood mononuclear cell*) foram separadas, por coluna de Ficoll, centrifugado e o sobrenadante de plasma retirado e colocados em tubos de eppendorfs, devidamente identificados, os quais foram armazenados em freezer -80°C.

Posteriormente, a ELISA sanduíche foi realizada utilizando o protocolo e Kits comercialmente disponíveis da R&D Systems (Minneapolis, EUA) para avaliar no plasma, por grupo, a dosagem das citocinas: IL-1 β (3,9–500 pg/ml), IL-27 (78,13–10.000 pg/ml), IL-17 A (7,8–1.000 pg/ml), IL-13 (46–6.000 pg/ml), IL-10 (15,63–2.000 pg/ml), e TGF- β (31,2–2.000 pg/ml).

O anticorpo de captura específico foi diluído em PBS 1x (pH 7,4) e 25 μ L dessa solução foram pipetados em cada poço das microplacas de 96 poços Costar 3690 (Corning, Nova Iorque, EUA), as quais foram seladas e incubadas durante a noite em temperatura ambiente. No dia seguinte, as microplacas foram lavadas duas vezes com PBS Tween-20 a 0,05% e, posteriormente, foram adicionados 75 μ l/poço de solução de bloqueio PBS/BSA (1%), seguido por uma incubação de uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes, para então ser adicionado o padrão em solução diluente PBS/BSA (0,1%) juntamente com 25 μ l/poço das amostras de plasma não diluídas, seguido de mais duas horas de incubação em temperatura ambiente.

Por sua vez, a citocina TGF- β teve o padrão diluído em solução soro fetal bovino (1,4%) e PBS Tween-20 (0,05%). Nas amostras foram adicionados 20 μ L de solução ativadora (HCl 1N) a cada 40 μ L de plasma/poço e após 10 minutos, as reações de ativação foram neutralizadas pela solução de parada (NaOH 1,2N, 0,5M HEPES). Após cinco lavagens das microplacas com PBS Tween-20 (0,05%), 25 μ L/poço do anticorpo de detecção diluídos em PBS/BSA (0,1%) foram adicionados, seguido por uma incubação de duas horas em temperatura ambiente. Em seguida, as microplacas foram lavadas por mais cinco vezes e 25 μ L de estreptavidina diluída em PBS 1x (pH 7,4) (1:40 ou 1:200) foram adicionados por poço, seguido de 20 minutos de incubação em temperatura ambiente. Por fim, as microplacas foram lavadas mais cinco vezes e foram adicionados em cada poço 25 μ L do substrato H₂O₂ + tetrametilbenzidina (1:1), seguido de incubação em temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse período, 25 μ L/poço de solução de parada da reação (2-4N H₂SO₄) foram adicionados às microplacas.

Os ensaios de Elisa foram realizados em duplicata para as amostras e padrões, com as médias entre as absorvâncias sendo realizadas pelo leitor de microplacas Versa Max-Microplate Reader[®] e analisadas pelo software Softmax[®] Proversão 6.4 (Molecular Devices, San Jose, EUA) ajustado no comprimento de onda 450 nm.

7.3. Detecção de imunoglobulinas específicas contra antígeno solúvel do verme adulto de *S. mansoni* (SWAP)

Para a detecção das imunoglobulinas IgG1, IgG4 e IgE específico (ng/mL), ensaios de ELISA indireto foram realizados de acordo com o protocolo previamente padronizado (Sigma -Aldrich).

Após a padronização das concentrações dos reagentes e do antígeno (SWAP), microplacas de poliestireno (NUNC, Roskilde, Denmark) foram sensibilizadas com 100 μ g/poço do antígeno do verme adulto (SWAP) na concentração de 10 μ g/mL em tampão de carbonato (pH 9.6), seguido de incubação durante a noite em 4°C. Posteriormente, as microplacas foram lavadas com PBS Tween-20 a 0,05% (SIGMA Chemical Co., EUA) e bloqueadas com 250 μ L/poço de PBS/BSA a 3% (SIGMA Chemical Co., EUA), seguido de pelo menos uma hora de incubação em temperatura ambiente. O plasma foi diluído em PBS Tween-20 (0,05%) (1:100) e adicionado nas microplacas 50 μ L/poço em duplicata, seguido de incubação em 4°C durante a noite. No dia seguinte, as microplacas foram lavadas e 100 μ L/poço foram adicionados de anti-IgG1, anti-IgG4, ambos conjugados com biotina (0,5 μ g/mL, Southern Biotechnology Associate Inc.), e anti IgE conjugado com

peroxidase, diluídos nas proporções de 1:2.500, 1:20.000 e 1:2.000, respectivamente. Em seguida, as microplacas foram incubadas por uma hora em temperatura ambiente e lavadas novamente, às quais foi adicionado 50 µL/poço de estreptavidina conjugada com Horseradish Peroxidase (Streptavidin-HRP, R&D Systems) diluído em PBS/1x, seguido de incubação por 30 minutos em temperatura ambiente. Foram adicionados 100 µL/poço de OPD (SIGMA Chemical Co.) + 30,0% H₂O₂ diluído em tampão citrato pH 5,0 e, por fim, após 20 minutos foi adicionado 20 µL/poço de solução de parada (2-4N H₂SO₄).

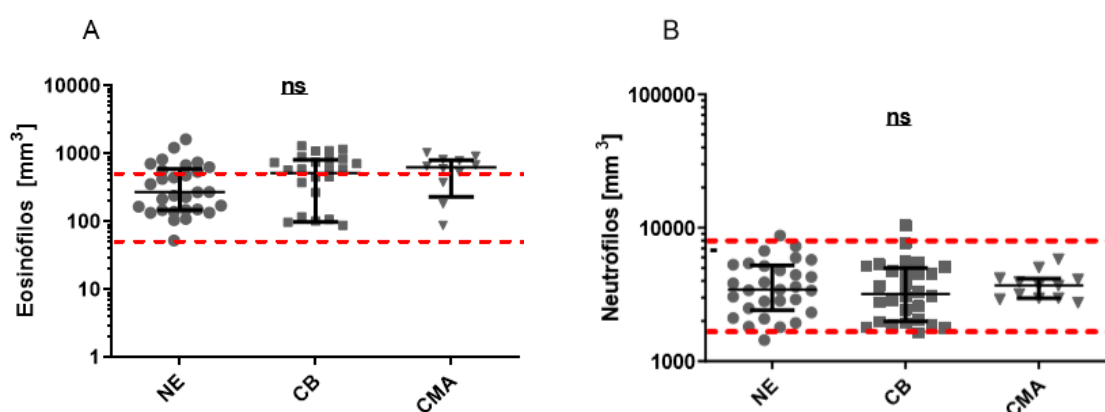
Os ensaios para cada imunoglobulina foram realizados em duplicata e as médias entre as absorbâncias foram realizadas como descrito no item anterior (7.2). O cut off foi determinado pela curva ROC (Receiver Operating Curve) e a leitura de absorbância no comprimento de onda de 492 nm.

8. Resultados: Capítulo 2

8.1. Perfil hematológico dos indivíduos dos grupos NE, CB e CMA antes do tratamento com praziquantel (T0).

As células polimorfonucleares, ou granulócitos, foram avaliadas e foi observado que os eosinófilos estavam com níveis normais na maioria dos indivíduos, mas alguns indivíduos apresentaram eosinofilia, porém não houve diferença significativa (Figura 9A). Para os neutrófilos também não houve diferença significativa, pois a detecção foi semelhante entre os grupos (Figura 9B).

As células mononucleares, ou agranulócitos (linfócitos e monócitos), também foram analisadas e foi observado que a maioria dos indivíduos apresentavam níveis normais de linfócitos, com apenas alguns indivíduos com níveis aumentados, porém sem diferença significativa (Figura 9C). No entanto, o grupo NE apresentou baixos níveis de monócitos em comparação ao grupo CB ($p \leq 0,001$) (Figura 9D), o qual, por sua vez, apresentou menores níveis detectáveis de eritrócitos no sangue periférico em relação ao grupo CMA ($p \leq 0,05$) (Figura 9E). Entretanto, ambos os grupos, CB e CMA, apresentaram maiores níveis de plaquetas no sangue periférico em comparação ao NE ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente) (Figura 9F). Posteriormente, foram analisadas possíveis correlações entre os valores hematológicos e a intensidade da infecção (opg), idade e sexo, porém não foi observado nenhuma diferença significativa (dados não mostrados).



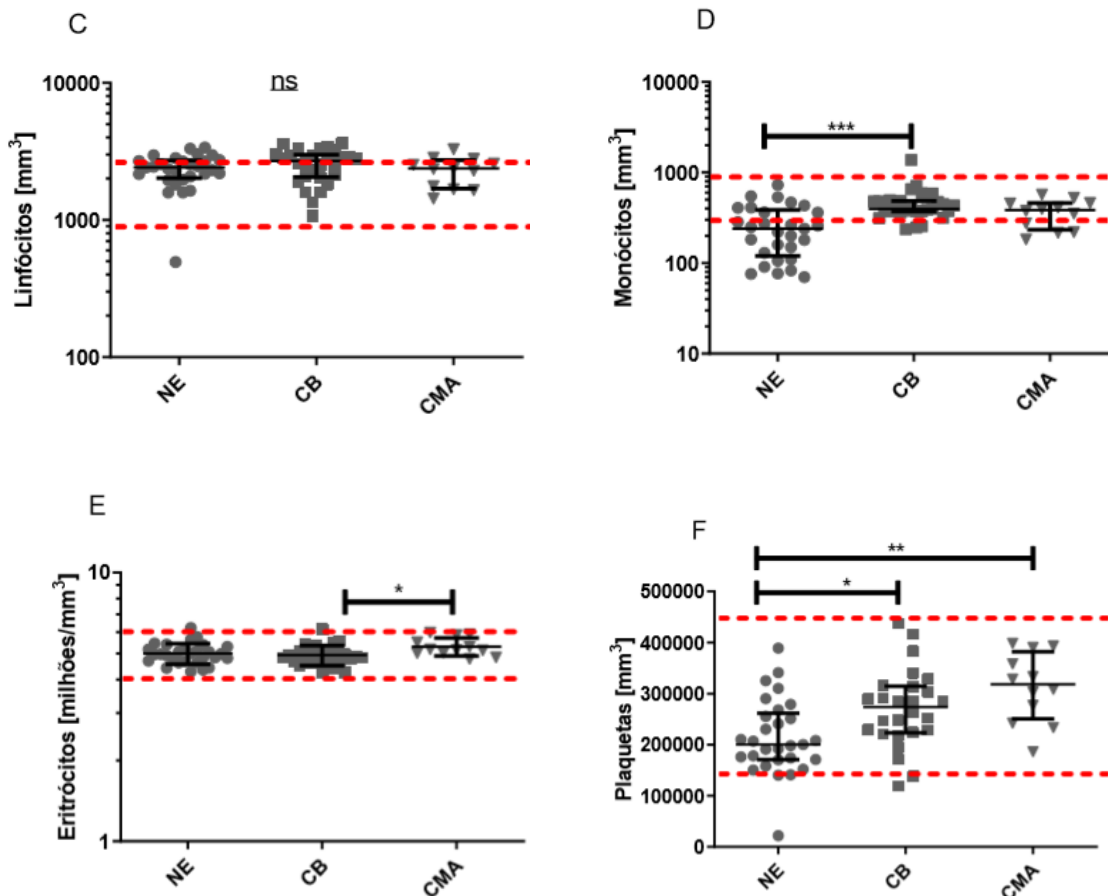
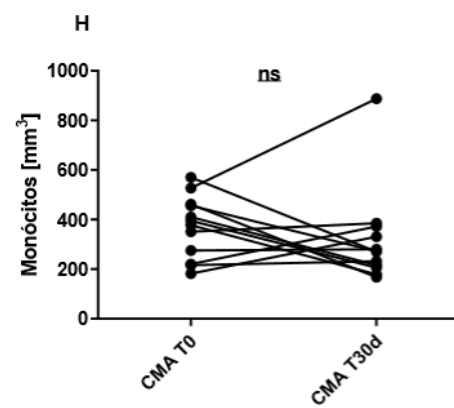
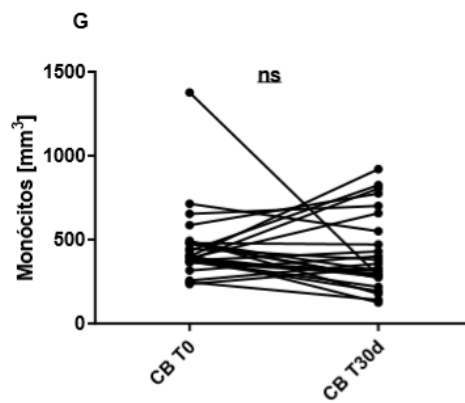
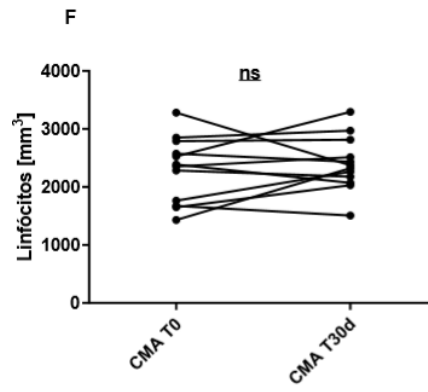
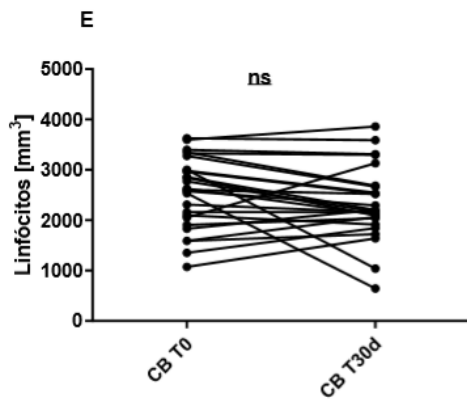
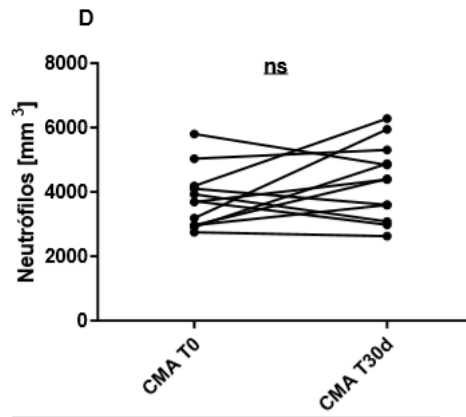
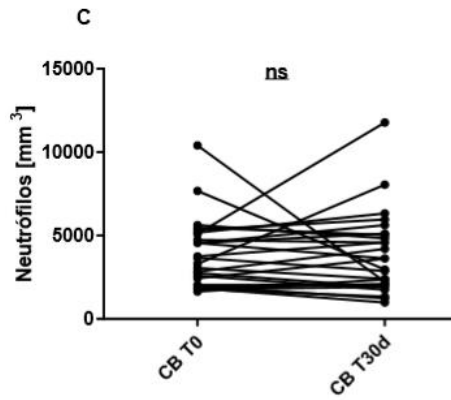
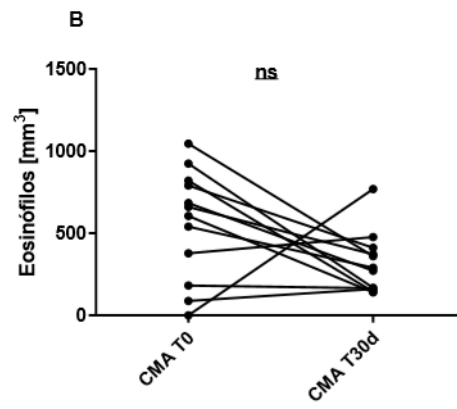
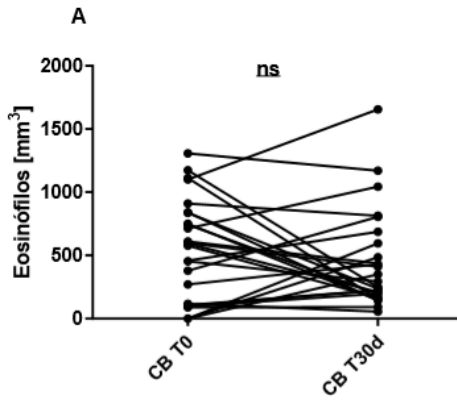


Figura 9 - Resultados do hemograma no T0 (antes do tratamento) e comparação dos valores entre os grupos NE (n=29), CB (n=26), CMA (n=12). As linhas pontilhadas vermelhas marcam a referência de níveis normais para cada população celular, descrita entre colchetes. **(A)** Eosinófilos [50- 500 mm³]; **(B)** Neutrófilos [1800 a 8000 mm³]; **(C)** Linfócitos [900 a 2900 mm³]; **(D)** Monócitos [300 a 900 mm³]; **(E)** Eritrócitos [4,40 a 6,0 milhões/ mm³] e **(F)** Plaquetas [140.000 a 450.000]. Os resultados são expressos por mediana e interquartis. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Os símbolos *, **, *** e ns. indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$, não significativo, respectivamente.

8.2. Perfil hematológico dos indivíduos dos grupos NE, CB e CMA após o tratamento com praziquantel

Os indivíduos positivos para *S. mansoni* tornaram-se negativos nos exames realizados, K-K e POC-CCA, 30 dias após o tratamento com praziquantel, entretanto, não houve uma mudança exacerbada nas células de defesa dos grupos em comparação com o período antes do tratamento (Figura 10). Foi observada uma diminuição das plaquetas e dos eritrócitos após o tratamento apenas no grupo CMA, conforme demonstrado nas figuras (10J- L).



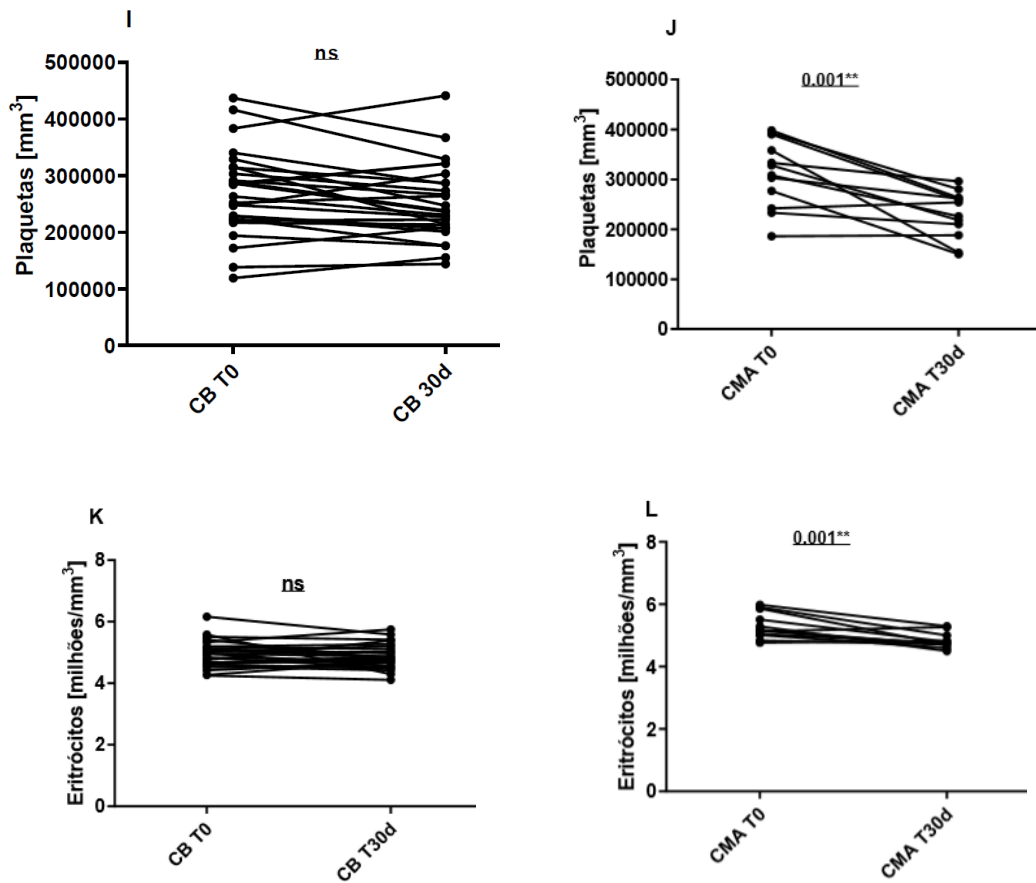
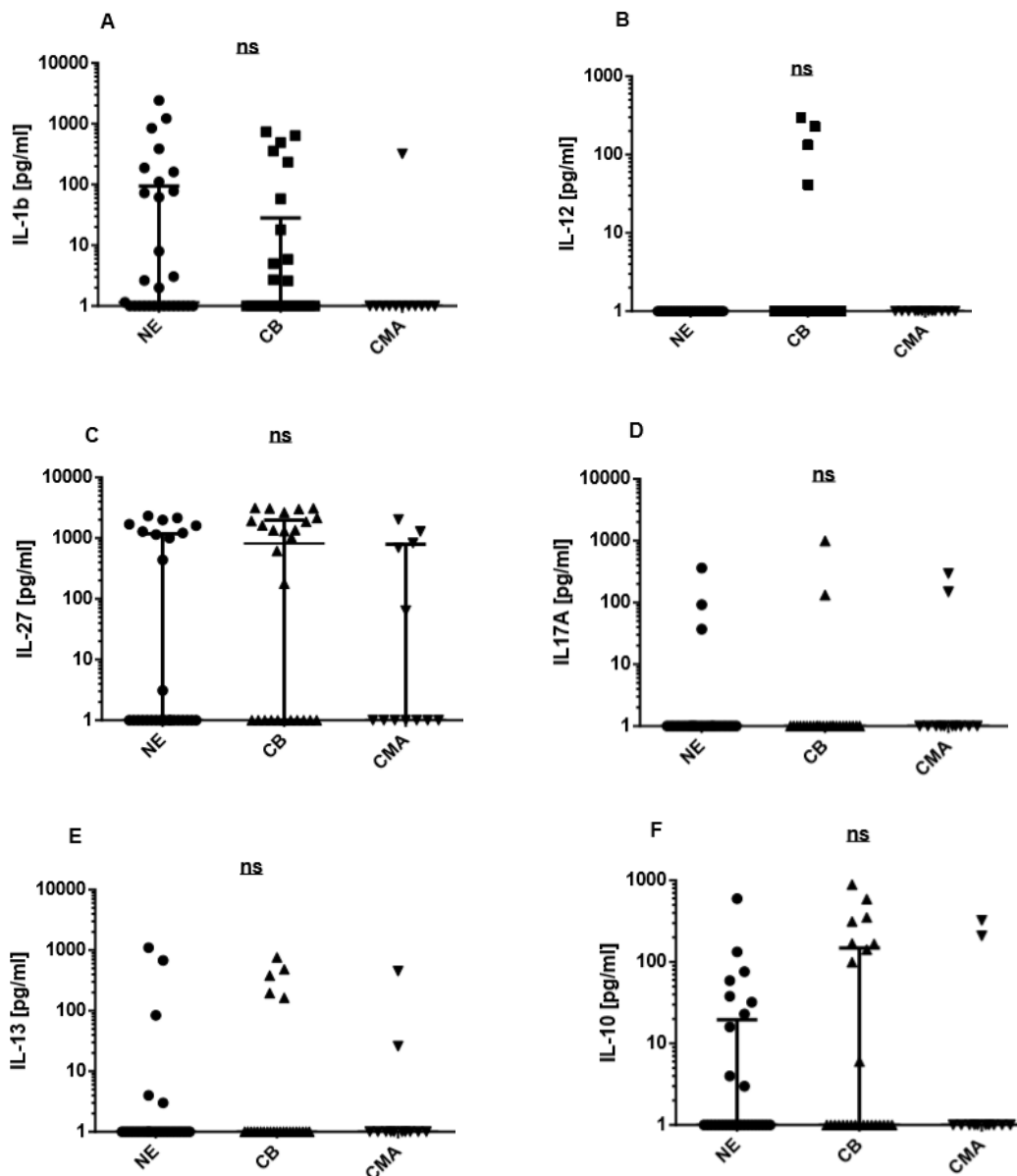


Figura 10- Pareamento entre a contagem das células do sangue periférico nos grupos positivos para *S. mansoni*, CB (n=26), CMA (n=12), antes do tratamento (T0) e trinta dias após tratamento (T30d). (A-B) Eosinófilos; (C-D) Neutrófilos; (E-F) Linfócitos; (G-H) Monócitos; (I-J) Eritrócitos, (K-L) Plaquetas. Nos dados paramétricos foi usado o teste T pareado e nos dados não paramétricos Wilcoxon pareado, com ns não significativo e ****** $p \leq 0,001$.

8.3. Perfil imunológico de citocinas nos grupos NE, CB e CMA, antes do tratamento com praziquantel (T0).

Para os ensaios imunológicos foram realizados o ELISA sanduíche do plasma dos indivíduos para analisar as citocinas do tipo 1 (IL-1 β , IL-12 e IL-27); citocinas Th17 (IL-17A); citocina do tipo 2 (IL-13) e as citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β). Em cada grupo foi observado que existem subgrupos de indivíduos produtores de citocinas e indivíduos com concentrações mínimas ou não detectáveis no plasma, tanto no T0 (Figura 11), sem diferenças significativas entre os grupos, quanto no T30 dias (dados não mostrados). Além disso, não houve correlação entre os valores do perfil imunológico das citocinas, a intensidade da infecção (opg), idade e sexo (dados não mostrados).



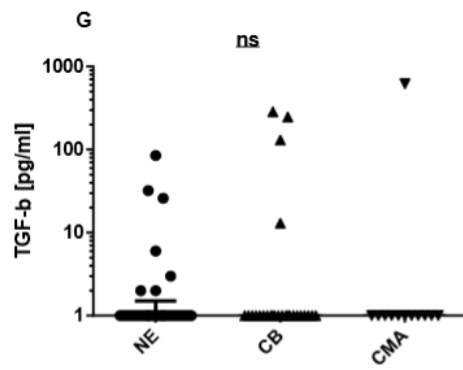


Figura 11 -Concentrações de citocinas (pg/ml), no plasma dos grupos NE (n=29); CB (n=26); CMA (n=12) no T0. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's, com valores de ns não significativo entre os grupos.

8.4. Perfil de imunoglobulinas nos indivíduos dos grupos NE, CB e CMA antes e após o tratamento com praziquantel.

A reatividade das imunoglobulinas IgG1 e IgG4 anti-SWAP foram significativamente maiores nos grupos CB ($p < 0,0001$ e $0,004$) e CMA ($p = 0,001$ e $p < 0,0001$), em relação ao grupo NE (Figuras 12A-B). Já a imunoglobulina IgE anti-SWAP, foi mais detectável apenas no grupo CMA em comparação aos grupos NE ($p = 0,007$) e CB ($p = 0,02$) (Figura 12 C).

Após o tratamento com praziquantel, o grupo CB apresentou um aumento na reatividade de IgG1 ($p = 0,0002$) e IgE ($p < 0,0001$) (Figura 12 D) e o grupo CMA, apresentou um aumento de IgG1 ($p = 0,0005$) e a diminuição nos níveis de IgG4 ($p = 0,001$) (Figura 12 E).

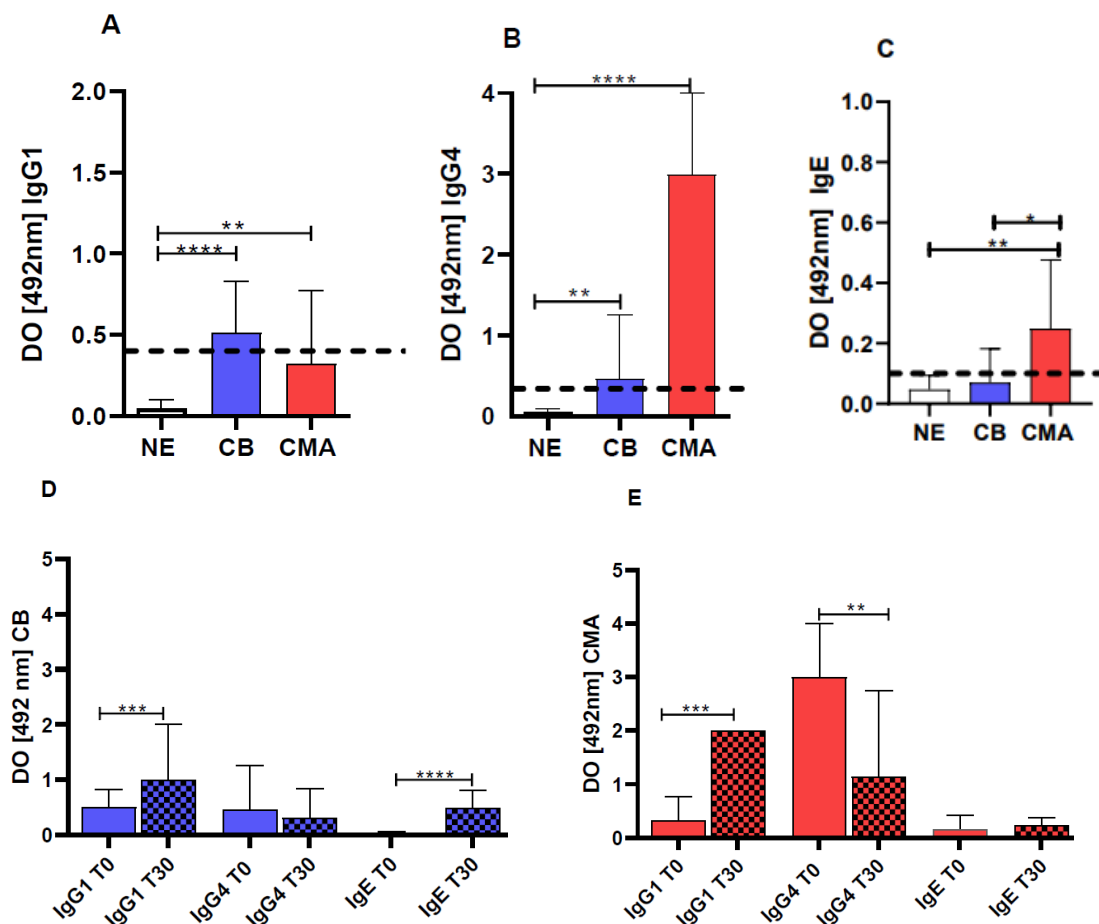


Figura 12 - Perfil de detecção das imunoglobulinas (A) IgG1; (B) IgG4 (C) IgE anti-SWAP. Pareamento entre os grupos e imunoglobulinas no T0 e T30 dias (D-E). O ponto de corte foi determinado a partir da análise da curva ROC (linha pontilhada preta). Os símbolos **, *** e **** indicam, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's e Wilcoxon pareado.

Quando foi avaliado a correlação da intensidade da infecção (opg) com cada imunoglobulina, os resultados obtidos demonstraram que a IgG1 se correlacionou negativamente ao opg ($r=-0,37$ e $p=0,02$) (Figura 13A). Em contrapartida, a IgG4 apresentou uma correlação positiva com o opg ($r=0,82$ e $p<0,0001$), (Figura 13B). Entretanto, não houve correlação entre a IgE e o opg (Figura 13C).

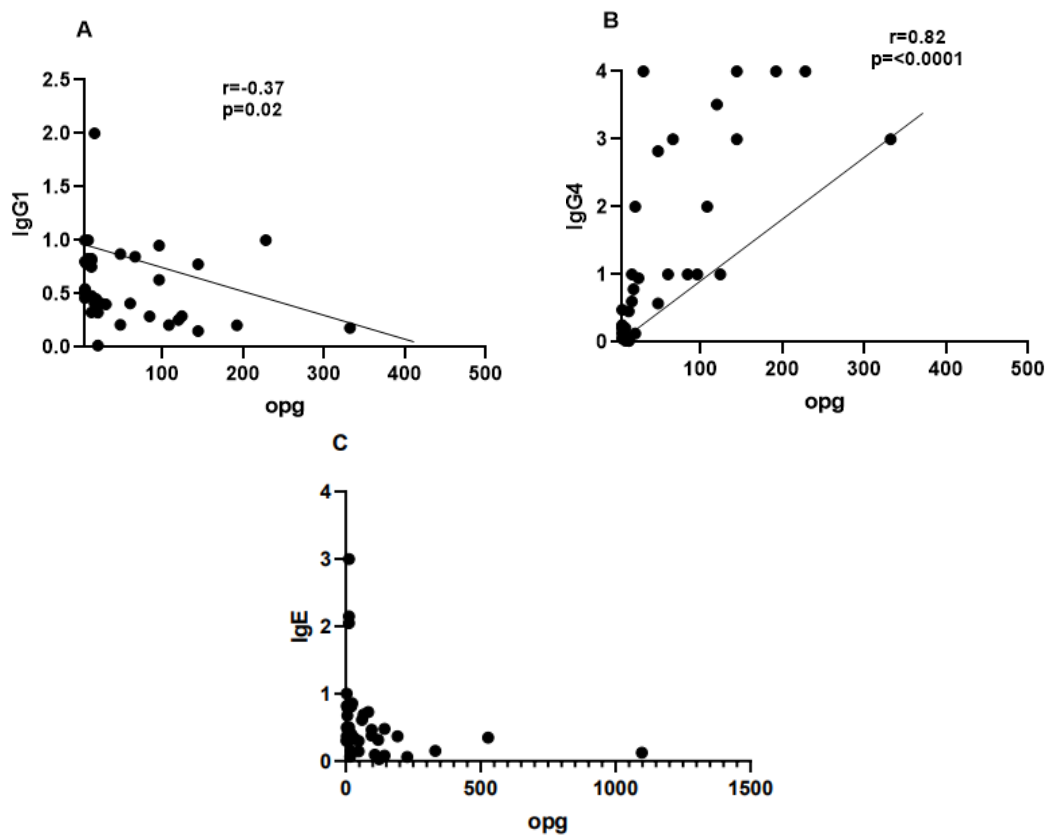


Figura 13- Correlação entre o opg e a imunoglobulina (A) IgG1; (B) IgG4; (C) IgE anti-SWAP. O teste realizado foi a Correlação de Spearman com o valor de p indicado em cada gráfico.

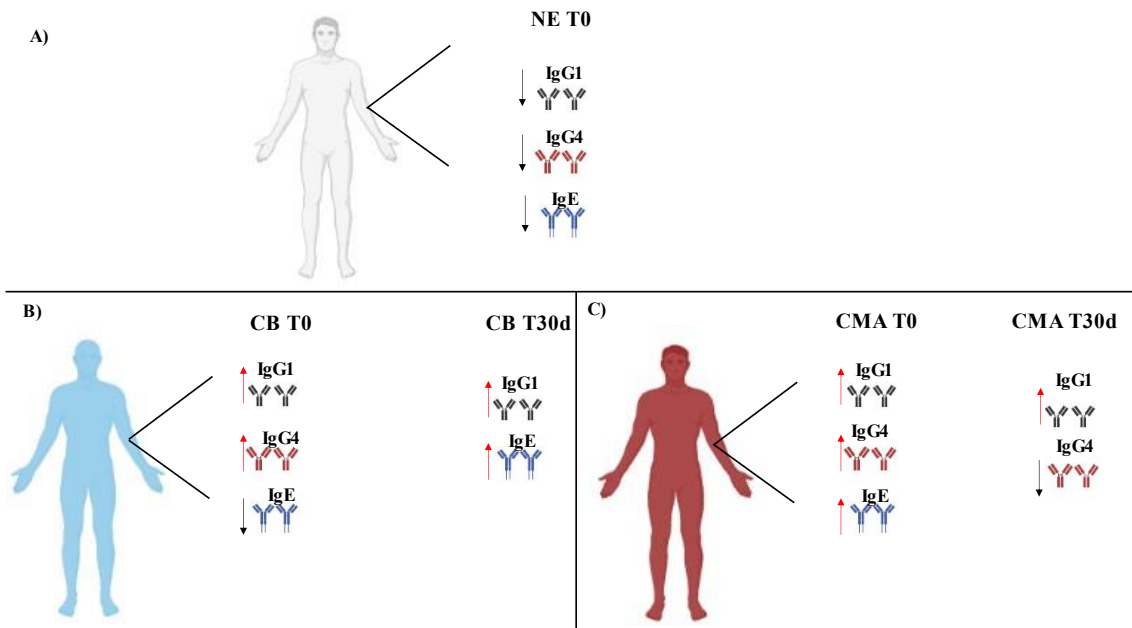


Figura 14- Resumo da detecção de imunoglobulinas no plasma, IgG1; IgG4 e IgE anti-SWAP. NE n=29, CB n= 26 e CMA n=12 (A) Grupo NE T0 (Negativo endêmico) antes do tratamento, diminuição de todas as imunoglobulinas (B) Grupo CB T0 (carga baixa) antes do tratamento, aumento de IgG1 e IgG4 e diminuição da imunoglobulina IgE e CB T30d (carga baixa) após tratamento, aumento de IgG1 e IgE. (C) Grupo CMA T0 (média a alta carga parasitária) antes do tratamento, aumento de IgG1, IgG4 e IgE e CMA T30d (média a alta carga parasitária) após tratamento, aumento de IgG1 e diminuição de IgG4.

9. Discussão:Capítulo 2

O presente trabalho confirma que todos os indivíduos tratados com praziquantel apresentam resultados negativos nos exames de K-K e POC-CCA após 30 dias. O praziquantel é o fármaco mais utilizado, com estudos demonstrando poucos casos de falha no tratamento, sendo o medicamento mais eficaz para o tratamento da esquistossomose (WEBSTER et al., 1997; KABATEREINE et al., 2007; DANSO-APPIAH et al., 2013).

Avaliação do Hemograma

Em relação aos eosinófilos e linfócitos, não foi constatada diferenças significativas entre os grupos, porém foi possível observar indivíduos com o aumento dos mesmos. Os eosinófilos são células que participam da regulação na formação do granuloma e seu infiltrado é mediada pelas citocinas IL-5 e IL-13 (SHER et al., 1990; JANKOVIC et al., 1998; CHIARAMONTE et al., 1999; REIMAN et al., 2006). Entretanto, os grupos foram homogêneos para os neutrófilos, não havendo neutrofilia. Geralmente, o granuloma de *S. mansoni* possui mais infiltrado de eosinófilos, diferentemente do granuloma de *S. japonicum*, que tem predominância de neutrófilos (VON et al., 1973).

Sabe-se que os monócitos desempenham funções extremamente importantes na resolução de inflamações e reparo de feridas, controlando a homeostase do hospedeiro (HUME et al., 2019). No presente trabalho, os monócitos do grupo CB foram detectados em número maior no sangue periférico em comparação ao grupo NE. O estudo de Girgis e colaboradores (2014) demonstraram em modelos murinos que os AAMs (macrófagos alternativamente ativados) são importantes para a organização celular do granuloma, originados por monócitos inflamatórios do sangue periférico. Em seres humanos os monócitos são recrutados para os locais com danos vasculares (CHARO & TAUBMAN, 2004). Dessa forma, é possível que os níveis de monócitos aumentados observado no grupo CB seja devido à indução e recrutamento dessas células para o local da inflamação provocada pela infecção por *S. mansoni*.

A anemia associada e induzida pela esquistossomose é bem documentada na literatura (MAHMOUD et al., 1973; FRIEDMAN et al., 2005), porém nos resultados aqui obtidos não foi observado eritrocitopenia entre os grupos, mesmo com o CB apresentando menor concentração de eritrócitos em comparação ao CMA. É possível que essa diferença seja devido à falta de indivíduos com altas cargas parasitárias, uma vez que os mecanismos envolvidos na mediação dessa patologia na esquistossomose estão

diretamente relacionados ao excesso de ovos, que contribuem para a morbidade da doença (OLSEN et al., 1998; GRYSEELS et al., 2006).

A infecção por *S. mansoni* aumentou a concentração das plaquetas no sangue periférico, conforme observado nos grupos CB e CMA em relação ao grupo NE, corroborando com o estudo de Joseph e colaboradores (1983), que obtiveram resultados semelhantes em modelos murinos e demonstraram que tal aumento promove a capacidade de danificar os esquistossômulos. No grupo CMA, os níveis de plaquetas e eritrócitos diminuíram após o tratamento, provavelmente devido à inibição da coagulação sanguínea no tecido adjacente causado pelas enzimas do tegumento do parasito (DA'DARA et al., 2014). Ressaltando que a plaquetose é frequente em indivíduos com doença hepática granulomatosa e anormalidades vasculares, o que não foi observado em nossos grupos (YUYUN et al., 2019).

Avaliação de citocinas no sangue periférico (plasma)

Os resultados do plasma sanguíneo demonstraram que algumas das detecções foram mínimas nos grupos NE, CB e CMA, tanto antes quanto após o tratamento. Sabe-se que as citocinas são produzidas localmente e sua quantificação muitas vezes é de difícil detecção no sangue periférico (soro/plasma), devido à sua catabolização (FINKELMAN et al, 1999) ou pelas baixas concentrações no sangue periférico de indivíduos que não apresentam graves alterações patológicas (CASTRO et al., 2018).

Avaliação de imunoglobulinas no sangue periférico

O aumento na reatividade de IgG1 anti-SWAP nos indivíduos infectados antes e após o tratamento pode estar relacionado à imunidade protetora contra a doença, pois, conforme demonstrado em diversos estudos, a IgG1 desempenha um papel importante na destruição dos esquistossômulos (KHALIFE et al., 1989; SATTI et al., 1996). Por outro lado, altos níveis de IgG2 e IgG4 estão relacionados à suscetibilidade, pois facilitam a entrada de novos parasitos (BUTTERWORTH et al., 1988; HAGAN et al., 1991; ROTTMAN, 1999; FALCÃO et al., 2002; YANG et al., 2018), principalmente em crianças, que por produzirem níveis mais altos de IgG4 são mais suscetíveis à reinfecção (ISKANDER et al., 1981; BUTTERWORTH et al., 1987). Dessa forma, os resultados aqui apresentados demonstram, mais uma vez, a eficácia do praziquantel e a evolução da proteção, visto que o grupo com maior carga parasitária (CMA) demonstrou uma redução da IgG4 específico após o tratamento. Embora a reatividade da IgE tenha

sido maior no grupo CMA antes do tratamento, apenas o grupo CB aumentou esse anticorpo após o tratamento, expondo novamente que a resposta à infecção está evoluindo para a proteção. Tais resultados corroboram com estudos *in vitro*, que revelaram que os níveis aumentados de IgE específico, após o tratamento com praziquantel, promoveram uma resposta imune protetora contra a reinfeção por *S. mansoni* (JOSEPH et al., 2004; MWINZI et al., 2009; BLACK et al., 2010).

Em relação à intensidade da infecção e as diferentes imunoglobulinas, destaca-se que a correlação negativa entre a IgG1 específico e as cargas parasitárias dos indivíduos, o que sugere que essa imunoglobulina poderia ser importante na proteção contra o parasito, atuando contra antígenos específicos e concebendo uma resposta imune efetora (TRAN et al., 2006). Contudo, a IgG4 específico correlacionou-se positivamente com a carga parasitária, corroborando com o estudo de Elfaki e colaboradores que demonstraram a correlação positiva entre IgG4 e o antígeno solúvel do ovo (SEA), em relação ao aumento da carga parasitária, o qual é um marcador mais associado à infecção no grupo infectado. Nesse mesmo estudo, a presença dos níveis de IgE total também foi analisada, à qual houve também uma correlação positiva com a carga parasitária (ELFAKI et al., 2016), diferindo dos resultados do presente estudo, em que tal correlação, não foi obtida.

As diferenças observadas entre os estudos podem estar relacionadas à aspectos tanto do parasito (variação de antígeno dentro do organismo e diferenças entre cepas) quanto do hospedeiro (sexo, idade, estado nutricional, duração e frequência da exposição, diversidade genética e coinfeções com outros parasitas), além do maior período de acompanhamento dos indivíduos (meses ou até anos) realizado na maioria dos estudos citados, diferentemente do presente estudo, que utilizou um período mais curto e exato (30 dias) para avaliar a eficiência do tratamento com praziquantel. Possivelmente, analisar as imunoglobulinas específicas por um período maior poderia esclarecer melhor a relação entre a exposição, a reinfeção e o desfecho da resposta imune na infecção por *S. mansoni*.

Capítulo 3

Resposta imune celular, *in vitro*, dos diferentes grupos de crianças e adolescentes infectados por *S. mansoni*, antes e após o tratamento com o quimioterápico praziquantel.

Objetivos específicos:

- Determinar o perfil fenotípico de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) na ativação e exaustão, bem como das subpopulações de linfócitos T CD4+ produtores de IL-9 e Th17, nos grupos NE, CB e CMA antes e 30 dias após o tratamento com praziquantel;
- Avaliar e comparar a produção de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de PBMCs estimulados com SWAP nos grupos NE, CB e CMA antes e 30 dias após o tratamento com praziquantel.

10. Materiais e Métodos: Capítulo 3

10.1. Obtenção do antígeno do verme adulto de *Schistosoma mansoni* (SWAP)

Para a obtenção do antígeno solúvel do verme adulto de *S. mansoni* (SWAP), foram utilizados camundongos Swiss, infectados com 100 cercárias do parasito, entre 45 e 50 dias, pós infecção. Posteriormente, foi realizada a perfusão sanguínea desses camundongos infectados, conforme descrito por Pellegrino & Siqueira (1956). Em seguida, os vermes adultos encontrados foram lavados, homogeneizados e concentrados em solução tampão fosfato (PBS - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3mM Na₂ HPO₄.7H₂O, 1,4 mM KH₂PO₄), sem o coquetel de inibidores de preteases, a qual foi mantida em gelo e submetida a três ciclos de sonicação a 30 segundos, com intervalo de 1 minuto. O homogenato foi então transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugado por 1 hora a 10.000g e o sobrenadante foi purificado em filtros com poros de 0,22 µm. Por fim, as proteínas solúveis do SWAP, foram quantificadas pela técnica de Lowry (1951), aliqüotadas em eppendorfs e armazenadas a -20° C.

10.2. Separação de células mononucleares do sangue periférico

PBMCs foram isolados por centrifugação em 10mL de Ficoll em tubos de falcon 50 mL, sob condições estéreis no laboratório, e em seguida centrifugados por 40 minutos a 400 g (1200 rpm) em temperatura ambiente. O anel contendo as células mononucleares, foi aspirado com o auxílio de uma pipeta e transferido para o tubo falcon contendo 30 mL de RPMI suplementado com penicilina / estreptomicina (100U/100mg/ mL), L-glutamina (2 mM) e HEPES (10 mM) (Invitrogen, San Diego, CA), e centrifugado novamente a 400g (1200 rpm) a 4°C, por 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em 1mL de RPMI e contadas com o auxílio de azul de tripan em câmara de Neubauer e ajustada em uma concentração final de 1×10^7 de células/mL em RPMI 1640. Após a contagem, as células foram ressuspensas em meio de congelamento com 90% de soro fetal bovino (SFB) e 10% de dimetil sulfóxido (DMSO). Ao final, as amostras foram colocadas em caixas NALDEGE em freezer -80°C e transferidas para o nitrogênio líquido até o momento da utilização.

10.3. Imunofenotipagem dos linfócitos TCD4+

A ativação e/ou proliferação de células T, *in vitro*, podem ser realizadas através do uso de vários mitógenos inespecíficos. O controle positivo para a ativação das células usado em nosso trabalho foi o PMA (acetato miristato de forbol), mediador de abundantes vias de sinalização intracelular, em sinergismo com a ionomicina que amplia e estimula a liberação de cálcio intracelular (CHATILA et al., 1989; OH-HORA, 2009). Os dados relacionados aos estímulos inespecíficos (PMA + I) das células das crianças e adolescentes nos diferentes grupos, podem ser visualizados no apêndice B.

Portanto, PBMCs foram distribuídos em tubos de cultura, com os seguintes estímulos: sem estímulo (SE) e controles positivos, isto é, os estímulos mitógeno PMA 0,05 µg/mL (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma USA), Ionomicina 50 ng/mL (Sigma, USA) e o antígeno solúvel do verme adulto SWAP, na concentração de 25 µg/mL. Os tubos foram incubados por 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C, com a adição de 5 µL de Brefeldina A/ mL (1:10 diluída em RPMI) nas últimas 6 horas de incubação. Posteriormente, as células foram retiradas da estufa e transferidas para tubos de FACS, lavadas com PBS 1x por duas vezes e, em seguida, cada tubo foi marcado com a adição de 1 µL do corante de viabilidade (BD Biosciences), para então serem incubados por 15 minutos ao abrigo de luz em temperatura ambiente. Após a lavagem com o PBS-Wash (PBS 1x; 0,5% de BSA; 0,1% de azida sódica), 20 µL dos anticorpos de superfície, diluídos em solução 50% de PBS Wash e 50% de PBS 1X, foram adicionados em cada tubo, de acordo com o painel estabelecido (Tabelas 10-11-12-13). As células foram incubadas por 30 minutos em 4°C e lavadas novamente com 2 mL da solução de PBS-Wash, sendo adicionado, em seguida, 250 µL de solução de fixação (BD Biosciences).

Para a marcação dos anticorpos intracelulares, foram realizadas todas as etapas anteriormente descritas. Após a solução de fixação, as células foram permeabilizadas com 1mL de permeabilization buffer (saponina 1:10 diluídos em água destilada) e centrifugadas em 2400 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 40 µL por tubos de anticorpos intracelulares, segundo o painel estabelecido (Figuras 10-12-13), que, por sua vez, foram diluídos em solução Tampão de permeabilização (saponina 1:10 diluídos em água destilada) e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação, os anticorpos foram lavados duas vezes com solução tampão permeabilization buffer (saponina) e PBS-Wash. Por fim, as células foram ressuspensas em 100 µL de PBS-W por tubo.

Tabela 10- Painel ativação de linfócitos

Marcação anticorpos de superfície					
Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Lote	Clone	Diluição
CD4	BV510	BD Biosciences	562970	SK3	0,65 µl/well
HLA-DR	PE-CY5	BD Biosciences	551375	TU36	1 µl/well
Marcação anticorpos intracelular					
CD69	PE-CY7	BD Biosciences	557745	FN50	1,5 µl/well
CD3	APC-H7	BD Biosciences	560176	SK7	0,65 µl/well
Corante de Viabilidade					
V700	FVS700	BD Biosciences	564997		1 µl/well

Listas de anticorpos usados no experimento, segundo o painel estabelecido

Tabela 11- Painel exaustão de linfócitos

Marcação anticorpos de superfície					
Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Lote	Clone	Diluição
CD4	BV510	BD Biosciences	562970	SK3	0,65 µl/well
TIM-3	PE-CF594 (CD366)	BD Biosciences	565560	7D3	1 µl/well
PD-1	APC	BD Biosciences	558694	MIH4	1 µl/well
Marcação anticorpo intracelular					
CD3	APC-H7	BD Biosciences	560176	SK7	0,65 µl/well
Corante de Viabilidade					
V700	FVS700	BD Biosciences	564997		1 µl/well

Listas de anticorpos usados no experimento, segundo o painel estabelecido

Tabela 12- Painel Th2/TCD4+ produtoras de IL-9

Marcação anticorpo de superfície					
Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Lote	Clone	Diluição
CD4	BV510	BD Biosciences	562970	SK3	0,65 µl/well
Marcação anticorpos intracelular					
CD3	APC-H7	BD Biosciences	560176	SK7	0,65 µl/well
IL-4	PE	BD Biosciences	559333	8D4-8	1,5 µl/well
IL-9	BV421	BD Biosciences	564254	MH9A3	1,5 µl/well
IL-10	PECF594	BD Biosciences	562400	JES3-19F1	1,5 µl/well
Corante de Viabilidade					
V700	FVS700	BD Biosciences	564997		1 µl/well

Listas de anticorpos usados no experimento, segundo o painel estabelecido

Tabela 13- Paineis Th17

Marcação anticorpos de superfície

Anticorpo	Fluorocromo	Marca	Lote	Clone	Diluição
CD4	BV510	BD Biosciences	562970	SK3	0,65 µl/well
CCR6	APC (CD196)	BD Biosciences	560619	11A9	1,5 µl/well
Marcação anticorpos intracelular					
CD3	APC-H7	BD Biosciences	560176	SK7	0,65 µl/well
IL-17	BV421	BD Biosciences	562933	N49-653	1,5 µl/well
ROR γ T	PE	BD Biosciences	563081	Q21-559	1,5 µl/well
Corante de Viabilidade					
V700	FVS700	BD Biosciences	564997		1 µl/well

Listas de anticorpos usados no experimento, segundo o painel estabelecido

Na leitura no citômetro de fluxo, (LRSFortessa, Becton Dickinson, EUA) foi adquirida uma média de 50.000 eventos dentro do gate, seguida pela análise dos dados, realizadas no software Flow Jo versão 10 (Tree Star Inc., EUA). Para o controle interno da citometria, além do controle de compensação, usou-se FMO (Fluorescence Minus One), para determinar o ponto de corte entre as populações positiva e negativas. A Figura 15 representa a ilustração dos diferentes painéis estabelecidos e a Figura 16 a estratégia de análise.

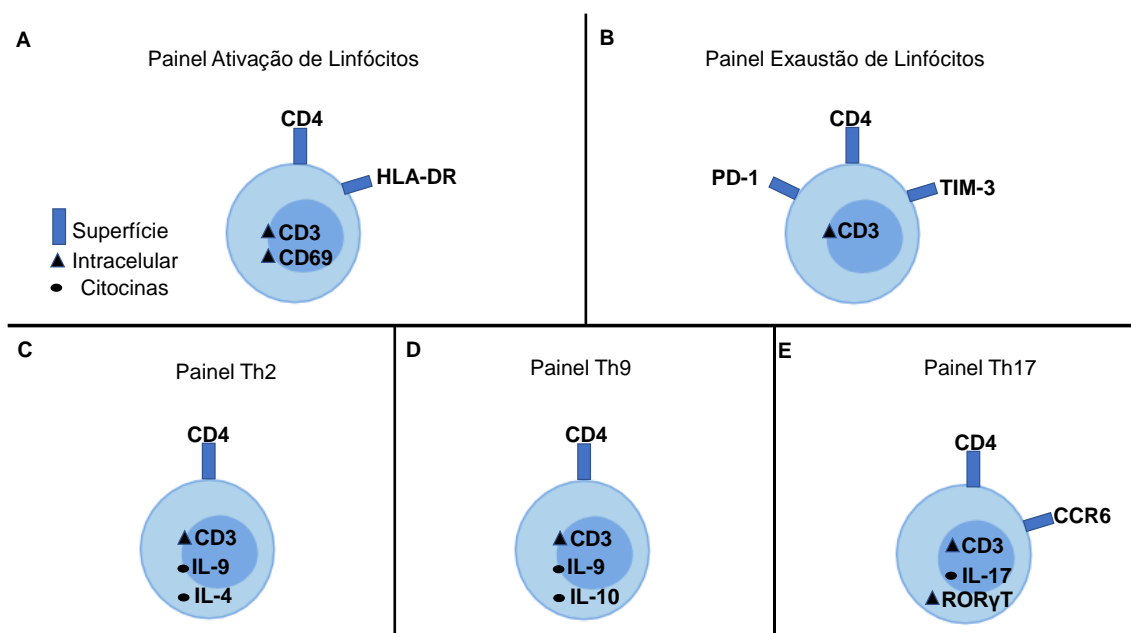


Figura 15 - Ilustração dos painéis estabelecidos: **(A)** Painel ativação de linfócitos com os marcadores de células TCD4⁺ (CD3⁺, CD4⁺), HLA-DR e CD69. **(B)** Painel de Exaustão PD-1 e TIM-3. **(C-D)** Painel Th2 / e linfócitos produtores de IL-9 **(E)** Painel Th17, CCR-6 e ROR γ T.

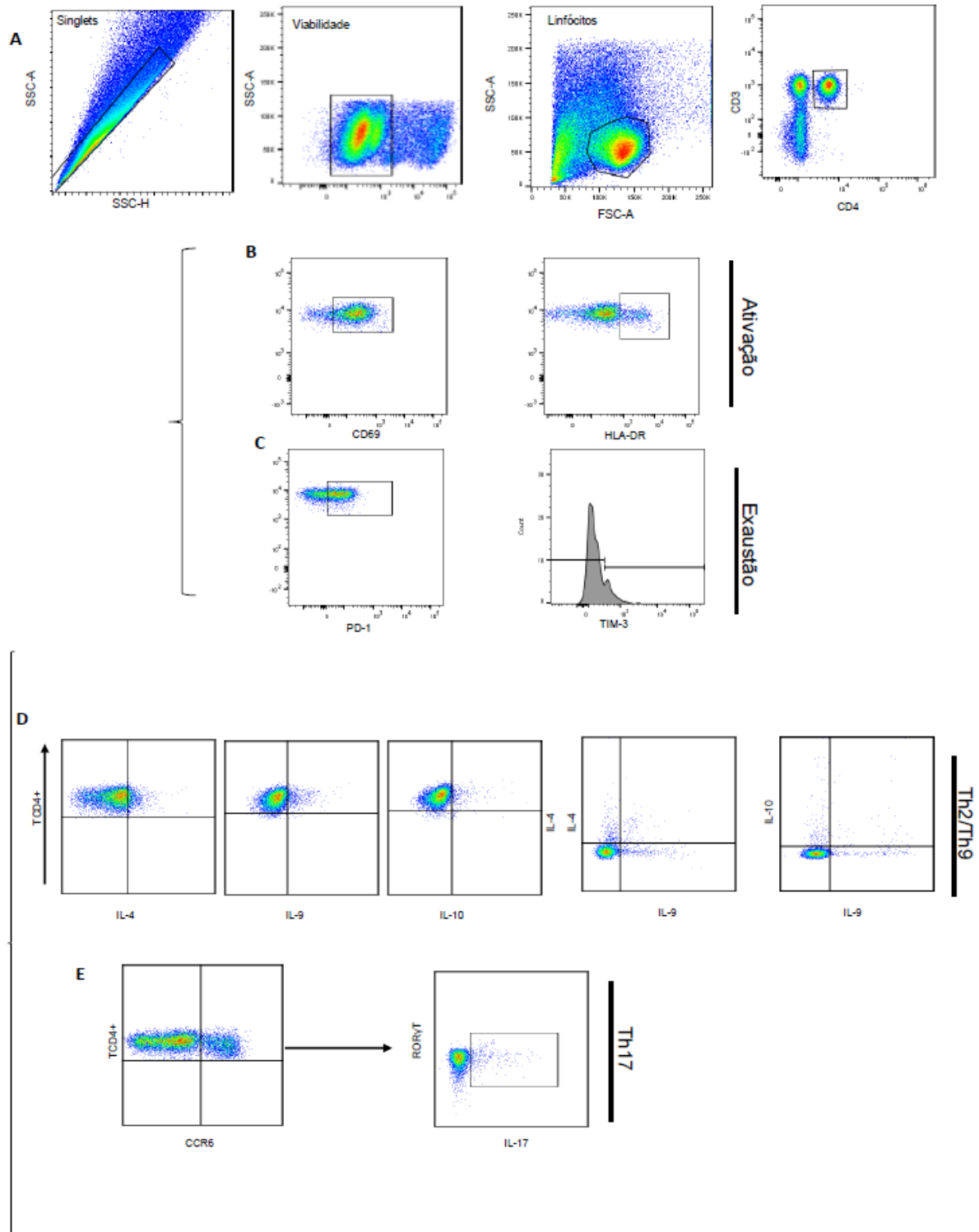


Figura 16 - Estratégia de análise dos diferentes painéis: **(A)** Análise comum a todos os painéis, Singlets, Viabilidade, SSC-A/FSC-A (tamanho e granulosidade) para linfócitos e duplo positivo CD3-CD4. **(B)** painel ativação, TCD4⁺/ CD69 e TCD4⁺/ HLA-DR. **(C)** painel exaustão TCD4⁺/ PD-1 e TIM-3. **(D)** painel Th2 e linfócitos produtores de IL-9, TCD4⁺/ IL-4, TCD4⁺/ IL-9, TCD4⁺/ IL-10, TCD4⁺/ IL-4⁺IL-9⁺ e TCD4⁺/ IL-9⁺IL-10⁺ conforme descrito por Anuradha & Babu 2017. **(E)** painel Th17, TCD4⁺/ CCR-6 e ROR γ T/ IL17.

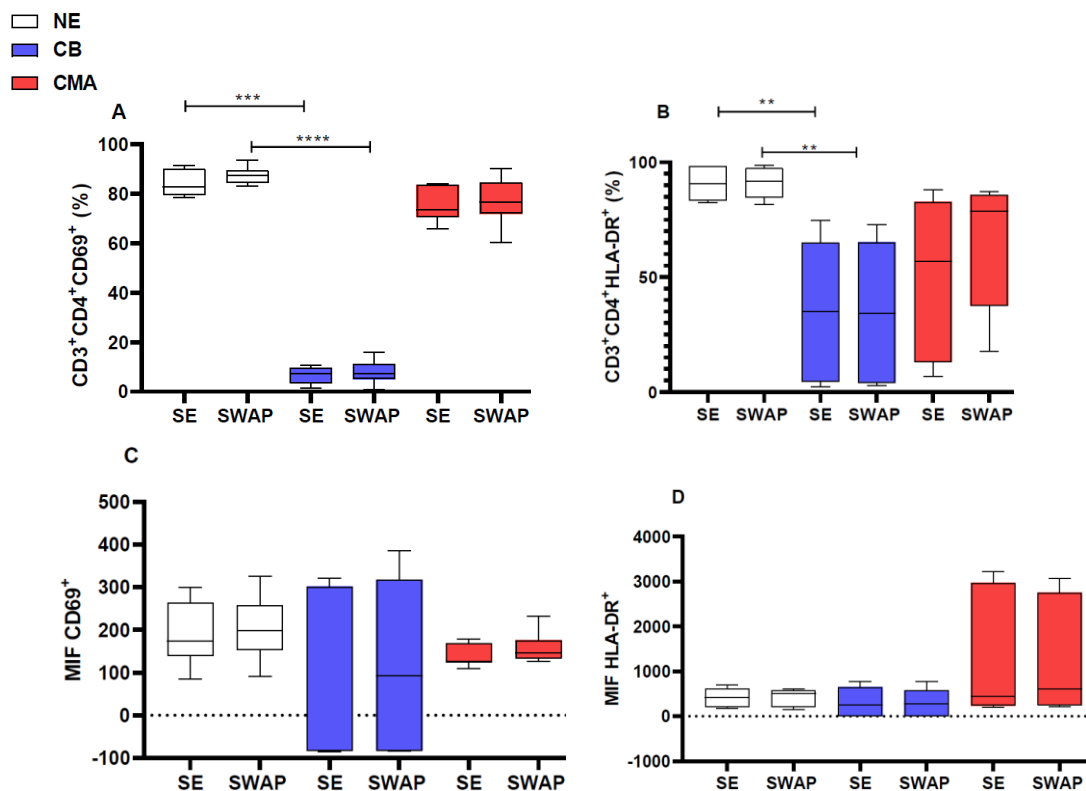
Para a determinação da detecção de citocinas e quimiocinas, utilizou-se os sobrenadantes da cultura de células (PBMCs), com os mesmos estímulos descritos

anteriormente. Foram realizadas incubações de 48h e 72h para a quantificação de citocinas e quimiocinas IL-5 (1,72–1.500 pg/ml), IL-13 (46–6.000 pg/ml), CCL11(7,8–1.000 pg/ml), CCL17 (3,9–500 pg/ml), TNF- α (7,8–1.000 pg/ml), IL-27 (78,13–10.000 pg/ml), MIF (31,2 – 2.000 pg/ml) e IL-10 (15,63–2.000 pg/ml) pelo ensaio de Elisa sanduíche, conforme descrito no item 7.2 do capítulo 2.

11. Resultados: Capítulo 3

11.1. Ativação de linfócitos T CD4 antes do tratamento com praziquantel T0.

Os marcadores de ativação recente CD69 e tardia HLA-DR (MHC de classe II) foram utilizados para avaliar o perfil de ativação dos linfócitos em indivíduos infectados ou não por *S. mansoni*. O grupo CB apresentou menor porcentagem dos marcadores CD69 e HLA-DR em comparação ao grupo NE sem estímulo (SE) e com estímulo (SWAP) (Figuras 17A e B), porém não foi observado diferença significativa entre a intensidade média de fluorescência entre os grupos (Figuras 17C e D). Entretanto, ao investigar os linfócitos absolutos positivos para o marcador CD69 e HLA-DR, apenas o primeiro apresentou diferença significativa. Portanto, o grupo CB continua sendo o grupo com menor produção dessas células, em relação ao grupo NE (SE e SWAP) e o grupo CMA (SWAP) (Figuras 17E e F).



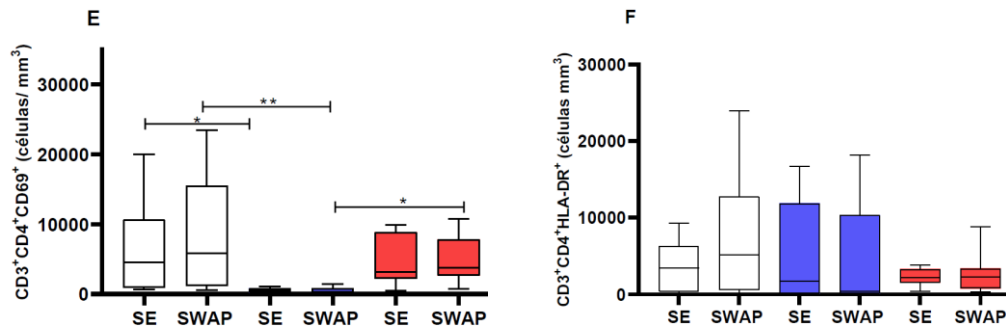


Figura 17 - Paineis de Ativação de linfócitos TCD4⁺, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo NE na coluna branca no T0 (n=10); CB na coluna azul no T0 (n=10); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de CD69, (B) porcentagem de HLA-DR, (C) Intensidade média de fluorescência (MIF) de CD69, (D) MIF de HLA-DR, (E) linfócitos absolutos CD69 (F) linfócitos absolutos de HLA-DR. Os resultados são expressos por mediana e interquartis. Os símbolos *, **, *** e **** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's.

11.2. Ativação de linfócitos T CD4⁺ após o tratamento com praziquantel T30d.

Após o tratamento houve um aumento da porcentagem do marcador CD69 no grupo CB (SWAP), o qual também apresentou uma maior porcentagem de CD69 em relação ao grupo CMA (SWAP) no T30d. Diferentemente, no grupo CMA (SE e SWAP) houve uma diminuição da porcentagem do marcador CD69 após o tratamento (Figura 18A). Por sua vez, a porcentagem do marcador HLA-DR foi semelhante entre os grupos, pois tanto o CB quanto o CMA diminuíram a porcentagem desse marcador após o tratamento (Figura 18B). Em relação à expressão de CD69, no grupo CB não houve diferença significativa nos diferentes tempos, porém foi encontrada diferença significativa no aumento da expressão de CD69 entre o grupo CB (SE e SWAP) e o grupo CMA (SE e SWAP) no T30d (Figura 18C). Contudo, na avaliação dos linfócitos absolutos de CD69, o grupo CB (SE e SWAP) apresentou um aumento dessas células no T30d, enquanto o grupo CMA (SWAP) apresentou uma diminuição no mesmo período (Figura 18E). Não foram observadas diferenças significativas na expressão e nos linfócitos absolutos de HLA-DR (Figuras 18D e F).

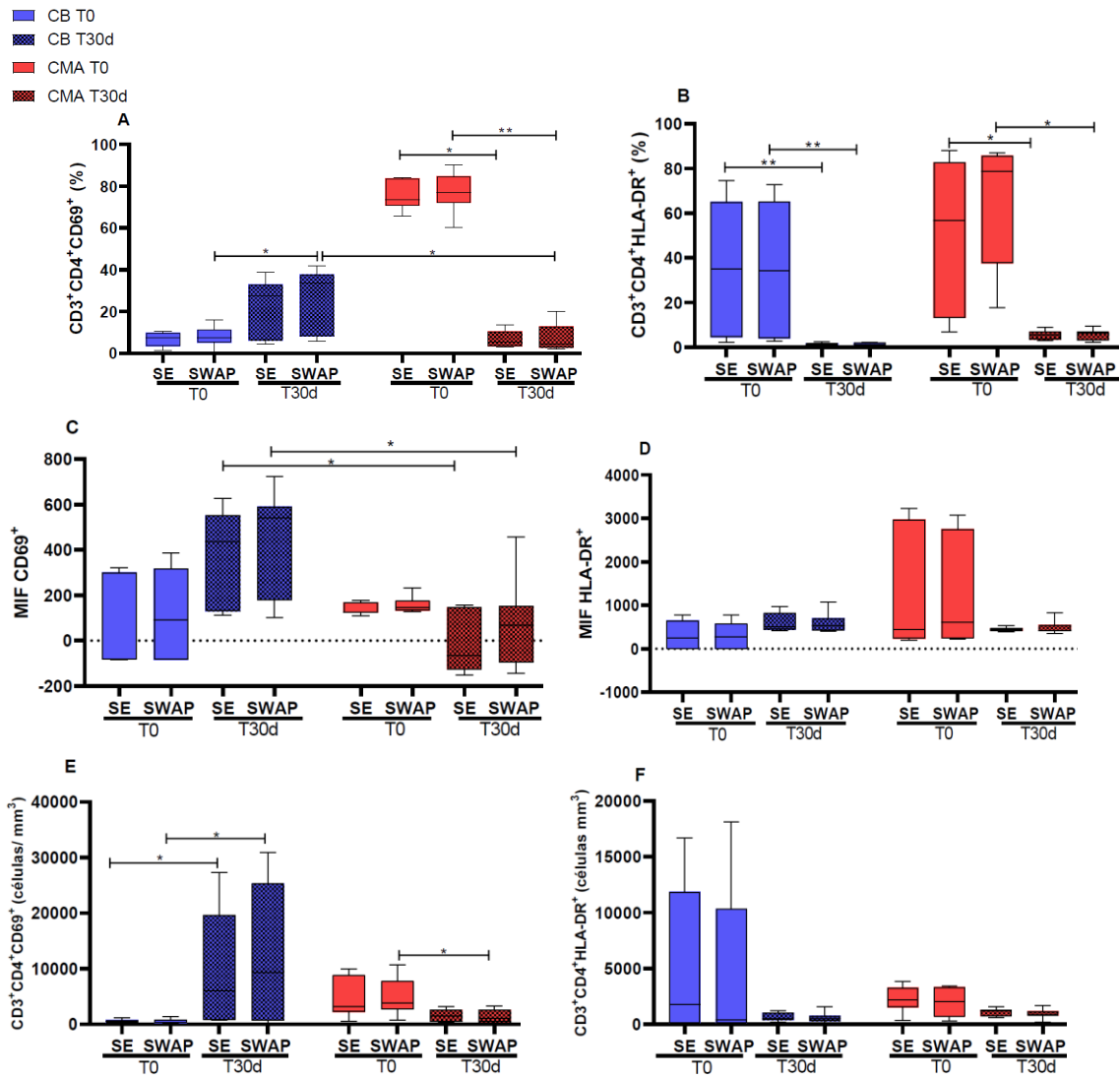


Figura 18- Paineil Ativação de linfócitos TCD4⁺, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo CB na coluna azul no T0 (n=10) e T30d (n=8); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9) e T30d (n=8), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de CD69, (B) porcentagem de HLA-DR, (C) média intensidade de fluorescência (MIF) de CD69, (D) MIF de HLA-DR, (E) linfócitos absolutos CD69 (F) linfócitos absolutos de HLA-DR. Os resultados são expressos por mediana e interquartis. Os símbolos * e ** indicam p ≤ 0,05 e p ≤ 0,01, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's.

11.3. Exaustão de Linfócitos TCD4+ antes do tratamento com praziquantel T0.

Após a avaliação da ativação dos linfócitos TCD4+, avaliou-se também a sua capacidade de entrar em exaustão quando estimulados com SWAP após 24 horas, para o qual foram utilizados marcadores de exaustão/ativação TIM-3 e PD1 expressos na membrana celular. Os diferentes grupos no T0 apresentaram resultados similares para a porcentagem, expressão e os linfócitos absolutos, sem diferenças significativas (Figuras 19A-F)

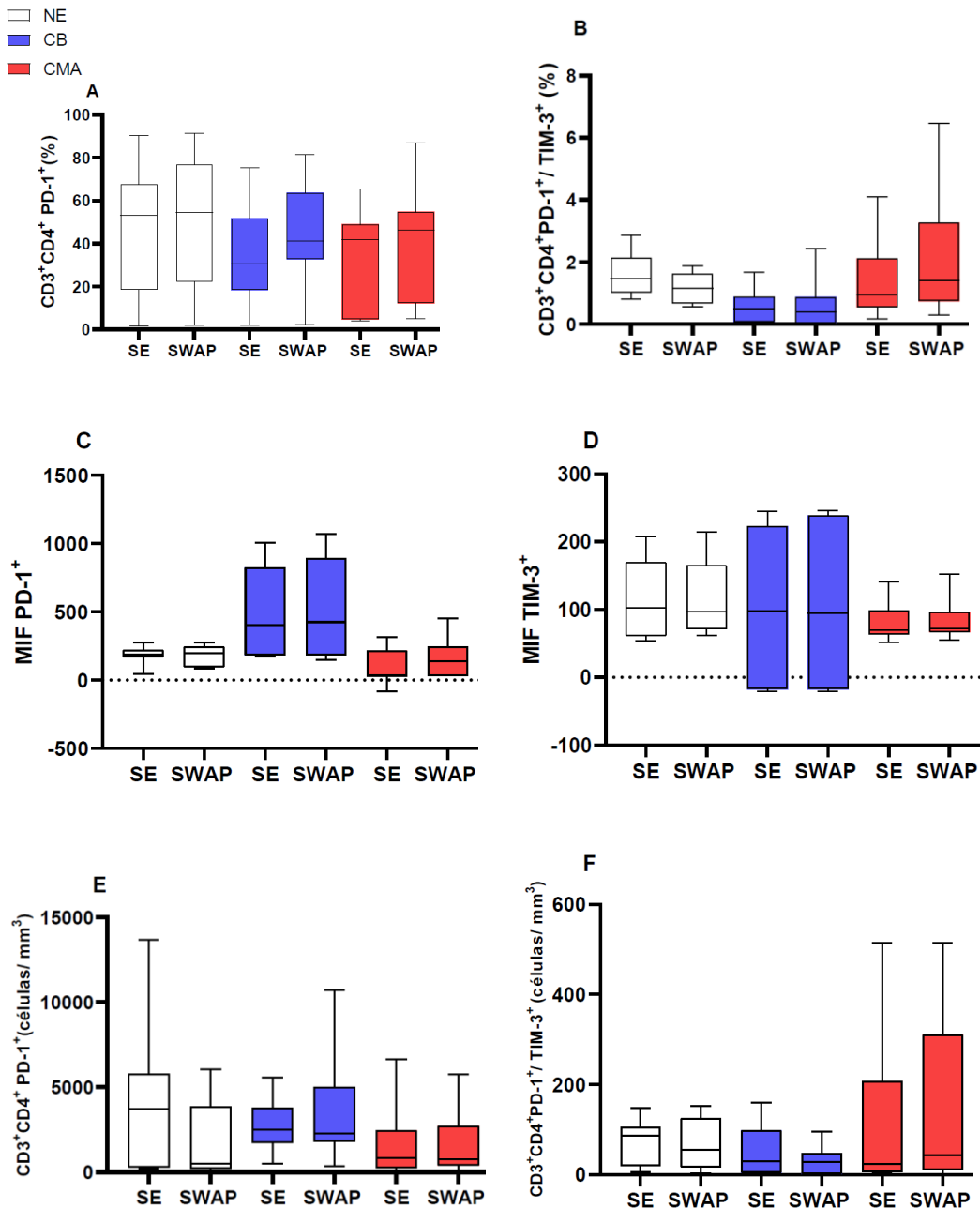


Figura 19 - Paineis de Exaustão de linfócitos TCD4⁺, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo NE na coluna branca no T0 (n=10); CB na coluna azul no T0 (n=10); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de TCD4⁺ PD-1⁺; (B) porcentagem de TIM-3 [TCD4⁺ PD-1], (C) MIF PD-1, (D) MIF de TIM-3, (E) linfócitos absolutos PD-1, (F) linfócitos absolutos TIM-3. Os resultados são expressos como mediana e interquartis. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Todos os dados acima são ns (p ≥ 0,05).

11.4. Exaustão de Linfócitos TCD4⁺ após o tratamento com praziquantel T30d.

Após o tratamento, não houve diferenças significativas no grupo CB em relação à porcentagem de PD-1, entretanto, o grupo CMA (SWAP), diminuiu a porcentagem desse marcador no T30d. (Figura 20 A). Quanto à expressão do PD1, esta foi maior tanto para o grupo CB (SE e SWAP) quanto para o CMA (SE e SWAP) no T30d. Ao se comparar ambos os grupos, o grupo CB (SWAP) apresentou maiores expressões de PD-1 que o CMA (SWAP) no T30d (Figura 20B). Por sua vez, para os linfócitos absolutos positivos para o marcador PD-1, apenas o grupo CB (SWAP) apresentou uma maior produção dessas células quando comparado ao grupo CMA (SWAP) no T30d (Figura 20C).

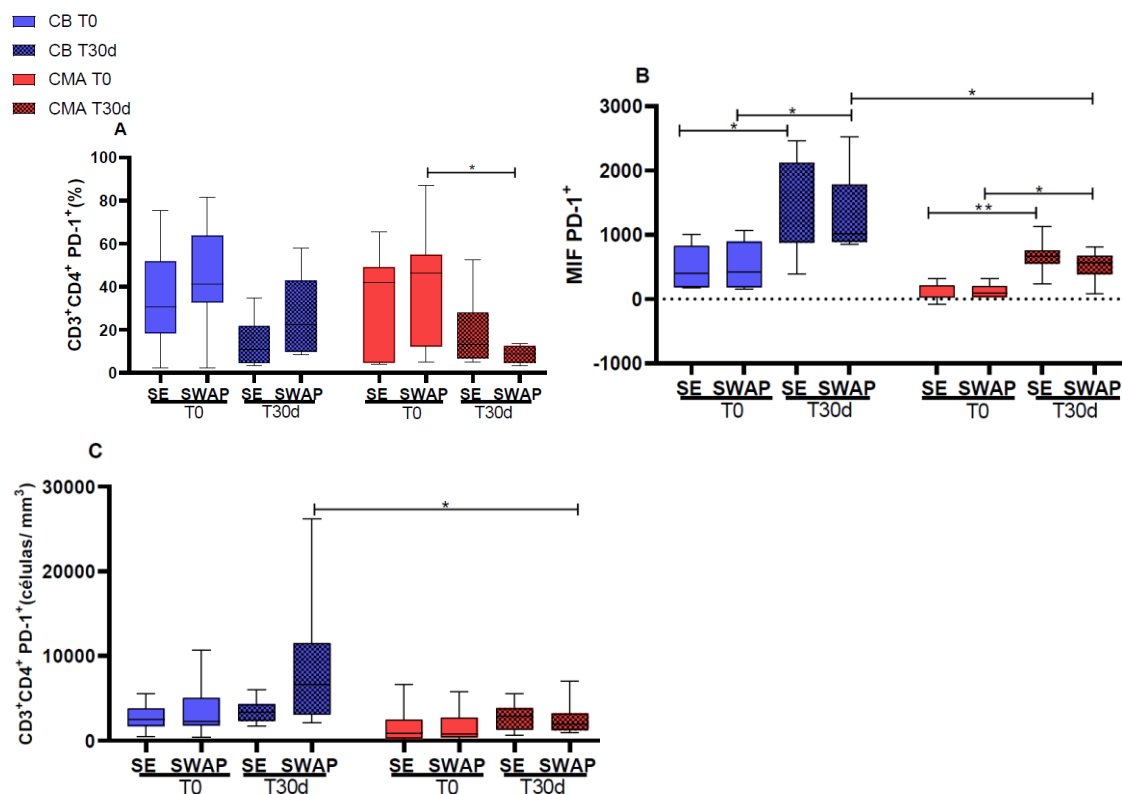
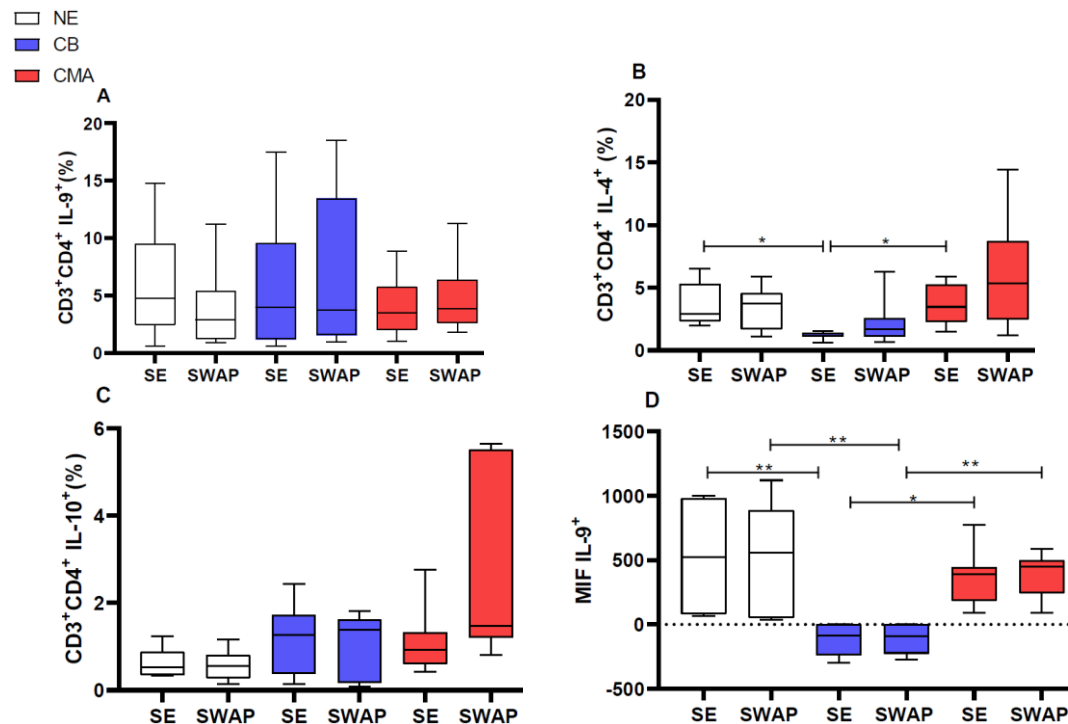


Figura 20- Paineis de Exaustão de linfócitos TCD4⁺, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo CB na coluna azul no T0 (n=10) e T30d (n=8); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9) e T30d (n=8), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de TCD4⁺ PD-1⁺; (B) MIF PD-1, (C) linfócitos absolutos PD-1. Os resultados são expressos por mediana e interquartis. Os símbolos * e ** indicam p ≤ 0,05 e p ≤ 0,01, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's.

11.5. Paineil Th2 e TCD4+ produtoras de IL-9 antes do tratamento com praziquantel T0.

A estratégia de análise e seleção de populações de células produtoras de IL-9, foi determinada pelo trabalho de Rajamanickam & Babu, 2017. Na expressão de células em humanos a influência de citocinas IL-4 e TGF- β , estimulam a diferenciação de células TCD4+, que tem a capacidade de produzir IL-9 isoladamente ou em conjunto com IL-10, sem expressar IL-4 (ANURADHA et al., 2016).

A porcentagem da citocina IL-9 e IL-10 não foram observadas diferenças significativas (Figuras 21A e C), porém, para a IL-4 a porcentagem foi maior nos grupos NE (SE) e CMA (SE), em relação ao grupo CB (Figura 21B). O CB foi o grupo com menor expressão de IL-9, IL-4 e IL-10 quando se avaliou a intensidade média de fluorescência dessas citocinas (Figuras 21D-F). Com relação à investigação dos linfócitos absolutos positivos para cada citocina, observou-se que, não houve diferença significativa entre os grupos para a IL-9 (Figura 21G), porém, a citocina IL-4 foi maior no grupo CB (SWAP) em relação ao NE (SWAP) (Figura 21 H) e a citocina IL-10 foi maior no grupo CB (SE e SWAP) em comparação ao NE (SE e SWAP) (Figura 21 I).



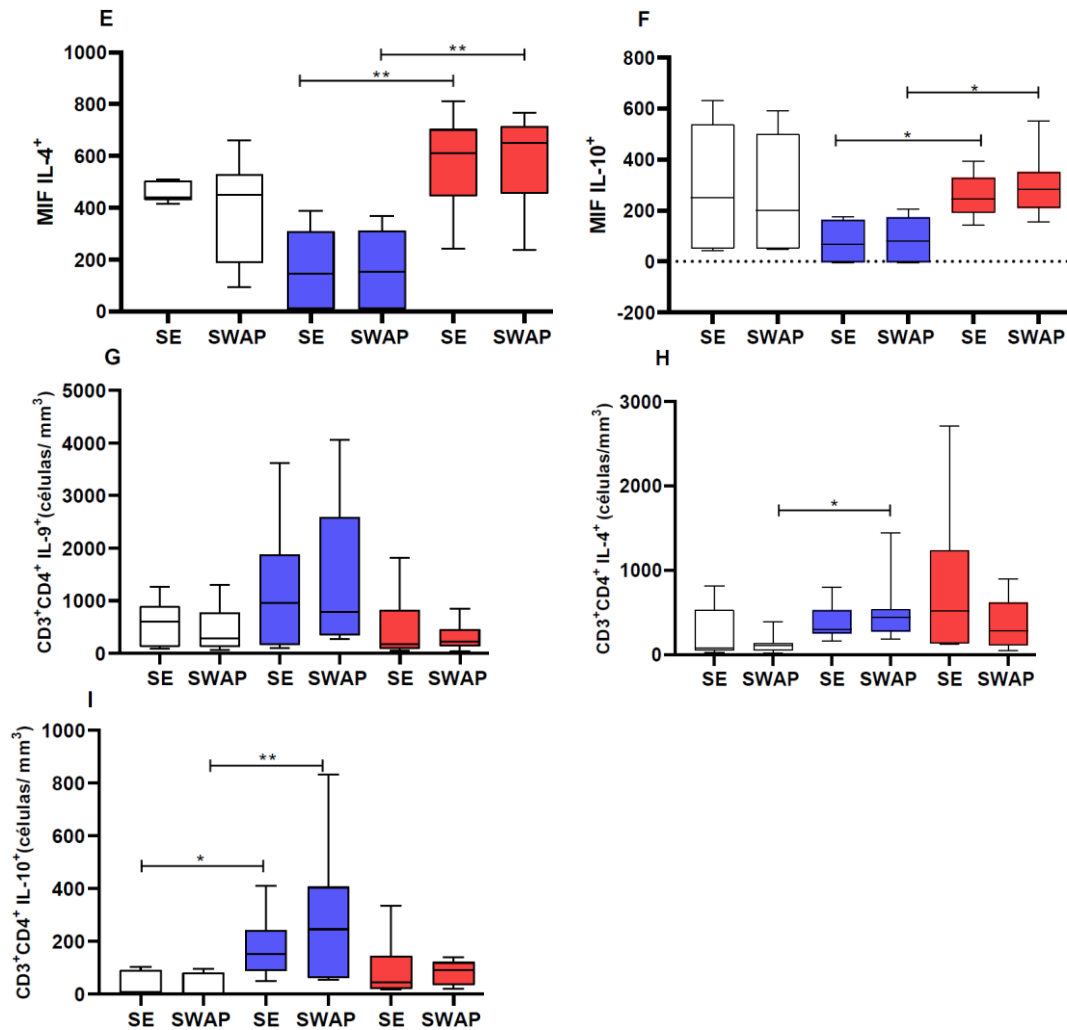
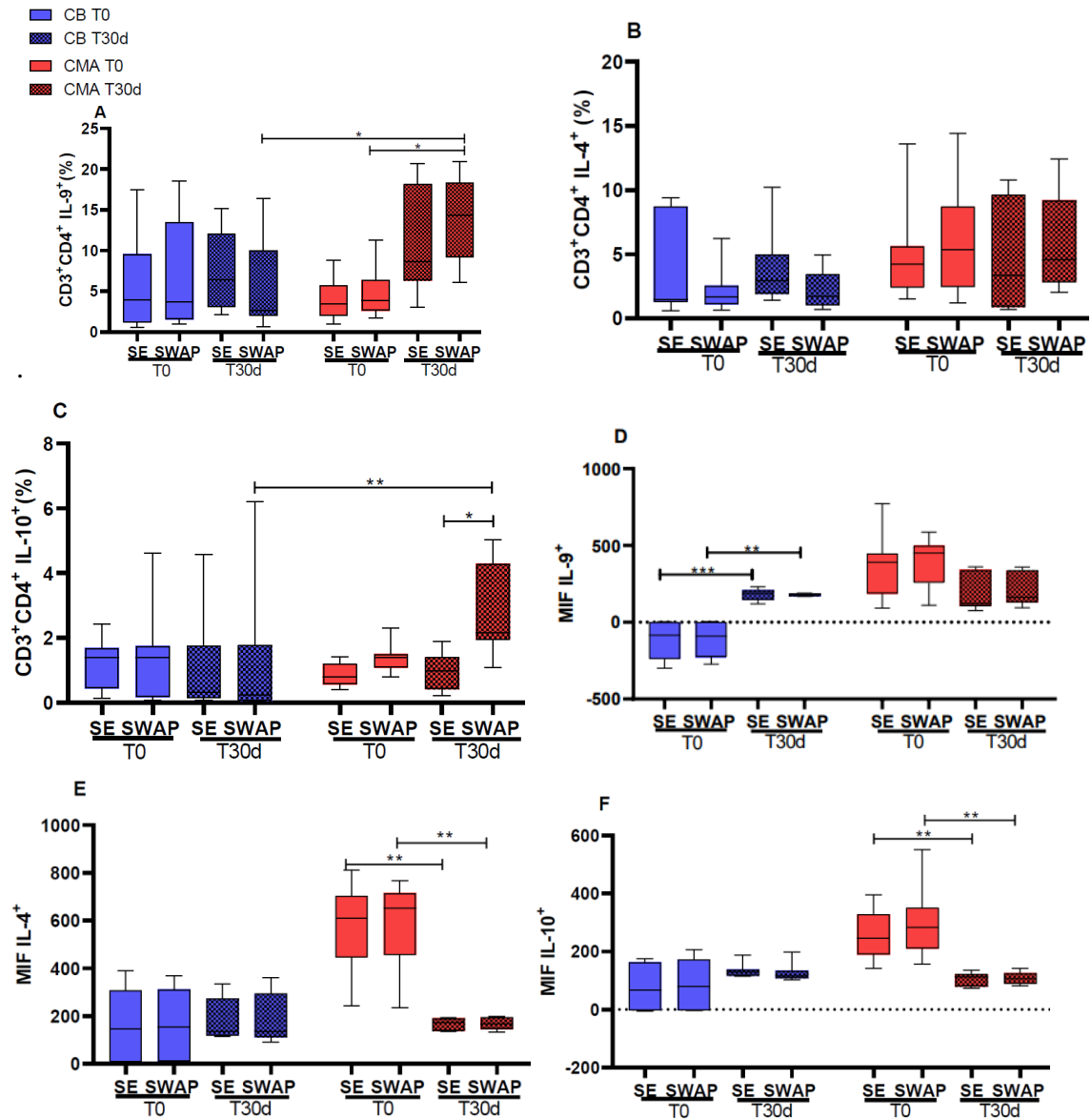


Figura 21 - Paineis Th2 e TCD4⁺ produtoras de IL-9, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo NE na coluna branca no T0 (n=10); CB na coluna azul no T0 (n=10); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de IL-9; (B) porcentagem de IL-4; (C) porcentagem de IL-10; (D) MIF de IL-9; (E) MIF de IL-4; (F) MIF de IL-10; (G) linfócitos absolutos de IL-9; (H) linfócitos absolutos de IL-4; (I) linfócitos absolutos de IL-10. Os resultados são expressos com mediana e interquartis. Os símbolos * e ** indicam p < 0,05 e p < 0,01, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's.

11.6. Paineis Th2 e TCD4⁺ produtoras de IL-9: após o tratamento com praziquantel T30.

Após o tratamento, a porcentagem das citocinas IL-9 e IL-10 aumentou no grupo CMA (SWAP), a qual também foi maior em comparação ao grupo CB (SWAP) no T30d (Figuras 22 A e C). Entretanto, não houve diferença significativa na porcentagem da citocina IL-4 (Figura 22 B), entre os grupos avaliados no T0 e T30d. O grupo CB não apresentou expressão de IL-9 no T0, mas, após o tratamento aumentou significativamente essa citocina (Figura 22D). Por outro lado, no grupo CMA (SE e SWAP) a intensidade média de fluorescência das citocinas IL-4 e IL-10 diminuíram após o tratamento (Figuras 22E e F). Enquanto, os linfócitos absolutos positivos para IL-9 foram maiores no grupo

CMA (SE) no T30d em relação ao T0 (Figura 22G). A IL-4 aumentou no grupo CB após o tratamento (SE e SWAP), assim como teve uma maior produção em comparação ao grupo CMA (SWAP) (Figura 22H). Para os linfócitos absolutos da citocina IL-10 não foi encontrado diferença significativa entre os grupos nos períodos avaliados (Figura 22I).



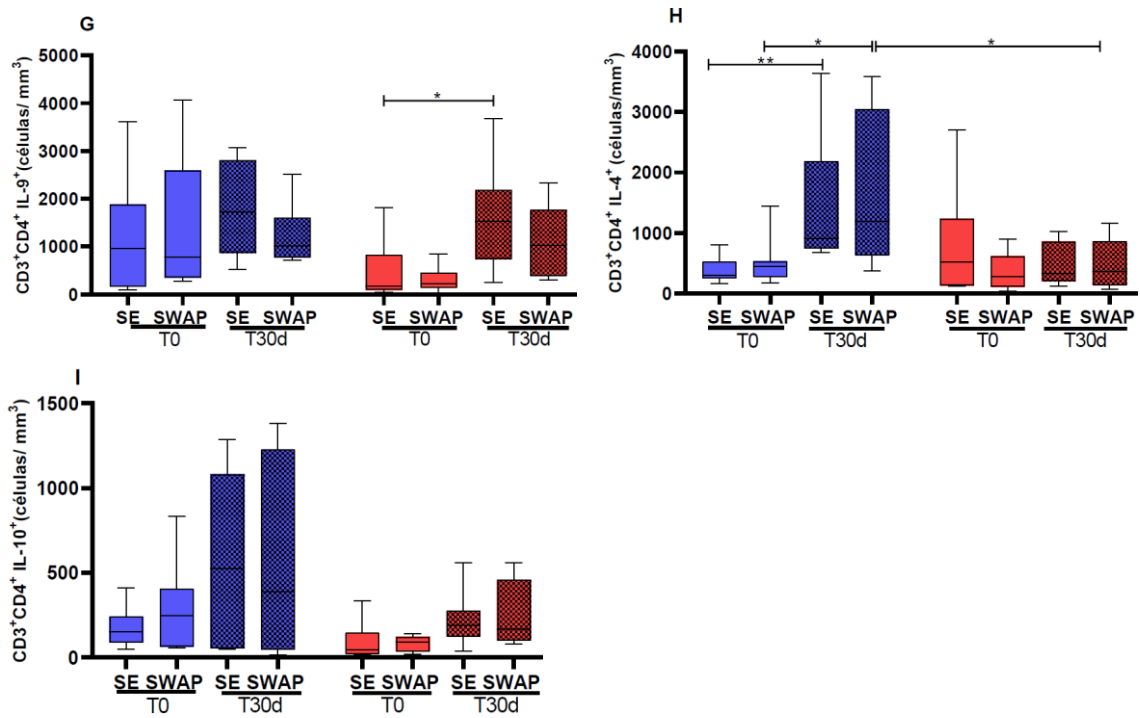
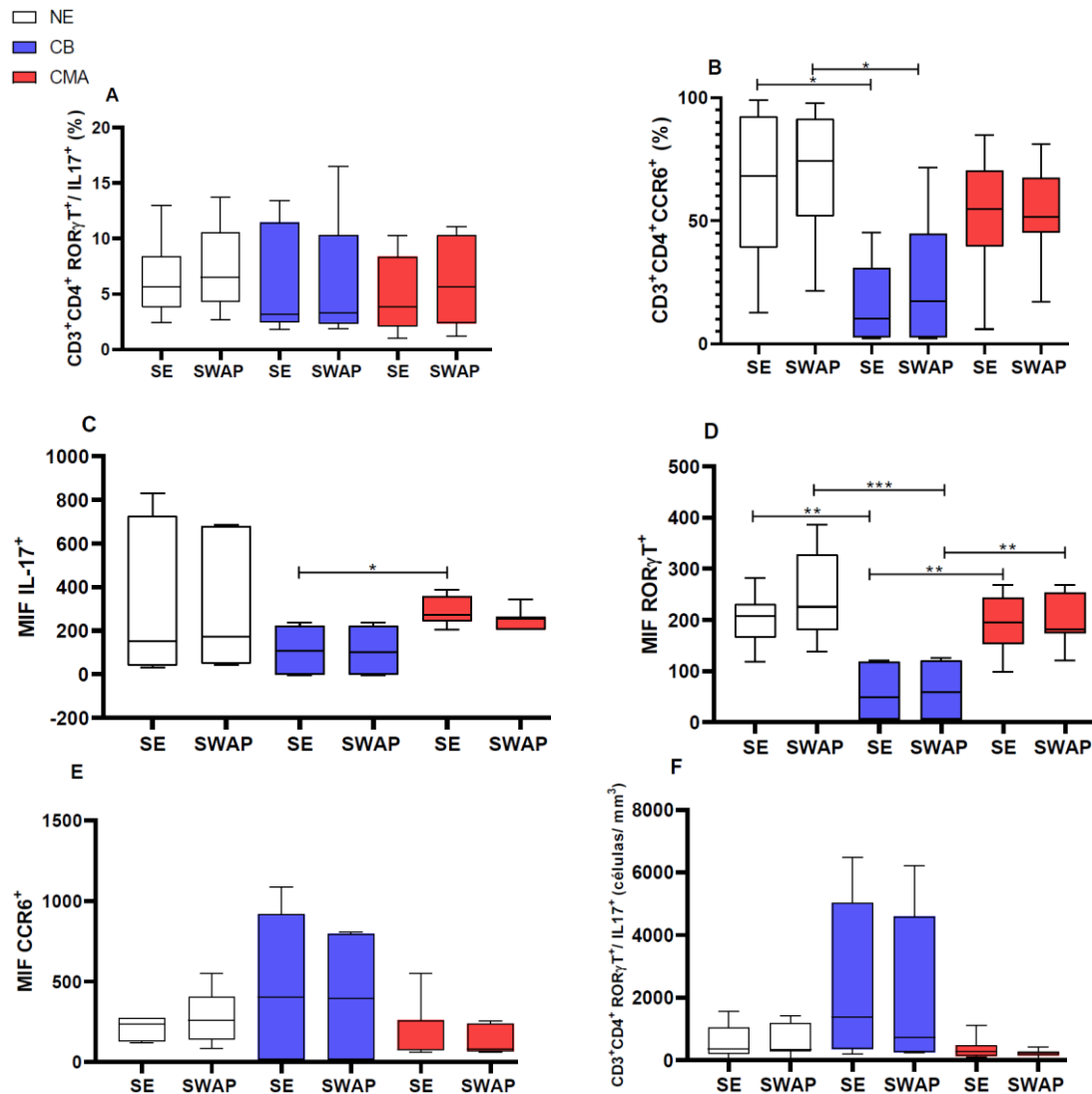


Figura 22- Paineis Th2 e TCD4⁺ produtoras de IL-9, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo CB na coluna azul no T0 (n=10) e T30d (n=8); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9) e T30d (n=8), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de IL-9; (B) porcentagem de IL-4; (C) porcentagem de IL-10; (D) MIF de IL-9; (E) MIF de IL-4; (F) MIF de IL-10; (G) linfócitos absolutos IL-9; (H) linfócitos absolutos IL-4; (I) linfócitos absolutos IL-10. Os resultados são expressos com mediana e interquartis. Os símbolos *, ** e *** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's.

11.7. Painel Th17 antes do tratamento com praziquantel T0

Os marcadores ROR γ T, a citocina IL-17 e o receptor de quimiocina CCR-6 foram utilizados para avaliar se ocorre uma modulação para uma resposta inflamatória Th17 na infecção por *S. mansoni*. A porcentagem de ROR γ T/IL17 encontrada foi semelhante em todos os grupos (Figura 23A), entretanto, o grupo NE (SE e SWAP) apresentou maior porcentagem do marcador CCR-6 que o grupo CB (Figura 23B). Por sua vez, a intensidade média de fluorescência de IL-17 e ROR γ T foi menor no grupo CB que nos outros grupos (Figuras 23C e D). Enquanto na expressão de CCR-6 e linfócitos absolutos não foi observado diferença significativa entre os diferentes grupos (Figuras 23E-G)



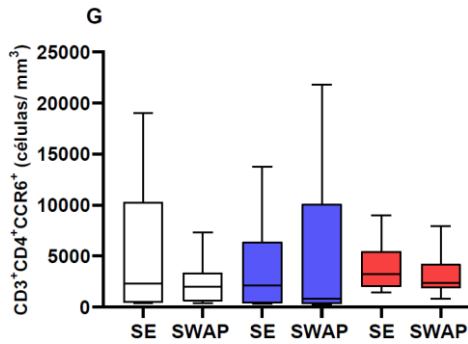
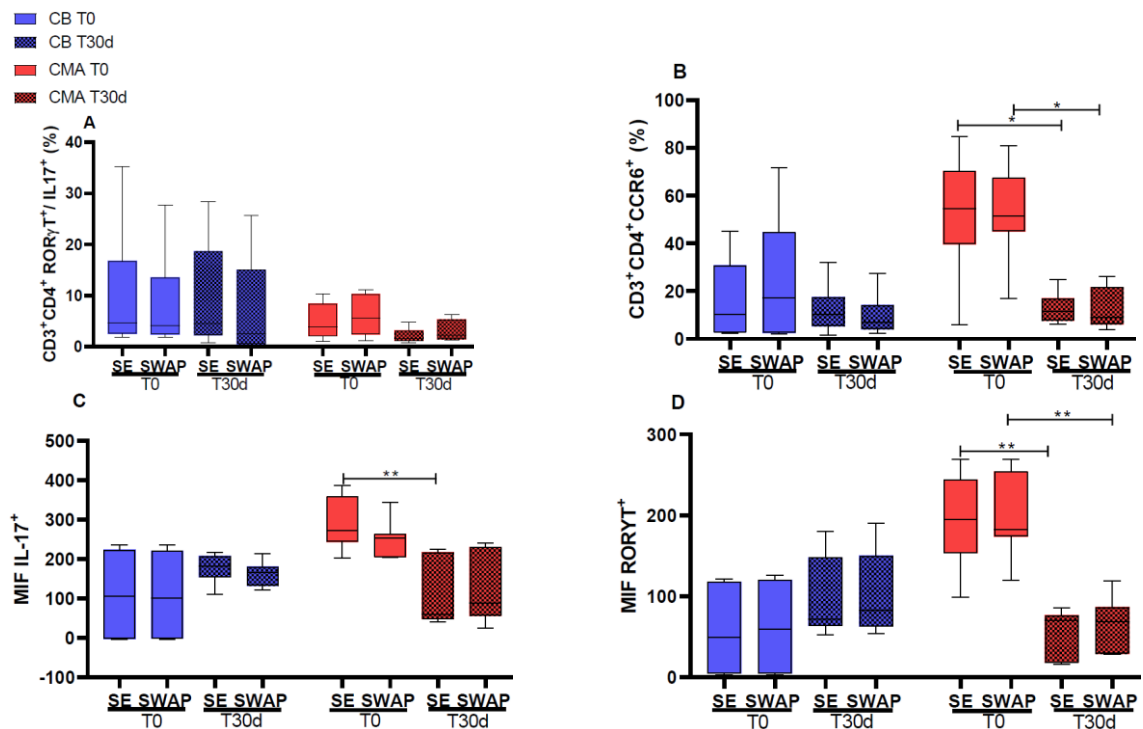


Figura 23 - Paineis Th17, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo NE na coluna branca no T0 (n=10); CB na coluna azul no T0 (n=10); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE) (A) porcentagem de ROR γ T/ IL-17; (B) porcentagem de CCR6; (C) MIF de IL-17; (D) MIF de ROR γ T; (E) MIF de CCR6 (F) linfócitos absolutos de ROR γ T/ IL-17; (G) linfócitos absolutos de CCR6. Os resultados são expressos com mediana e interquartis. Os símbolos *, ** e *** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's.

11.8. Paineis Th17 após o tratamento com praziquantel T30d.

Após o tratamento não foi encontrada diferença significativa na porcentagem de ROR γ T/IL17 (Figura 24A) nos grupos em relação ao T0. No entanto, no grupo CMA a porcentagem do marcador CCR6 e a intensidade média de fluorescência de IL-17 e ROR γ T, diminuíram após o tratamento (Figura 24B-D). Ao passo que, a intensidade média de fluorescência de ROR γ T/IL17, CCR6 e nos Linfócitos absolutos não houve diferenças significativa nos grupos antes e após o tratamento (Figura 24E-G). Contudo o grupo CB não induziu uma resposta inflamatória de células Th17 após o tratamento.



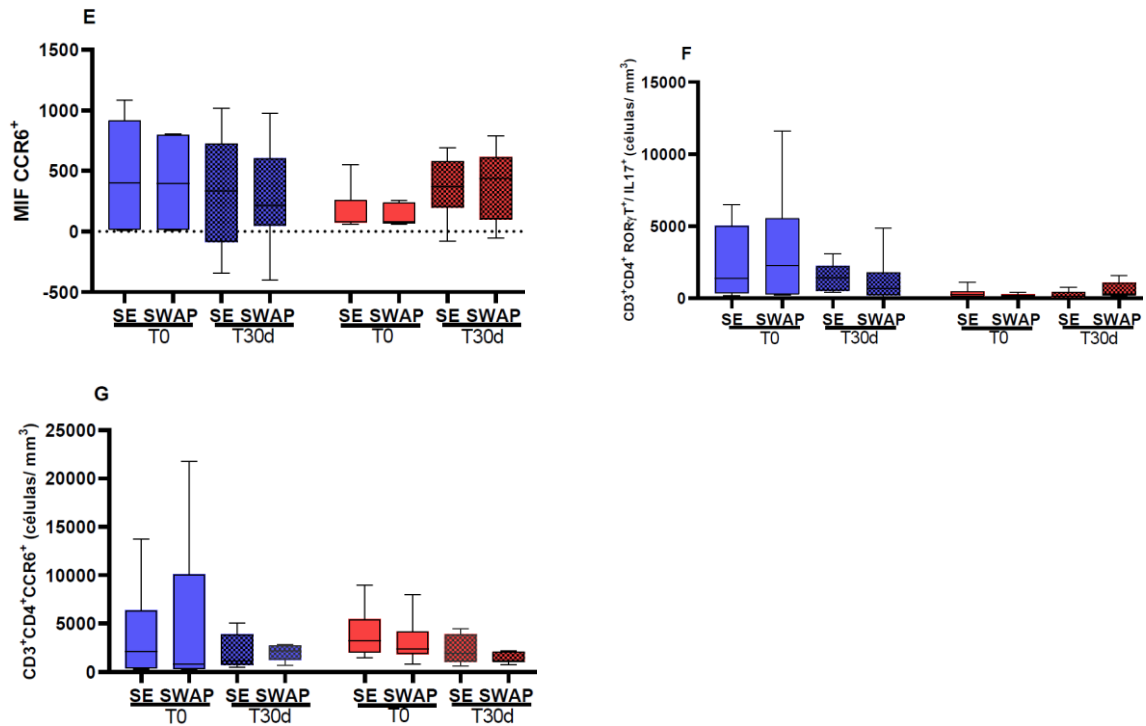


Figura 24- Paineis Th17, após 24 horas de estímulo específico (SWAP) e células sem estímulo (SE). O grupo CB na coluna azul no T0 (n=10) e T30d (n=8); CMA na coluna vermelha no T0 (n=9) e T30d (n=8), com estímulo (SWAP) e sem estímulo (SE). (A) porcentagem de ROR γ T/ IL-17; (B) porcentagem de CCR6; (C) MIF de IL-17; (D) MIF de ROR γ T; (E) MIF de CCR6; (F) linfócitos absolutos de ROR γ T/ IL-17; (G) linfócitos absolutos de CCR6. Os resultados são expressos com mediana e interquartis. Os símbolos * e ** indicam $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's.

11.9. Avaliação e comparação da produção de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de PBMCs estimulados com SWAP nos grupos NE, CB e CMA antes e após o tratamento com praziquantel.

A seleção do melhor tempo de incubação (48h ou 72h) foi baseada na detecção das maiores medianas, ou seja, na maior detecção para cada citocina e quimiocina. Portanto, na incubação de 48 horas (linha contínua) ficaram somente as citocinas IL-13 e IL-10 (SE T0 e SWAP T30d) (Figuras 25A e D). Enquanto a incubação de 72 horas (linha tracejada) foi selecionada para o restante das citocinas e quimiocinas (Figuras 25 B e C).

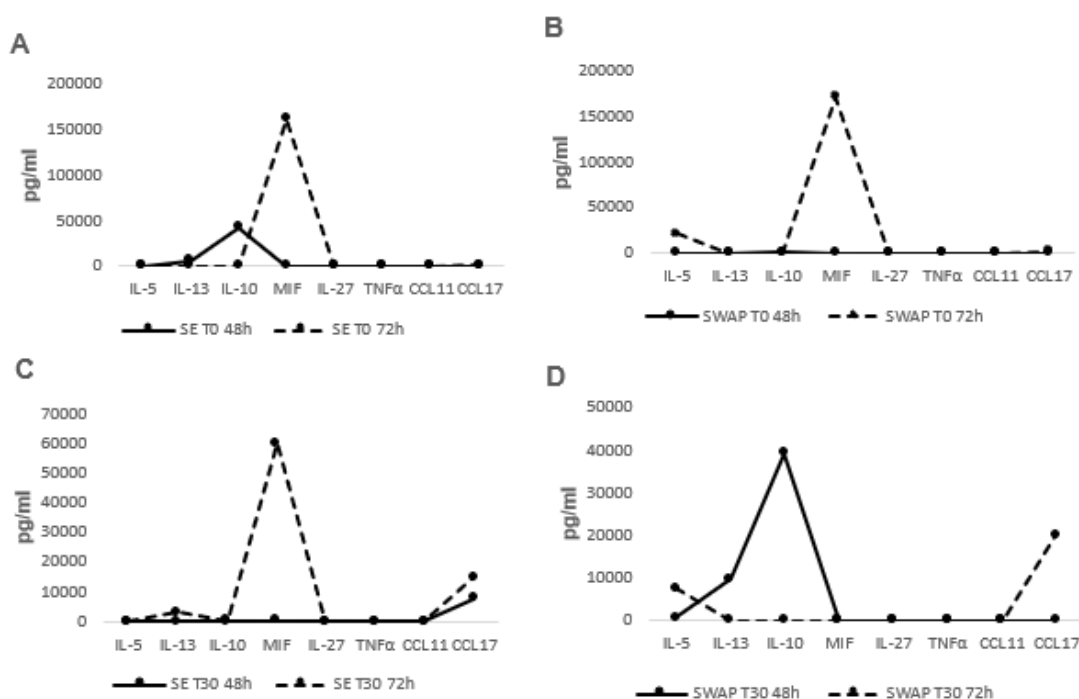


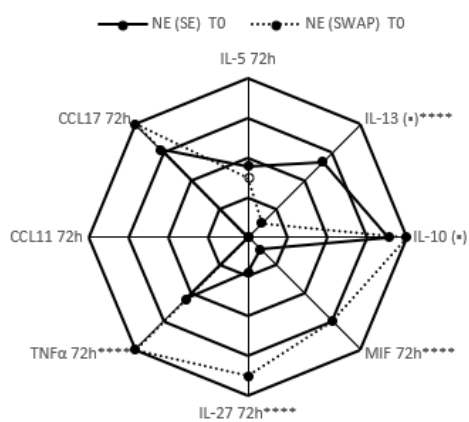
Figura 25- Detecção de citocinas e quimiocinas (pg/mL), em sobrenadante de PBMCs, nos diferentes tempos, estímulos e incubações. **(A)** detecção de citocinas e quimiocinas sem estímulo (SE) no tempo zero (T0), com 48 h (linha contínua) e 72h (linha tracejada); **(B)** detecção de citocinas e quimiocinas com estímulo (SWAP) no tempo zero (T0), com 48 e 72h; **(C)** detecção de citocinas e quimiocinas sem estímulo (SE) no tempo (T30d), com 48 h e 72h; **(D)** detecção de citocinas e quimiocinas com estímulo (SWAP) no tempo (T30d), com 48 h e 72h.

11.10. Respondedores de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes antes e após o tratamento com praziquatel.

Após a utilização dos sobrenadantes de PBMCs não estimulados (SE) e estimulados (SWAP), com incubações de 48 e 72h, os respondedores e não respondedores foram analisados, consequentemente, respondedores utilizados foram aqueles que tiveram a leitura acima de 10 pg/mL de cada citocina/quimiocina.

No T0, o grupo NE estimulado com SWAP, em comparação ao SE, apresentou um aumento das citocinas inflamatórias TNF- α , IL-27 e MIF (fator inibidor de migração de macrófagos), com frequências de 100%, 87,5% e 75% respectivamente (Figura 26A), e a diminuição da citocina IL-13, com frequência de 12,5%. Com a mesma comparação entre SWAP e SE no grupo CB (SWAP) T0, foi observado o aumento da citocina IL-5, com frequência de 60%, e a diminuição de IL-13, com frequência de 20% (Figura 26B). Após o tratamento, no grupo CB (SWAP) as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-27 e MIF foram significativamente reduzidas, com frequência de 11,1%, 44,4% e 0%, respectivamente. Da mesma forma, quando comparado ao SE, o grupo CB (SWAP) diminuiu a quimiocina CCL17, com frequência de 11,10% (Figura 26B). Por sua vez, o grupo CMA (SWAP), no T0, apresentou um aumento na frequência de IL-5 em 77,7% e uma redução na IL-13 e CCL17 em 33,3% e 55,5%, respectivamente, em comparação ao CMA (SE) (Figura 26C). Após o tratamento, o grupo CMA (SWAP) apresentou um aumento da citocina IL-13 em 100% e uma redução do MIF na frequência de 37,5% (Figura 26C). Mais detalhes das porcentagens observadas podem ser encontrados no apêndice C.

A



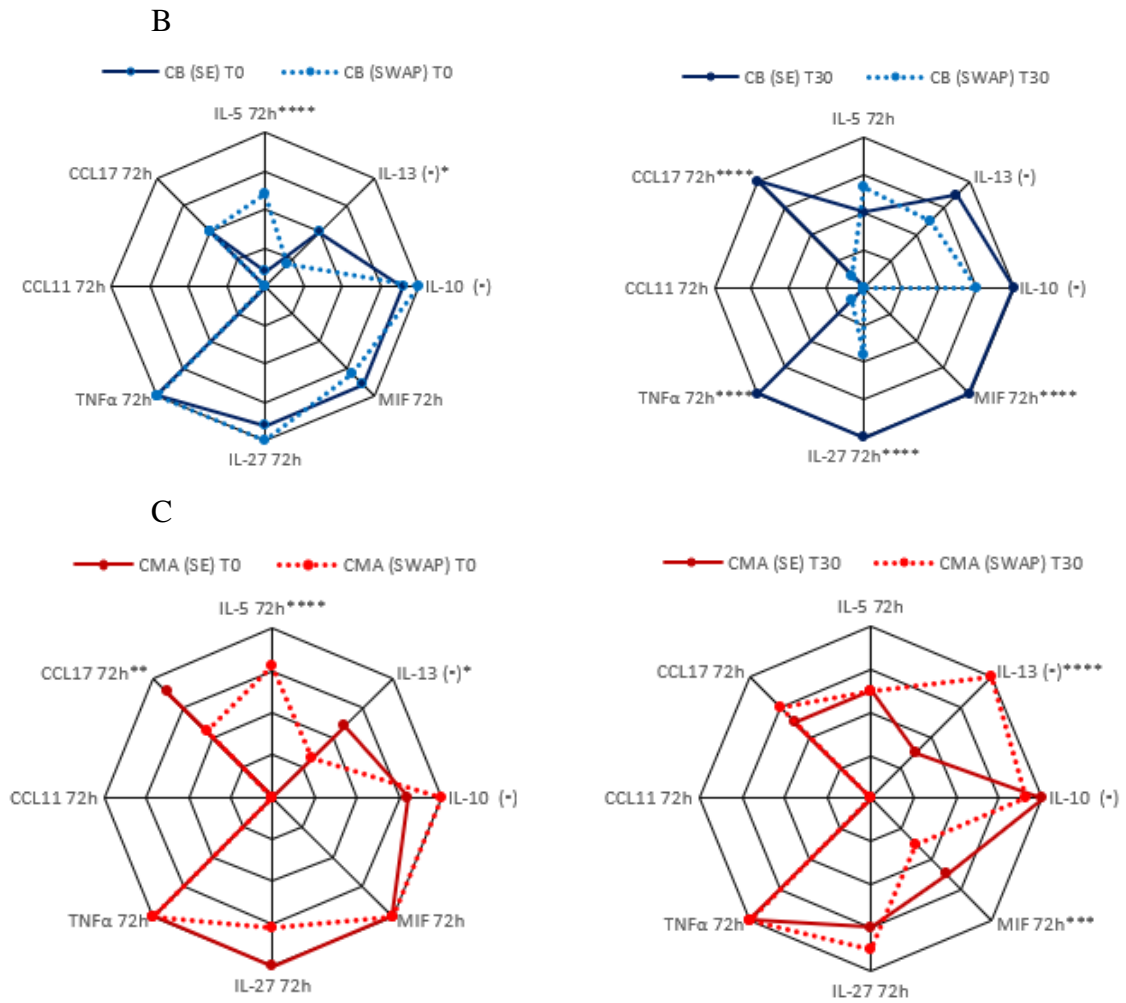
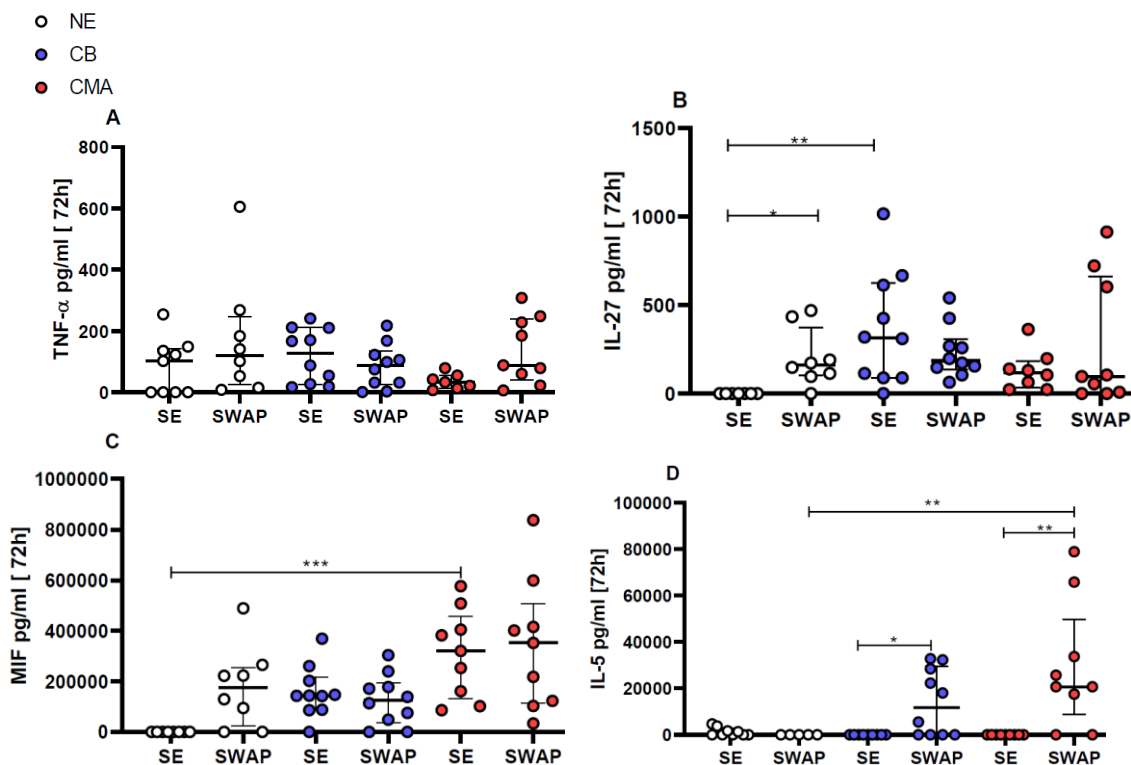


Figura 26- Perfil de respondedores (%) de citocinas e quimiocinas (pg/mL). **(A)** grupo NE no T0, sem estímulo SE (Linha contínua) e com estímulo SWAP (linha tracejada); **(B)** grupo CB no T0 e T30d sem estímulo SE e com estímulo SWAP ;**(C)** grupo CMA no T0 e T30d sem estímulo SE e com estímulo SWAP. As zonas do radar indicadas correspondem aos valores de 25,50,75, 100 (%). Foram considerados respondedores, aqueles com valores acima de 10 pg/mL (último ponto da curva) em cada citocina e quimiocina. Os símbolos *, **, *** e **** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$ respectivamente. O símbolo (*) significa que as citocinas IL-13 e IL-10 foram dosadas em sobrenadantes após incubação de 48 h o SE no T0 e SWAP no T30d. O restante foi dosado em sobrenadantes após incubação de 72h

11.11. Detecção de citocinas e quimiocinas na infecção por *S. mansoni* antes do tratamento com praziquantel T0.

Com o objetivo de caracterizar o perfil de citocinas e quimiocinas na infecção por *S. mansoni*, foi realizado a detecção das mesmas em sobrenadantes de células TCD4⁺ e foi observado que para TNF- α , uma das citocinas inflamatórias do tipo 1, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 27A). Porém, a citocina IL-27 apresentou maiores concentrações no grupo NE (SWAP) em relação ao mesmo grupo sem estímulo. Por outro lado, quando se comparou os grupos NE (SE) e CB (SE), este último apresentou maior concentração de IL-27 no T0 (Figura 27B). Em relação à citocina MIF, esta foi maior no grupo CMA (SE) do que no grupo NE (SE) (Figura 27C). Por sua vez, a citocina do tipo 2, IL-5, foi maior nos grupos dos indivíduos infectados, independente da carga parasitária, quando estimulados com SWAP. O grupo CMA (SWAP) também apresentou maior detecção de IL-5 em relação ao grupo NE (SWAP) (Figura 27D). Para a citocina IL-13 e a quimiocina CCL17, não houve diferença significativa entre os grupos avaliados (Figuras 27E e F). Contudo, a citocina regulatória IL-10 diminuiu no grupo CB após o estímulo com SWAP (Figura 27G)



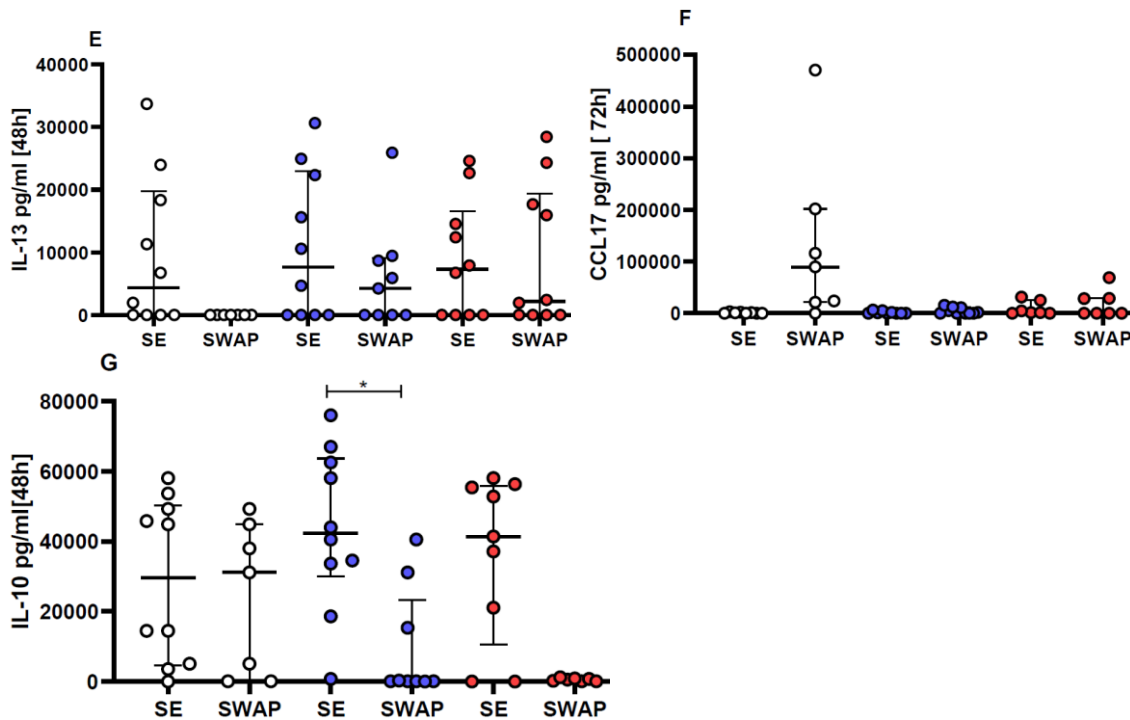


Figura 27- Concentrações de citocinas e quimiocinas (pg/mL), indicadas em escala logarítmica (log 10), em sobrenadantes estimulados com SWAP com os melhores tempos de incubação. Grupo NE com n=10 (bola branca), CB n=10 (bola azul) e CMA n=9 (bola vermelha), sem estímulo (SE) e com estímulo (SWAP). Os resultados são expressos com mediana e interquartis. Os símbolos *, ** e *** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Observação: Não foi detectado concentrações da quimiocina CCL11.

11.12. Detecção de citocinas e quimiocinas na infecção por *S. mansoni*, antes e após o tratamento com praziquantel.

Após o tratamento, a detecção da citocina TNF- α reduziu no grupo CB, porém, o oposto foi observado para o grupo CMA (Figura 28A). Para a IL-27, não houve diferença significativa entre os grupos (Figura 28B), entretanto, a citocina MIF diminuiu em ambos os grupos de infectados após o tratamento (Figura 28C). Enquanto a detecção da citocina IL-5 foi alta somente no T0 (Figura 28D). Após o tratamento, foi observado um aumento da IL-13 no grupo CMA (SWAP) (Figura 28E), assim como da CCL17 no grupo CB sem estímulo, porém quando esse grupo foi estimulado com o SWAP foi observada uma drástica redução dessa quimiocina (Figura 28F). Uma maior concentração da CCL17 também foi observada no grupo CMA (SWAP) em comparação ao CB (SWAP) no T30d. A citocina regulatória IL-10 no grupo CB (SE) foi maior antes do tratamento, porém, após o tratamento observou-se um significativo aumento nesse mesmo grupo com o estímulo SWAP (Figura 28G). Na comparação entre os grupos CMA e CB no T30d, ambos sem estímulo, o primeiro apresentou maiores concentrações de IL-10.

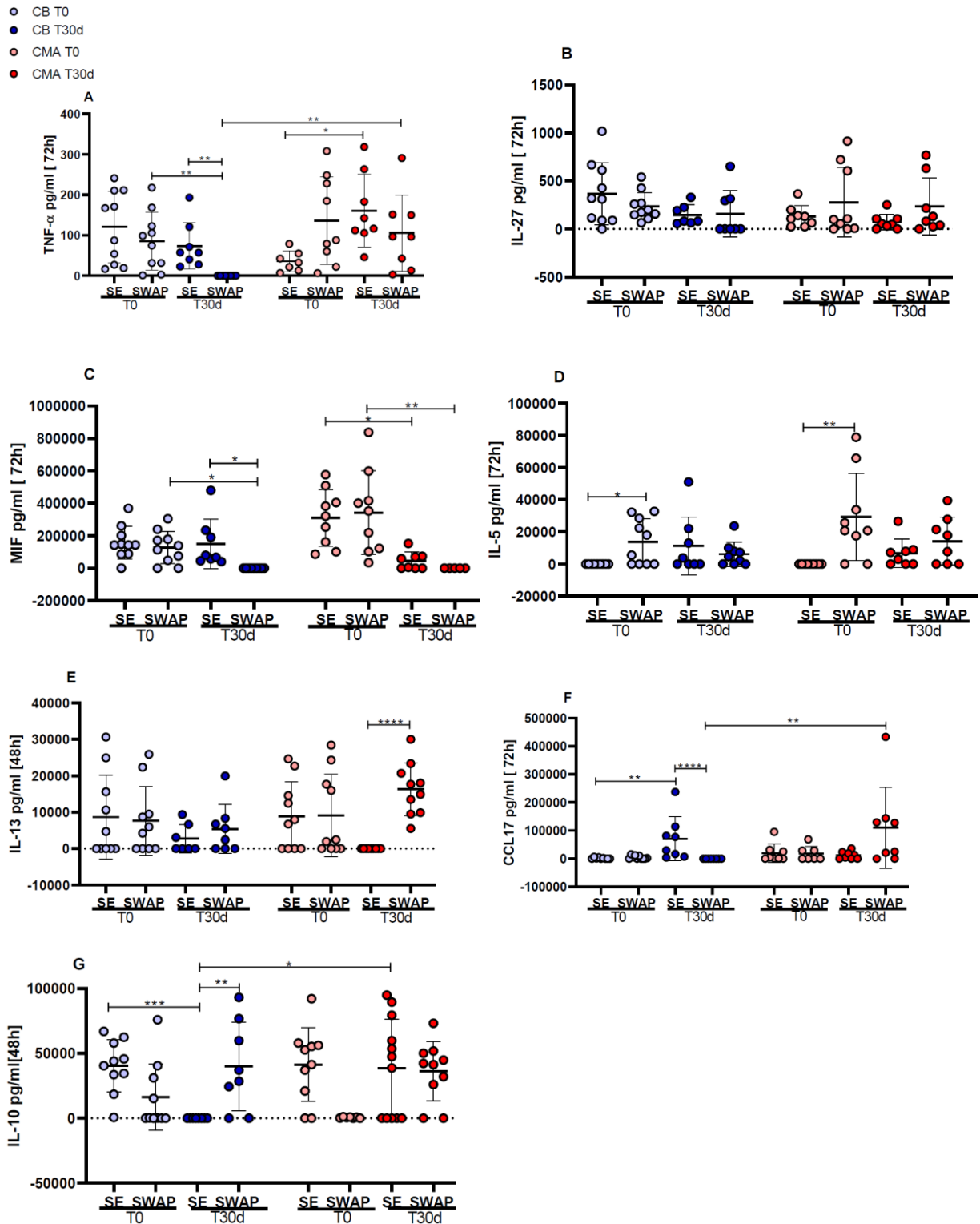


Figura 28- Concentrações de citocinas e quimiocinas (pg/mL), indicadas em escala logarítmica (log 10), em sobrenadantes estimulados com SWAP com os melhores tempos de incubação. Grupo NE com n=10 (bola branca), CB n=10 (bola azul) e CMA n=9 (bola vermelha), sem estímulo (SE) e com estímulo (SWAP) no T0 e T30d. Os resultados são expressos com mediana e interquartil. Os símbolos *, **, *** e **** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$, $p \leq 0,001$ e $p \leq 0,0001$ respectivamente. O teste realizado foi Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn's. Observação: Não foi detectado concentrações da quimiocina CCL11.

11.13. Correlação entre a intensidade de infecção(opg), citocinas e quimiocinas.

Para entender melhor quais são as citocinas e quimiocinas que estão relacionadas à intensidade da infecção, a correlação entre todos os indivíduos positivos foi avaliada. As citocinas TNF- α e MIF correlacionaram-se positivamente. Diferentemente, a correlação entre a citocina IL-13 e a quimiocina CCL17 foi negativa quando os indivíduos são tratados e não há estímulo (SE), porém, o oposto foi observado nesses mesmos indivíduos tratados quando estimulados com SWAP, os quais apresentaram uma correlação positiva entre a IL-13 e a CCL17. Nas demais citocinas não foram observadas diferenças significativas (Tabela 14).

Tabela 14- Correlação da intensidade da infecção (opg), com a produção de citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de PBMCs.

Citocinas e Quimiocina	r(p)			
	< 100 opg	\geq 100 opg	SE T30d	SWAP T30d
TNF- α	-0,11 (0,63)	0,18 (0,43)	0,45 (0,07)*	0,75 (0,0008)***
IL-27	-0,37 (0,11)	-0,17 (0,47)	-0,35 (0,18)	0,38 (0,12)
MIF	0,46 (0,04)*	0,49 (0,03)*	-0,27 (0,29)	0,32 (0,20)
IL-5	-0,36 (0,12)	- 0,01 (0,94)	0,10 (0,68)	0,12 (0,63)
IL-13	0,07 (0,74)	0,31 (0,18)	-0,65 (0,007)**	0,63 (0,004)**
CCL17	0,15 (0,51)	0,28 (0,22)	-0,50 (0,04)*	0,59 (0,01)*
IL-10	0,16 (0,49)	0,06 (0,78)	-0,23 (0,37)	0,07 (0,77)

Os símbolos *, ** e *** indicam $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente. Teste de Spearman. A interpretação $r = 1$ correlação perfeita; 0 a 1 as duas variáveis tendem a aumentar ou diminuir juntas; 0 a -1 uma correlação aumenta, enquanto a outra diminui, correlação inversa.

11.14. Análise multivariada de marcadores celulares

Para entender possíveis agrupamentos e correlações entre as variáveis foi realizada uma análise mais completa através de um modelo multivariado, análise de componente principal (PCA) e um mapa de calor que permite a visualização dos valores dessas variáveis através do gradiente de calor, possibilitando a visão panorâmica dos valores mínimos e máximos da matriz. A figura 29 demonstra a análise de PCA para a porcentagem das moléculas CD69; HLA-DR; PD-1/TIM-3; RO γ T/IL-17; CCR6; IL-9; IL-4 e IL-10, sem estímulo SE e com estímulo SWAP, no T0 (Figura 29A) e no T30d (Figura 29B). Dessa forma, é possível observar que em todos os grupos, tanto antes quanto após o tratamento, as células estimuladas com o antígeno SWAP são semelhantes às células não estimuladas SE.

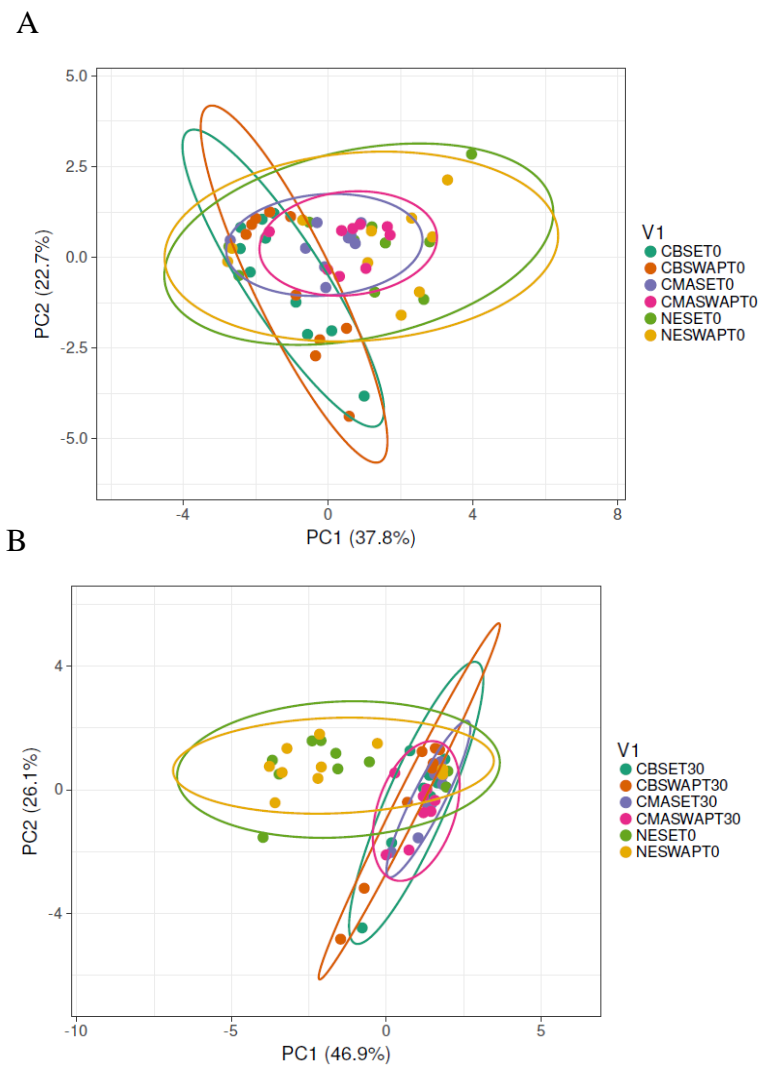


Figura 29- Análise de Componentes principais entre a porcentagens de CD69, HLA-DR, PD-1/TIM-3, ROR γ T/IL-17, CCR6, IL-9, IL-4 e IL-10. **(A)** grupos NE, CB, CMA, sem estímulo (SE) e com estímulo (SWAP) no T0; **(B)** grupos NE (T0), CB, CMA sem estímulo (SE) e com estímulo (SWAP), no T30d.

Ao verificar o tratamento entre os grupos, observou-se que o NE e o CMA, ambos sem estímulo e antes do tratamento, se agruparam perfeitamente, enquanto no grupo CB (SE) antes e após o tratamento a correlação foi menor. Porém, após o tratamento, foi observada uma correlação entre os grupos CMA e CB, ambos sem estímulo (Figura 30A). As diferenças observadas podem ser visualizadas no mapa de calor, o qual demonstra que o NE e o CMA, ambos sem estímulo e no T0, apresentaram maior frequência dos marcadores de PD-1, HLA-DR, CD69 e CCR6. Após tratamento, o grupo CMA (SE) se assemelha ao grupo CB, diminuindo todos os marcadores citados e aumentando a frequência dos marcadores IL-4, IL-10, IL-9, ROR γ T/IL17 (Figura 30B). Essas mesmas

características foram observadas quando as células foram estimuladas com SWAP (Figuras 30C e D).

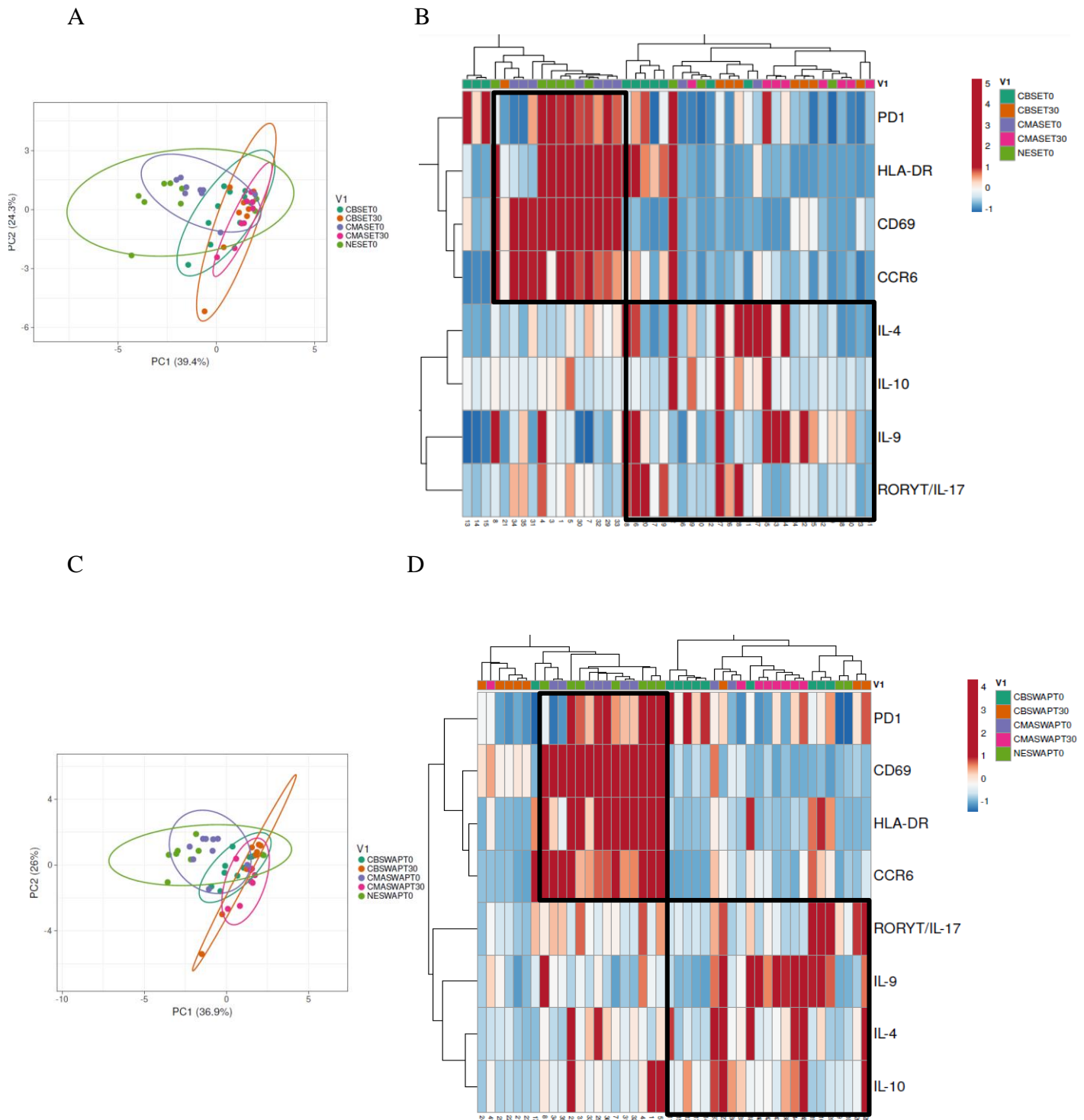


Figura 30- Análise de Componentes principais (PCA), e mapa de calor entre a porcentagens de CD69, HLA-DR, PD-1/TIM-3, RO γ T/IL-17, CCR6, IL-9, IL-4 e IL-10. (A) PCA: grupos CB, CMA e NE T0 e T30 (SE), (B) mapa de calor: grupos NE T0, CB, CMA T30d (SE); (C) PCA: NE T0, CB, CMA T30d (SWAP); (D) mapa de calor: NE T0, CB, CMA T30d (SWAP).

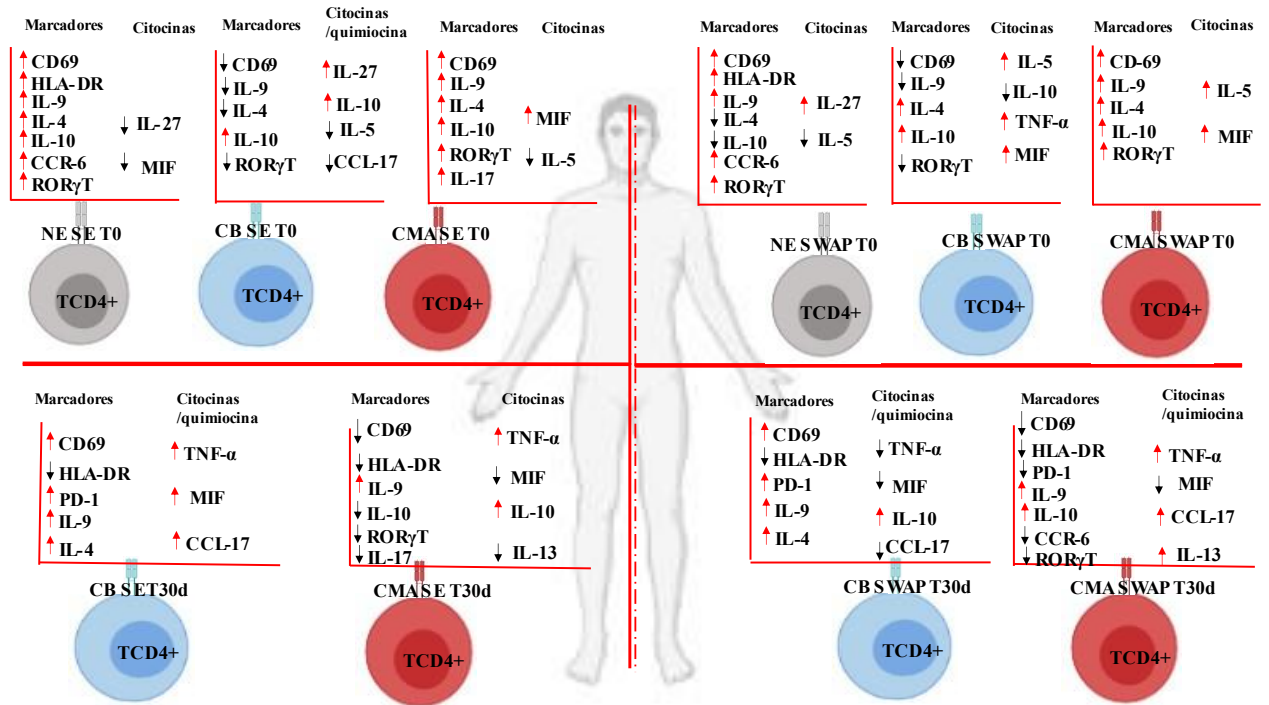


Figura 31- Resumo da análise univariada dos marcadores dos painéis ativação, exaustão, Th2/TCD4+ produtoras de IL-9 e Th17, em PBMCs após 24 horas de incubação e a produção de citocinas e quimiocina em sobrenadantes da cultura celular após 48-72h de incubação. NE negativo endêmico; CB baixa carga parasitária; CMA média a alta carga parasitária; SE sem estímulo; SWAP antígeno solúvel do verme adulto; T0 antes do tratamento; T30d após tratamento.

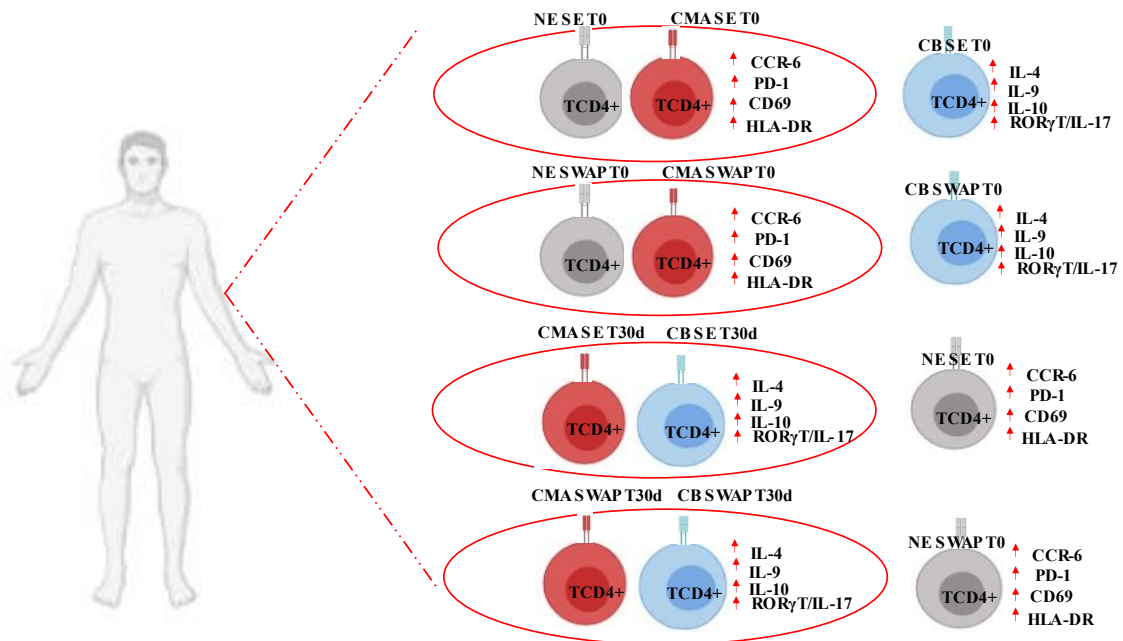


Figura 32- Modelo Multivariado, com as semelhanças e dissimilaridades entre a porcentagem dos marcadores nos grupos NE, CB e CMA antes e após tratamento. NE negativo endêmico; CB baixa carga parasitária; CMA média a alta carga parasitária; SE sem estímulo; SWAP antígeno solúvel do verme adulto; T0 antes do tratamento; T30d após tratamento.

12. Discussão: Capítulo 3

A imunofenotipagem de linfócitos TCD4⁺

A ativação das células TCD4⁺ foram avaliadas através das moléculas de ativação de superfície precoce e tardia, CD69 e HLA-DR, respectivamente (TESTI et al., 1989). A molécula CD69 consiste em uma proteína lectina de membrana do tipo II, que é expressa rapidamente após a estimulação dos receptores na superfície de células T e B, sendo, portanto, considerada um ativador celular recente (ZIEGLER et al., 1993; TESTI et al., 1994), enquanto a molécula HLA-DR faz parte do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II (TESTI et al., 1989).

Os resultados aqui apresentados demonstraram diferenças entre os grupos, com os grupos NE e CMA apresentando maior porcentagem de células TCD4⁺ ativadas, o que indica uma menor ativação celular em indivíduos do grupo CB. Esses resultados corroboram com o estudo de Campi-Azevedo e colaboradores (2007) que demonstraram que indivíduos infectados por *S. mansoni*, estimulados com o antígeno do ovo (SEA), apresentaram menores frequências dos marcadores de ativação TCD4⁺CD69⁺, TCD4⁺HLA-DR⁺ e TCD8⁺HLA-DR⁺, em comparação aos indivíduos negativos. Essa baixa reatividade dos grupos infectados foi devido à uma redução na expressão da ciclina D_{1,2,3}, responsável por desencadear os eventos do ciclo celular, reduzindo a proliferação celular por um bloqueio nas fases G₀/G₁. Outros estudos relataram que o antígeno solúvel do ovo e do verme adulto SEA/SWAP minimizam a proliferação de PBMCs em pacientes no estado crônico da infecção por *S. mansoni* (TODD et al., 1980; GAZZINELLI et al., 1985).

Após o tratamento, os níveis do marcador CD69 nas células TCD4⁺ foram maiores no grupo CB, enquanto o marcador tardio HLA-DR foi reduzido nos grupos infectados, independente da carga parasitária, evidenciando que o tratamento ativou apenas as moléculas de CD69 nos indivíduos com baixa carga parasitária. Foi demonstrado por Testi e colaboradores (1989), que durante a infecção por *S. mansoni* o aumento da expressão de tal molécula promove a proliferação de células T através da produção de IL-2. Embora, Cardoso e colaboradores (2013), não tenham observado diferença na frequência de TCD4⁺ CD69⁺ e TCD8⁺ CD69⁺ nos diferentes graus de pacientes com fibrose periportal, um outro estudo demonstrou que expressões mínimas de CD69 em eosinófilos foi observado em indivíduos com esquistossomose intestinal crônica quando comparados à indivíduos com fibrose periportal (SILVEIRA- LEMOS et

al., 2008). É possível que a expressão de CD69 em células T não tenham a mesma capacidade de demonstrar processos inflamatórios como ocorre em eosinófilos. Doenças mediadas pela resposta do tipo 2, como asma e inflamações das vias aéreas, estão relacionadas ao aumento da expressão de CD69 em eosinófilos e a gravidade da doença (HARTNELL et al., 1993; MIKI-HOSOKAWA et al., 2009).

Estudos anteriores demonstraram que o aumento do marcador HLA-DR esteve associado à proliferação de células imunológicas devido à intensa inflamação e, conseqüentemente, o aparecimento de patologias graves, como hepatosplenomegalia em infecções por esquistossomoses (MARTINS et al., 1997), no nosso estudo o marcador HLA-DR está reduzido nos indivíduos infectados. Em um trabalho feito com o parasito nematódeo *Wuchereria bancrofti* foi verificado que um aumento na frequência de HLA-DR por células TCD8+ e esse achado foi associado como um importante fator para o desenvolvimento de linfedemas (LAL et al., 1989). Da mesma maneira, em Kroidl e colaboradores (2019) concluiu-se que a infecção por *W. bancrofti* está associada à ativação sistêmica de células TCD4+, juntamente com a expressão de HLA-DR, promovendo um provável mecanismo para o aumento da suscetibilidade em indivíduos infectados com HIV, ou seja, a concomitância dessas infecções provocaria intensos processos de inflamações e patologias.

Na interação entre parasito e hospedeiro, vários são os mecanismos que são capazes de promover lesões, sendo um deles estabelecido pelo balanço entre mecanismos de ativação e/ou exaustão de células T. Dessa forma, verificou-se também os marcadores de exaustão PD-1 e TIM-3 na superfície de célula T. Embora PD-1 tenha recebido apreciável atenção à sua função na exaustão de células T e imunossupressão tumoral, este não é um marcador específico de exaustão (SHARPE & PAUKEN, 2018). O marcador PD-1 é expresso em células T ativadas (marcador de células T efectoras), células B, macrófagos e monócitos, sendo um correceptor que possui dois principais ligantes, o PDL-1(DONG et al., 1999) e o PDL-2 (LATCHMAN et al., 2001; KEIR et al., 2008; FIFE et al., 2009), e quando esta coestimulação ocorre, mecanismos ativam sinais inibitórios que impedem a proliferação de células T (FIFE ET AL., 2009; FRANCISCO et al., 2009; Amarnath et al., 2011; AGATA et al., 1996; CHEN, 2004). Por sua vez, o marcador TIM-3 é um importante regulador da resposta imune inata e adaptativa (FREEMAN et al., 2010), cuja expressão geralmente é detectada em células do tipo 1 (mas não em células do tipo 2), os quais regulam processos críticos relacionados à

autoimunidade, alergia, durante infecções virais e após transplantes (MONNEY et al, 2002; FREEMAN et al., 2010).

No presente estudo não foi observado nos indivíduos, infectados ou não, diferença dos marcadores de exaustão PD-1 e TIM-3 entre as células TCD4+ antes do tratamento, o que já era esperado devido à baixa ativação dessas células no T0. Entretanto, após o tratamento, o grupo com maior carga parasitária, estimulado por SWAP, reduziu a porcentagem do marcador PD-1, mas aumentou a sua expressão, a qual foi ainda maior no grupo CB (SWAP). Essa expressão elevada de PD-1 e seus ligantes são observadas em infecções crônicas e câncer (PAUKEN & WHERRY, 2015). Da mesma maneira, outros estudos demonstraram que esse aumento na expressão de marcadores de inibição, tal como CTL-4 (antígeno associado dos linfócitos T citotóxicos 4) e PD-1, foram observados em outras infecções helmínticas (STEEL et al., 2003; BABU et al., 2006) e que a depleção de CTL-4/PD-1 pode alterar o equilíbrio das respostas Th1/Th2 em infecções com filárias (STEEL et al., 2003). A regulação positiva de PD-1 foi observada em infecções de camundongos com *Trichinella spiralis*, que suprimiu as respostas Th1 e Th17 e aumentou a resposta Th2 (CHENG et al., 2018). Em infecções crônicas por *S. japonicum* (ZHOU et al., 2016), *Fasciola hepática* (STEMPIN et al., 2016) *Taenia solium* (ARCE-SILLAS et al., 2016) e *Echinococcus multilocularis* (ARCE-SILLAS et al., 2016), o aumento de PD-1 foi importante para a sobrevivência das formas parasitárias no hospedeiro e a diminuição da imunopatologia causada pelo parasitismo. Portanto, esses resultados sugerem que os helmintos podem explorar a via de PD-1 no sistema imunológico do hospedeiro para minimizar as inflamações exacerbadas, possibilitando a progressão e a cronicidade de infecções helmínticas.

A resposta Th2 é bastante documentada nas infecções helmínticas, uma que além de desempenhar um papel efetor, seja na redução ou regulação das patologias recorrentes, também promove a reparação tecidual, importantes funções nas infecções por *Schistosoma* spp. (MAIZELS et al., 1993; ALLEN et al., 2011). Por esta razão, a resposta Th2 e as células TCD4+ produtoras de IL-9 na infecção por *S. mansoni* foram avaliadas nesse estudo, pois, apesar de bem documentada de uma forma geral, a participação dos linfócitos produtores de IL-9 ainda é pouco estudada nas infecções humanas com *S. mansoni*. Em modelos murinos, as células Th9 estão relacionadas à resistência às infecções helmínticas intestinais (FAULKNER et al., 1997; RICHARD et al., 2000; LICONA et al., 2013), enquanto, em humanos, essas células desempenham funções

inflamatórias em diferentes doenças, como atopias (SCHLAPBACH et al., 2014), melanoma (PURWAR et al., 2012), asma (SOROOSH et al., 2009) e doenças autoimunes (PAN et al., 2013). Isto posto, nos resultados aqui apresentados, a média de intensidade de fluorescência das citocinas IL-9, IL-4 e IL-10 foi bem menor no grupo com baixa carga parasitária, em comparação aos outros grupos avaliados, principalmente a IL-9, que não apresentou nenhuma expressão. Esse mesmo grupo não induziu células TCD4 produtoras de IL-9 antes do tratamento, mas induziu a resposta Th2. Assim, sugere-se que a falta de expressão de IL-9 pode ser um fator de proteção para esse grupo, pois conforme demonstrado em alguns trabalhos com modelos murinos, a citocina IL-9 está diretamente relacionada às inflamações granulomatosas na infecção por *S. japonicum* e envolvida na imunopatogenese da esquistossomose (LI et al., 2017; ZHAN et al., 2017). Em relação à resposta Th2, em ambos os grupos dos infectados (CB e CMA) foi observado uma modulação positiva para as citocinas IL-4 e IL-10, corroborando com outros estudos que demonstraram no contexto da infecção helmíntica um aumento significativo de citocinas Th2, além de citocinas regulatórias, principalmente em pacientes na fase crônica da infecção (HARRIS & LOKE., 2017; ROLOT et al., 2018). Nota-se, que os ovos de *S. mansoni*, mortos ou vivos, são capazes de estimular e induzir uma resposta do tipo 2 (PEARCE., 2005), verificado nos linfócitos TCD4+ dos grupos infectados aqui investigados, independente da carga parasitária.

Após o tratamento, os linfócitos TCD4+ dos indivíduos do grupo CB começaram a expressar a citocina IL-9, além de continuar induzindo a resposta Th2. Assim, foi possível observar que o tratamento induziu nos grupos CB e CMA uma resposta inflamatória com a produção da citocina IL-9, porém, o primeiro apresentou uma maior capacidade de induzir uma resposta Th2 por apresentar um aumento dos linfócitos absolutos positivos para IL-4, diferentemente do grupo CMA, cuja regulação foi negativa com uma redução da expressão das citocinas IL-4 e IL-10. Embora várias evidências apontem o envolvimento da IL-9 em processos de patogêneses da esquistossomose, o seu papel em relação à interação com outras citocinas na resposta imune ainda é pouco esclarecido (ZHAN et al., 2019). Alguns estudos demonstraram que são vários os processos que desencadeiam a formação do granuloma e que o macrófago M2 é uma importante célula nesses processos, pois além de impedir uma inflamação exagerada que resultaria em danos excessivos devido ao movimento dos ovos no tecido intestinal, também libera as citocinas IL-4/IL13 que facilitam a polarização da resposta do tipo 2. A

falta dessas citocinas pode dificultar a formação do granuloma e aumentar os danos no hospedeiro, provocando patologias graves (DOENHOFF et al., 1978; SCHWARTZ C & FALLON, 2018).

Para avaliar se os diferentes grupos induziriam uma resposta imunológica mais inflamatória, as células Th17 também foram investigadas, tendo em vista o seu envolvimento em vários processos biológicos em diferentes infecções, com um importante papel na indução das inflamações, já foi demonstrado em vários estudos (GAFFEN et al., 2009; LAFDIL et al., 2010). Em nematódeos já foi observado que a resposta Th17 está associada à morbidade nas infecções com *Ascaris suum* e filariose (ANURADHA et al., 2014; NOGUEIRA et al., 2016). Ressaltando que os linfócitos Th17 que secretam IL-17A induzem a formação do granuloma hepático (SHAINHEIT et al., 2011; CHEN et al., 2013). Do mesmo modo, o envolvimento da citocina IL-17A foi relatado em outras doenças, tais como doenças inflamatórias, autoimunes e esclerose múltipla (MIOSSEC et al., 2009; SUN et al., 2017). Em modelos murinos, foi observado que na infecção por *S. japonicum*, ocorreu ausência de sinalização para a secreção de IL-17A promovendo uma diminuição na fibrose hepática e reduzindo a patologia (ZHANG et al., 2015). Em infecções humanas por *Schistosoma haematobium*, verificou-se que os antígenos dos ovos seriam responsáveis pela modulação para uma resposta de células Th17 e estariam envolvidos nos processos de inflamação e nas patologias ocasionadas na bexiga (MBOW et al., 2013).

O CCR6 é um receptor de quimiocina importante na migração de células Th17 para os locais de inflamação, sendo altamente expresso durante a resposta Th17. No presente trabalho, o grupo NE apresentou uma maior porcentagem desse receptor em comparação ao CB, bem como o fator de transcrição ROR γ T que também foi mais expresso nos grupos NE e CMA. Esses dados indicam que o grupo com baixa carga parasitária foi o único que não induziu uma resposta Th17 antes do tratamento, sugerindo que devido à essa baixa carga, esse grupo possui uma menor quantidade de antígenos e uma menor inflamação induzida por linfócitos produtores de IL-17.

Após o tratamento, observou-se uma resposta imune modulada negativamente nos linfócitos do grupo CMA, com a diminuição da porcentagem do marcador CCR6 e expressões de IL-17A e ROR γ T. Dessa forma, é possível afirmar que ambos os grupos dos infectados não induziram uma resposta inflamatória Th17 após o tratamento com

praziquantel, o qual, além disso, promoveu uma diminuição dos marcadores pesquisados em indivíduos com média a alta carga parasitária.

Os dados aqui apresentados revelaram que quando ocorre um intenso contato com antígenos do parasito, como o tratamento, os indivíduos com baixa carga parasitária são capazes de induzir uma maior expressão dos marcadores de ativação/exaustão Th2/TCD4⁺ produtores de IL-9, mas não induzem uma resposta com a produção de citocinas IL-17, quando comparados ao grupo CMA, que se apresentou regulado negativamente após o tratamento. Estudos anteriores demonstraram que em infecções ocasionadas por parasitos pertencentes ao gênero *Schistosoma* a supressão da reatividade celular em humanos é perdida logo após sucessivos tratamentos. Isso ocorre uma vez que a exposição do organismo à produtos secretados e excretados pelo parasito induzem uma ativação celular robusta, mas que é perdida após estimulação e constante exposição aos antígenos do parasito fazendo com que muitas vezes essas células se tornem anérgicas e permitindo que o parasito consiga continuar seu ciclo de vida no hospedeiro humano (GROGAN et al., 1998; SMITH et al., 2004).

Avaliação da secreção de citocinas e quimiocinas *in vitro* em sobrenadantes de PBMCs

No contexto da produção de citocinas e quimiocinas desencadeada pela infecção por *S. mansoni*, o tipo de inflamação ou regulação celular que estaria acontecendo com esses indivíduos foi investigado. Diante disso, observou-se que antes do tratamento o grupo NE apresentou uma grande frequência de respondedores quando estimulados com o antígeno SWAP, corroborando com outros estudos que relataram a reatividade celular dos Negativos endêmicos contra o antígeno do parasito (CALDAS et al., 2000; CASTRO et al., 2018; RESENDE et al., 2019). Nos indivíduos infectados, nessas mesmas condições, isto é, antes do tratamento e estimulados com SWAP, a frequência de citocinas e quimiocinas foi semelhante, onde o grupo CB e CMA aumentaram a frequência das citocinas IL-5 e IL-10 e reduziram a IL-13. Após o tratamento, o grupo CB estimulado com SWAP reduziu drasticamente a frequência de citocinas inflamatórias e CCL17 (TARC), enquanto o grupo CMA, também estimulado com SWAP, reduziu a frequência de MIF e aumentou a IL-13. Esses resultados sugerem a predominância da frequência de citocinas e quimiocinas da resposta do tipo 2 e que a redução da frequência de citocinas inflamatórias pode ocorrer em indivíduos durante a fase crônica e intestinal da infecção.

Quanto ao perfil das citocinas e quimiocinas em sobrenadantes de PBMCs dos três grupos, as citocinas Th1, Th2 e citocina regulatória foram avaliadas. Antes do tratamento, a citocina TNF- α , uma das citocinas da resposta inflamatória tipo 1, foi semelhante em todos os grupos, porém, após o tratamento, o grupo CB, estimulado com SWAP, reduziu drasticamente a sua produção e o oposto ocorreu no grupo CMA, cuja produção dessa citocina foi maior. Além disso, foi observada uma forte correlação positiva entre a intensidade da infecção (opg) e a produção de TNF- α após o tratamento. O papel dessa citocina na infecção por *S. mansoni* ainda precisa ser elucidado, visto que não há um consenso entre vários estudos. Henri e colaboradores (2002), por exemplo, indicam que a TNF- α é relacionada à fibrose quando associada à citocina INF- γ em um modelo multivariado. Por sua vez, o estudo de Booth e colaboradores (2004), demonstrou que o agravamento da fibrose periportal está diretamente relacionada ao aumento da citocina TNF- α . Em contrapartida, o trabalho de Mutengo e colaboradores (2018) observaram que ao estimular o sangue total com o antígeno SEA em pacientes infectados, aqueles com altos níveis de IL-6, IL-10 e TNF- α tendem a ser mais protegidos contra a hepatoesplenomegalia da esquistossomose. Esses resultados controversos sugerem que a função de TNF- α é dependente do ambiente celular e de outras citocinas.

Outra citocina inflamatória dosada foi o MIF, o qual é produzido por várias células do sistema imune, como os monócitos, linfócitos T ativados, eosinófilos, queratinócitos, além de ser multifuncional e associado à diversos eventos patológicos relevantes ao sistema imunológico (ROSSI et al., 1998; SHIMIZU et al., 1999; YAMAGUCHI et al., 2000). No presente estudo, apenas nos indivíduos com maior carga parasitária foi detectada uma concentração elevada de MIF em comparação aos indivíduos negativos, o que indicaria algum tipo de processo inflamatório. Entretanto, tanto o grupo CB quanto o grupo CMA apresentaram uma redução significativa dessa citocina logo após a remoção dos vermes adultos por quimioterapia. Essa associação entre a carga parasitária e o MIF foi reafirmada pela correlação positiva encontrada nos indivíduos infectados apenas antes do tratamento. O trabalho de Rodrigues e colaboradores (2018) demonstrou que o MIF no plasma pode ser utilizado como biomarcador na fibrose hepática induzida por *S. mansoni* em indivíduos com baixa carga parasitária. Portanto, os resultados aqui apresentados confirmam que os indivíduos infectados por *S. mansoni* avaliados no estudo, não possuem patologias exacerbadas, principalmente porque a secreção de citocinas e

quimiocinas foram realizadas *in vitro* em sobrenadante de PBMCs estimulados com o antígeno do parasito.

A IL-27 é uma citocina com a capacidade de inibir o desenvolvimento da resposta do tipo 2 através da regulação negativa de GATA3 e regulação positiva de T-bet, concomitantemente (YOSHIMOTO et al., 2007), além disso, a IL-27 pode inibir o FOXP3, que são induzidos por células T regulatórias e TGF- β /IL-6 de células TCD4+ naíves, importantes na indução das células Th17 (STUMHOFER et al., 2006; NEUFERT et al., 2007; EL-BEHI et al., 2009). No nosso estudo foi observado que a IL-27 apresentou uma maior detecção no grupo negativo estimulado com SWAP e no grupo CB sem estímulo em comparação ao NE (SE), porém, essas diferenças desapareceram após o tratamento. É importante salientar que mesmo após o tratamento, com a eliminação do parasito, não ocorreu um redirecionamento para uma resposta predominantemente do tipo 1. Dentre as citocinas avaliada estava a de regulação IL-10 que tem papel fundamental na regulação da inflamação na infecção por *S. mansoni* devido aos baixos níveis dessa citocina terem sido associados à fibrose hepática grave em humanos (MUTENGO et al., 2018). Neste estudo, ambos os grupos dos infectados apresentaram, após o tratamento, um aumento dessa citocina, que é decisiva para minimizar as possíveis patologias.

Em relação às citocinas do tipo 2, a produção de IL-5 no T0 foi maior nos indivíduos infectados estimulados com (SWAP) em comparação aos não estimulados (SE), entretanto, após o tratamento essas diferenças não foram mais encontradas. Sendo IL-5 uma importante citocina que estimula o infiltrado de eosinófilos para os locais de inflamação (RUMBLEY et al., 1999), sua baixa detecção após o tratamento pode ser devido a presença da citocina IL-10, que é uma molécula inibitória de IL-5 e de IL-13 (HOFFMANN et al., 2000), contudo, esta última citocina foi detectada somente no grupo CMA (SWAP) após o tratamento. A correlação entre a carga parasitária e a produção de IL-13 é dependente do estímulo, visto que nos indivíduos infectados (SE) a correlação foi negativa, enquanto nos indivíduos estimulados (SWAP) foi positiva após o tratamento. Esses resultados corroboram com os estudos que sugerem que o aumento dessa citocina está diretamente relacionado à intensidade da infecção, pois os ovos do parasito (juntamente com a secreção de antígenos) são os principais causadores de inflamações e patologias, além de serem um excelente imunomodulador da resposta imune do tipo 2 no hospedeiro (PEARCE et al., 2002; SCHWARTZ et al., 2014). A IL-13 é uma citocina responsável pelo progresso da fibrose no fígado e juntamente com a IL-4 induz os

macrófagos que clivam L-arginina para L-ornitina (LIU et al., 2012), a qual, por sua vez, é convertida, pela ornitina aminotransferase, em prolina, que é um importante produtor de colágeno e, conseqüentemente, estimula o desenvolvimento da fibrose (HESSE et al., 2001), além de estimular a diferenciação de células estreladas hepáticas, que são fontes de colágeno e responsáveis pela fibrogênese em esquistossomoses (ANTHONY et al., 2012). Sendo então importante a presença dessas citocinas no grupo CMA que possui uma maior carga parasitária.

Quanto as quimiocinas do tipo 2, CCL11(eotaxina 1) uma importante citocina na expansão e durante a infiltração de eosinófilos para os locais de inflamação (ROTHENBERG & HOGAN., 2006), não foi detectada no sobrenadante dos diferentes grupos no T0 e T30d (dados não mostrados). Enquanto CCL17(TARC), aumentou após o tratamento no grupo CB (SE), mas diminuiu quando estimulamos com SWAP. Já no grupo CMA (SWAP) apresentou maior detecção dessa quimiocina em comparação ao CB (SWAP) após tratamento. O estudo de Nomura e colaboradores (2002) demonstraram a capacidade que a citocina IL-13 tem em ser um potente mediador da produção de CCL17 (TARC) em PBMCs, além de que a coestimulação de IL-13 e TNF- α promoveu um aumento significativo na expressão de CCL-17 (TARC) em PBMCs. Tais características também foram observadas no grupo CMA após o tratamento. Além disso, a correlação entre a carga parasitária e a quimiocina CCL17 (TARC) foi negativa nos sobrenadantes de PBMCs não estimulados (SE), porém foi positiva em sobrenadantes de PBMCs estimulados (SWAP). Tanto a CCL11 (eotaxina 1) quanto a CCL17 (TARC) foram consideradas importantes marcadoras da infecção por *S. mansoni* e em coinfeções com outros helmintos em PBMCs estimulados em indivíduos com altas cargas parasitárias (GEIGER et al., 2013). É possível que essas quimiocinas não tenham sido detectadas em concentrações mais significantes devido à baixa quantidade de indivíduos com alta carga parasitária e a ausência de coinfeções em nossos indivíduos.

Esses resultados sugerem que o grupo CB após tratamento apresentou uma redução de citocinas inflamatórias e um aumento da citocina IL-10, enquanto o CMA apresentou um aumento de TNF- α , IL-13, CCL17 (TARC) e IL-10, citocinas e quimiocina que são importantes em indivíduos com média a alta carga parasitária. Contudo, foi possível observar que o perfil das citocinas foi diferente em ambos os grupos, indicando que a carga parasitária é um fator determinante na detecção dessas citocinas e quimiocinas.

Modelo multivariado em relação aos marcadores de ativação, exaustão, Th2/TCD4+ produtoras de IL-9 e Th17.

O modelo multivariado utilizado foi a Análise de componentes principais (PCA), uma ferramenta estatística que tem como objetivo representar a estrutura da variância e/ou covariância de um conjunto de dimensões, por meio de combinações lineares desse conjunto (JOLLIFFE, 2002).

Quando os linfócitos TCD4+ foram estimulados com antígeno (SWAP) não ocorreram mudanças em relação aos linfócitos TCD4+ não estimuladas (SE), tanto antes quanto após o tratamento. Antes do tratamento, o grupo negativo foi semelhante ao grupo CMA, com maior frequência de marcadores de ativação, exaustão e CCR6, enquanto o grupo CB apresentou mínima frequência dos mesmos. Após o tratamento, no entanto, observou-se uma mudança significativa no grupo CMA, que diminuiu a frequência de CD69, HLA-DR, PD-1 e CCR6 e aumentou a de IL-4, IL-10, IL-9 e ROR γ T/IL-17, aproximando-se do grupo CB. O grupo CMA apresentou uma alteração drástica na sua resposta imune celular, tanto na análise univariada quanto na análise multivariada, após o tratamento. Enquanto, o grupo CB demonstrou na análise univariada, que tanto no T0 quanto no T30d, não houve a indução de uma resposta Th17. Porém, na análise multivariada apresentou uma maior frequência concomitantemente dos marcadores, ROR γ T/IL-17. Esses dados sugerem que algum mecanismo de supressão está impedindo a ativação/expressão das células Th17 nos indivíduos com baixa carga parasitária.

Diversos estudos demonstraram os mecanismos de hiporresponsividade de células T durante a esquistossomose crônica, em modelos murinos (constantemente infectados por cercárias) e humanos, devido aos papéis das citocinas IL-10 e TGF- β , atividades das células dendríticas, células B e T regulatórias (WATANABE et al., 2007; EVERTS et al., 2010; VAN DER et al., 2012; PRENDERGAST et al., 2015; PRENDERGAST et al., 2016; LABUDA et al., 2020). Contudo, esses mecanismos não são totalmente compreendidos, necessitando de mais estudos para elucidar esse complexo perfil imunológico observado em indivíduos com baixa carga parasitária, tratados com quimioterápico praziquantel e residentes de área endêmica.

13. Conclusão

Diante do arcabouço gerado nesse trabalho, o perfil da resposta imune humoral em escolares indicou uma evolução para uma resposta potencialmente protetora e adquirida pela exposição contínua ao parasito *S. mansoni*, sugerindo que esses indivíduos infectados, mesmo com idade média de 12 a 14 anos, se encontram na fase crônica da infecção. Essa afirmação se dá pelo fato dessas crianças e adolescentes terem confirmado infecções anteriores e tratamentos antigos. Não foi observado características da esquistossomose grave, tais como desnutrição acentuada e eritrocitopenia (dados do questionário e hemograma), portanto, esses indivíduos poderiam ser definidos como assintomáticos, com a forma intestinal mais leve da infecção.

Em relação à intensidade da infecção, os indivíduos com baixa carga parasitária indicaram uma resposta imune celular do tipo 2, mas com a participação de IL-10 e sem uma produção acentuada de citocinas inflamatórias. Trinta dias após o tratamento, esse grupo induziu linfócitos TCD4+ produtores de IL-9, mas não uma resposta Th17.

Contudo, um dos resultados mais relevantes do presente estudo demonstrou que os indivíduos com baixa carga parasitária exibiram uma resposta imune celular distinta através de células TCD4+, com o aumento da frequência dos marcadores IL-4, IL-10, IL-9 e ROR γ T/IL-17 em comparação aos indivíduos ovo-negativos. Essa diferença manteve-se 30 dias após o tratamento. Tal resultado revela que é possível a diferenciação desses grupos por meio de marcadores celulares que possam indicar a presença do parasito.

Esses achados abrem novas possibilidades e ferramentas para elucidar mecanismos e marcadores celulares que possam determinar dissemelhanças entre indivíduos verdadeiramente positivos e ovo-negativos.

14. Referências

ABATH FG. & WERKHAUSER R. C. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features, **Parasite Immunology**, v. 18 (1), p. 15–20, 1996.

ADEBAYO A S; MUNDHE S D.; AWOBODE H O; ONILE O S, AGUNLOYE A M; ISOKPEHI R D, ANUMUDU C I. Metabolite profiling for biomarkers in *Schistosoma haematobium* infection and associated bladder pathologies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12(4), p. e0006452, 2018.

AGATA Y, KAWASAKI A, NISHIMURA H. Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes. **Int Immunol**; **8**: 765–772, 1996.

ALLEN J E & MAIZELS R M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nature Review Immunology**, v. 11, p. 375–388, 2011.

AMARNATH S, MANGUS C W, WANG J C, F. WEI HE A, KAPOOR V, FOLEY J E, MASSEY P R, FELIZARDO T C, RILEY JL. The PDL1-PD1 axis converts human Th1 cells into regulatory T cells. **SCI. Transl. Med.** 3:111RA120, 2011.

AMU S, SAUNDERS S P, KRONENBERG M, MANGAN N E, ATZBERGER A, FALLON P G. Regulatory B cells prevent and reverse allergic airway inflammation via FOXP3-positive t regulatory cells in a murine model. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 125, p. 1114–1124, 2010.

ANTHONY B J, RAMM G A, MCMANUS D P. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. **Trends Parasitol.** 28:572– 9, 2012.

ANURADHA R, GEORGE PJ, CHANDRASEKARAN V, KUMARAN P P, NUTMAN T B, BABU S. Interleukin 1 (IL-1) and IL-23-mediated expansion of filarial antigen-specific Th17 and Th22 cells in filarial lymphedema. **Clin Vaccine Immunol.** 21:960–5, 2014.

ANURADHA R.; MUNISANKAR S; BHOOTRA Y; JAGANNATHAN J; DOLLA C; KUMARAN P; BABU S. IL-10-and TGFβ-mediated Th9 responses in a human helminth infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10(1), p. 1114-1124, 2016.

ARCE-SILLAS A, ALVAREZ-LUQUIN D D, CARDENAS G, CASANOVA-HERNANDEZ D, FRAGOSO G, HERNANDEZ M. Interleukin 10 and dendritic cells are the main suppression mediators of regulatory T cells in human Neurocysticercosis. **Clin Exp Immunol** 183:271–9, 2016.

ARTIS D. & SPITS H. The biology of innate lymphoid cells. **Nature**, v. 517, p. 293–301, 2015.

AVILA-CURIEL A, GALINDO-GOMEZ C, JUAREZ-MARTINEZ L, & OSORIO-VICTORIA M L. Metabolic syndrome in children aged 6 to 12 years with obesity in public schools of seven municipalities in the State of Mexico. **Salud publica de Mexico**, 60(4), 395-403, 2018.

BABU S, BLAUVELT C P, KUMARASWAMI V, NUTMAN T B. Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence. **J Immunol** 176:3248–3256, 2006.

BEHM C A. & OVINGTON K S. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. **Parasitology Today**, v. 16 (5), p. 202-209, 2000.

BETTELLI E; OUKKA M; KUCHROO V K. Th-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. **Nature Immunology**, v. 8, p. 345–350, 2007.

BERHE N; MEDHIN G; ERKO B; SMITH T; GEDAMU S; BEREDED D; GUNDERSEN S G. Variations in helminth faecal egg counts in Kato–Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. 92(3), p. 205-212, 2004.

BLACK C L & WINZI P N. Influence of exposure history on the immunology and development of resistance to human *Schistosomiasis mansoni*. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 4 (3), p. 4295-4305, 2010.

BLACK C L, MUOK E M O, MWINZI P N M, CARTER J M, KARANJA D M S, SECOR W E, COLLEY D G. Increases in levels of *schistosoma*-specific immunoglobulin e and CD23⁺ B cells in a cohort of kenyan children undergoing repeated treatment and reinfection with *Schistosoma mansoni*. **J. Infect. Dis.** ,202:399–405, 2010.

BOOTH MARK, MWATHA J K, JOSEPH S, JONES F M, KADZO H, IRERI E & DUNNE D W. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN- γ , high TNF- α , or low RANTES, depending on age and gender. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 2, p. 1295-1303, 2004.

BRASIL M D S. Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da esquistossomose mansoni: Diretrizes técnicas/ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das doenças transmissíveis. Brasília, **Ministério da Saúde**, 2014.

BRITO L L, BARRETO M L, SILVA R D E C, ASSIS A M, REIS M G, PARRAGA I M and BLANTON R E. Moderate- and low-intensity co-infections by intestinal helminths and *Schistosoma mansoni*, dietary iron intake, and anemia in Brazilian children. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 75, 939–944, 2006.

BUSTINDUY A L, FRIEDMAN J F, KJETLAND E F, EZEAMAMA A E; KABATEREINE N B, STOTHARD J R, KING C H. Expanding praziquantel (pzq) access beyond mass drug administration programs: paving a way forward for a pediatric pzq formulation for schistosomiasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10 (9), 2016.

BUTTERWORTH A E, BENSTED-SMITH R, CAPRON A. Immunity in human *Schistosomiasis mansoni*: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. **Parasitology**.94(pt 2):281-300, 1987.

BUTTERWORTH A, DUNNE D, ANTHONY F, CAPRON M, KHALIFE J, CAPRON A & STURROCK R. Immunity in human *Schistosomiasis mansoni*: cross-reactive igm

and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. **Biochimie**, 70(8), 1053-1063, 1988.

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

CALDAS I R; CAMPI-AZEVEDO A C, OLIVEIRA L F, SILVEIRA A M, OLIVEIRA R C, GAZZINELLI G. Human *Schistosomiasis mansoni*: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108(2-3), p. 109-117, 2008.

CAMPI- AZEVEDO A, GAZZINELLI G, BOTTAZZI M E, CARVALHO A T D, OLIVEIRA R C D, & CALDAS I R. In vitro cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic *Schistosomiasis mansoni* show immunomodulation of cyclin D1, 2, 3 in the presence of soluble egg antigens, 2007.

CARDOSO L S, BARRETO A D S R, FERNANDES J S, OLIVEIRA R R, SOUZA R. D P D, CARVALHO E M & ARAUJO M I. Impaired lymphocyte profile in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. **Clinical and Developmental Immunology**, v 2013, 2013.

CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: **Fiocruz**: p. 965-1008, 2008.

CASTRO V N, RODRIGUES J L, CARDOSO D T, RESENDE S D, MAGALHÃES F C, SOUZA D C, REQUEIJO M H, NEGRÃO-CORRÊA D, GEIGER S M. Systemic Cytokine and Chemokine Profiles in Individuals with *Schistosoma mansoni* Infection and Low Parasite Burden. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. -2975, 2018.

CASS C L, JOHNSON J R, CALIFF L L, XU T, HERNANDEZ H J, STADECKER M J, YATES J R; WILLIAMS D L. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. **Mol Biochem Parasitol** 155: 84–93, 2007.

CAVALCANTI M G, SILVA L F, PERALTA R H S, BARRETO M G M, PERALTA J M. Schistosomiasis in areas of low endemicity: a new era in diagnosis. **Trends in Parasitology** 29, v. (2), p. 75-82, 2013.

CAVALCANTI M G, CUNHA A F A, & PERALTA J M. The Advances in Molecular and New Point-of-Care (POC) Diagnosis of Schistosomiasis Pre-and Post-praziquantel Use: In the Pursuit of More Reliable Approaches for Low Endemic and Non-endemic Areas. **Frontiers in Immunology**, 10, 2019.

Chatila T, Silverman L, Miller R, Geha R. Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. **J Immunol**; 143:1283–1289,1989.

CHEN L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nat Rev Immunol**, 4: 336–347, 2004.

CHENG Y, ZHU X, WANG X, ZHUANG Q, HUYAN X, SUN X, & ZHU X. *Trichinella spiralis* infection mitigates collagen-induced arthritis via programmed death 1-mediated immunomodulation. **Frontiers in Immunology**, 9, 1566, 2018.

CHEN D, LUO X, XIE H, GAO Z, FANG H, HUANG J. Characteristics of IL-17 induction by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver. **Immunology**; 139:523–32, 2013.

CHIARAMONTE M G, SCHOPF L R, NEBEN T Y, CHEEVER A W, DONALDSON D D, & WYNN T. A. IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. **The Journal of Immunology**, 162(2), 920-930, 1999.

CHITSULO L, LOVERDE P, ENGELS D. Schistosomiasis. **Nat Rev Microbiol** 2:12–13, 2004.

CHARO I F & TAUBMAN M B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. **Circulation Research** 95: 858–866, 2004.

CHUAH C, JONES M K, BURKE M L, MCMANUS D P & GOBERT G N. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**: 30 141-150, 2014.

CLERINX J. & VAN GOMPEL A. Schistosomiasis in travellers and migrants. **Travel Med. Infect. Dis.** 9, 6–24, 2011.

COELHO P M Z, JURBERG A D, OLIVEIRA A A & KATZ N. Use of a Saline Gradient for the diagnosis of schistosomiasis. **Memorias do instituto oswaldo cruz**, 104(5), 720–723, 2009.

COELHO P M Z, SIQUEIRA L M V, GRENFELL R F Q, ALMEIDA N B F, KATZ N, ALMEIDA Á & OLIVEIRA E. Improvement of POC-CCA interpretation by using lyophilization of urine from patients with *Schistosoma mansoni* low worm burden: towards an elimination of doubts about the concept of trace. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 10(6), e0004778, 2016.

COLLEY D G, BINDER S, CAMPBELL C, KING C H, TCHUENTÉ L A T, N'GORAN E K, & RATHBUN S. A five-country evaluation of a point-of-care circulating cathodic antigen urine assay for the prevalence of *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 88(3), 426-432, 2013.

COLLEY D G, BUSTINDUY A L, SECOR W E, & KING C H. Human schistosomiasis. **The Lancet** 383 (9936): 2253-2264, 2014.

COLLEY D G, ANDROS T S, CAMPBELL C H. Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: what does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs? **Infectious Diseases of Poverty**, v. 6, n. 1, p. 63, 2017.

CONCEIÇÃO M J, & BORGES-PEREIRA J. Influence of specific treatment on the morbidity of *Schistosomiasis mansoni* in an endemic area of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97(5), 755-757, 2002.

CONCEIÇÃO M J, BORGES-PEREIRA J, COURA J R. A thirty-year follow-up study on *Schistosomiasis mansoni* in a community of Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 102(8): 1007–1009, 2007.

COOK P C, AYNLEY S A, TURNER J D, JENKINS G R, ROOIJEN N V, LEETO M. Multiple helminth infection of the skin causes lymphocyte hyporesponsiveness mediated by Th2 conditioning of dermal myeloid cells. **PLoS Pathog.** 7:e1001323, 2011.

CORRÊA-OLIVEIRA R, CALDAS I R & GAZZINELLI G. Natural versus drug-induced resistance in *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitology Today**, 16(9), 397-399, 2000.

COSTA M F L, ROCHA R S, ZICKER F, & KATZ N. Evolution of schistosomiasis in an hyperendemic area of the Minas Gerais state: two cross-sectional studies. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 27(5), 279-285, 1985.

COURA J R, AMARAL R S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 99(Suppl. 1): 13-9, 2004.

DA'DARA A & SKELLY PJ. Schistosomes versus platelets. *Thromb Res*. 134:1176–81, 2014.

DANSO-APPIAH A, OLLIARO P L, DONEGAN S, SINCLAIR D, UTZINGER J. Drugs for treating *schistosoma mansoni* infection. **Cochrane Database Syst Rev.**;2(2):cd000528, 2013.

DATE D, DAS R, NARLA G, SIMON D I, JAIN M K & MAHABELESWAR G H. Kruppel-like transcription factor 6 regulates inflammatory macrophage polarization. **Journal of Biological Chemistry**, JBC-M113, 2014.

DEELDER A M, KORNELIS D, VAN MARCK E A E, EVELEIGH P C. & VAN EGMOND J G. *Schistosoma mansoni*: characterization of two circulating polysaccharide antigens and the immunological response to these antigens in mouse, hamster, and human infections. **Exp. Parasitol.** 50, 16–32 ,1980.

DE'BROSKI R H, HÖLSCHER C, MOHRS M, ARENDSE B, SCHWEGMANN A, RADWANSKA M & CLAUSSEN B. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. **Immunity**, 20(5), 623-635, 2004.

DE'BROSKI R H, OREKOV T, ROLOSON A, ILIES M, PERKINS C, O'BRIEN W & FINKELMAN FD. Arginase I suppress IL-12/IL-23p40–driven intestinal inflammation during acute schistosomiasis. **The Journal of Immunology**, JI_0902009, 2010.

DE ONIS M, GARZA C, VICTORA C G, ONYANGO A W, FRONGILLO E A, MARTINES J. For the WHO Multicentre Growth Reference Study Group. The WHO

Multicentre Growth Reference Study: Planning, study design and methodology. **Food Nutr. Bull.** v. 25, n. 1, s. 1:S15-25, 2004.

DIAS L C S, GLASSER C M, MARÇAL J R O, BONESSO P I P. Epidemiologia da esquistossomose mansônica em área de baixa endemicidade. **Cad Saúde Pública**, Rio de Janeiro 10(supl 2): 254–260, 1994.

DOENHOFF M, MUSALLAM R, BAIN J, MCGREGOR A. Studies on the host-parasite relationship in *Schistosoma mansoni*-infected mice: the immunological dependence of parasite egg excretion. **Immunology**. 35:771–8, 1978.

DOENHOFF M J, CHIODINI P L & HAMILTON J V. Specific and sensitive diagnosis of schistosome infection: can it be done with antibodies? **Trends Parasitol.** 20, 35–39 2004.

DONNELLY S C, HASLETT C, REID P T, GRANT I S, WALLACE W A, METZ C N, & BUCALA R. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. **Nature Medicine**, 3(3), 320-323, 1997.

DONG H, G ZHU K, TAMADA AND L CHEN. B7-H1, a Third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. **Nat. Med.** 5:1365–1369, 1999.

DUNNE DW & COOKE A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Immunology** 5(5): 420-426, 2005.

EL-BEHI M, CIRIC B, YU S, ZHANG GX, FITZGERALD DC and ROSTAMI A. Differential effect of IL-27 on developing versus committed Th17 cells. **J. Immunol.** 183, 4957–4967, 2009.

ELFAKI T E M, ARNDTS K, WISZNIEWSKY A, RITTER M, GOREISH I A, ATTI E L MEKKI M & LAYLAND L E. Multivariable regression analysis in *schistosoma mansoni*-infected individuals in the Sudan reveals unique immunoepidemiological profiles in uninfected, egg+ and non-egg+ infected individuals. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 10(5), e0004629, 2016.

ENK M J, LIMA A C L, DRUMMOND S C, SCHALL V T, COELHO P M Z. The effect of the number of stool samples on the observed prevalence and the infection intensity with *Schistosoma mansoni* among a population in an area of low transmission. **Acta Tropica** 108(2): 222-228, 2008.

EVERTS B, ADEGNIKA A A, KRUIZE YC, SMITS H, KREMSNER PG, & YAZDANBAKHSH M. Functional impairment of human myeloid dendritic cells during *Schistosoma haematobium* infection. **Plos Negl Trop Dis**, 4(4), e 667, 2010.

FALCÃO P L, CORREA-OLIVEIRA R, FRAGA L A, TALVANI A, PROUDFOOT A E I, WELLS T N, WILLIAMS T J, JOSE PETER J, TEIXEIRA M M. Plasma concentrations and role of macrophage inflammatory protein-1a during chronic *Schistosoma mansoni* infection in humans. **J Infect dis** 186: 1696-1700, 2002.

- FALLON P. & SCHWARTZ C. Schistosoma “eggs-iting” the host: immune dependent granuloma formation and egg excretion. **Frontiers in Immunology**, 9, 2492, 2018.
- FAULKNER H, HUMPHREYS N, RENAULD J C, VAN SNICK J, GRENCIS R. Interleukin-9 is involved in host protective immunity to intestinal nematode infection. **Eur J Immunol** 27:2536–2540, 1997.
- FAVERO V, FRASCA CANDIDO R, DE MARCO V C, JONES M, PIERRE T, LINDHOLZ C G, DA SILVA V. Optimization of the helmintex method for schistosomiasis diagnosis. **Experimental Parasitology**. 177:28–34, 2017.
- FERRER E, VILLEGAS B, MUGHINI-GRAS L, HERNÁNDEZ D, JIMÉNEZ V, CATALANO E & INCANI R N. Diagnostic performance of parasitological, immunological and molecular tests for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in a community of low transmission in Venezuela. **Acta Tropica**, 204, 105360, 2020.
- FIFE B T, PAUKEN K E, EAGAR T N, OBU T, WU J, TANG Q, AZUMA M, KRUMMEL M F and BLUESTONE J A. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. **Nat. Immunol.** 10:1185–1192, 2009.
- FINKELMAN F D & MORRIS S C. Development of an assay to measure in vivo cytokine production in the mouse. **International immunology**, v. 11, n. 11, p. 1811-1818, 1999.
- FISHER. A study of the schistosomiasis of the Stanleyville district of the Belgian Congo. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 28(3): 277in1283-1282in2306, 1934.
- FITZSIMMONS C M, JONES F M, DE MOIRA A P, PROTASIO A V, KHALIFE J, DICKINSON H A & DUNNE D W. Progressive cross-reactivity in IgE responses: an explanation for the slow development of human immunity to schistosomiasis? **Infection and immunity**, 80 (12), 4264-4270,2012.
- FRANCISCO L M, SALINAS V H, BROWN K E, VANGURI V K, FREEMAN G J, KUCHROO V K. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. **J Exp Med** 206:3015–29, 2009.
- FREEMAN G J, CASASNOVAS J M, UMETSU D T, DEKRUYFF R H. TIM genes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. **Immunol Rev** 235:172–189, 2010.
- FRIEDMAN JENNIFER F, KANZARIA HEMAL K, MCGARVEY STEPHEN T. Human schistosomiasis and anemia: the relationship and potential mechanisms. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 386-392, 2005.
- FULFORD A J, BUTTERWORTH A E, OUMA J H, STURROCK R F. A statistical approach to schistosome population dynamics and estimation of the life-span of *Schistosoma mansoni* in man. **Parasitology** 110(03): 307-316, 1995.

GAFFEN S L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nat Rev. Immunol.*;9:556–67, 2009.

GALIOTO A M, HESS J A, NOLAN T J, SCHAD G A, LEE J J, & ABRAHAM D. Role of eosinophils and neutrophils in innate and adaptive protective immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *Infection and Immunity*, 74(10), 5730-5738, 2006.

GAUSE W C, WYNN T A, & ALLEN J E. Type 2 immunity and wound healing: evolutionary refinement of adaptive immunity by helminths. *Nature Reviews Immunology*, 13(8), 607, 2013.

GAZZINELLI G, LAMBERTUCCI J R, KATZ N, ROCHA R S, LIMA M S, COLLEY D G. Immune responses during human *Schistosomiasis mansoni*. XI. Immunologic status of patients with acute infections and after treatment, *J. Immunol.* 135 ,1985.

GEIGER S M, JARDIM-BOTELHO A, WILLIAMS W, ALEXANDER N, DIEMERT DJ & BETHONY J M. Serum CCL 11 (eotaxin-1) and CCL 17 (tarc) are serological indicators of multiple helminth infections and are driven by *Schistosoma mansoni* infection in humans. *Tropical Medicine & International Health*, 18(6), 750-760, 2013.

GIRGIS N M, GUNDRU U M, WARD L N, CABRERA M, FREVERT U, & LOKE P N. Ly6Chigh monocytes become alternatively activated macrophages in schistosome granulomas with help from CD4+ cells. *PLoS Pathogens*, 10(6), e1004080, 2014.

GLEICH G J, FRIGAS E, LOEGERING D A, WASSOM D L, & STEINMULLER D. Cytotoxic properties of the eosinophil major basic protein. *The Journal of Immunology*, 123(6), 2925-2927, 1979.

GORDON S & MARTINEZ F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5), 593-604, 2010.

GRAEFF-TEIXEIRA C, VALAR C, MORAES C K, SALVANY A M, BRUM C DE O. The initial epidemiological studies in the low endemicity schistosomiasis area in Esteio, Rio Grande do Sul, the southern most Brazilian state, 1997 to 2000. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(5), 2004.

GREER G J, OW-YANG C, & YONG H S. *Schistosoma malayensis* n. sp.: a *Schistosoma japonicum*-complex schistosome from Peninsular Malaysia." *The journal of Parasitology*: 471-480, 1988.

GRENFELL R F Q, MARTINS W, ENK M, ALMEIDA A, SIQUEIRA L, SILVA-MORAES V, OLIVEIRA E, CARNEIRO N F F, COELHO PM Z. *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 108(3): 328-334, 2013.

GRIMES J E T, CROLL D, HARRISON W E, UTZINGER J, FREEMAN M C, TEMPLETON M R. The relationship between water, sanitation and schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. *Plos Neglected Tropical Diseases*, p. 1-12, 2014.

GROGAN J L, KREMSNER P G, VAN DAM G J, METZGER W, MORDMÜLLER B DEELDER A M & YAZDANBAKHS M. Antischistosome IgG4 and IgE responses are affected differentially by chemotherapy in children versus adults. **Journal of Infectious Diseases**, 173(5), 1242-1247, 1996.

GROGAN J L, KREMSNER P G, DEELDER A M, and YAZDANBAKHS M. Antigen-specific proliferation and interferon- and interleukin-5 production are down-regulated during *Schistosoma haematobium* infection. **J. Infect. Dis.** 177:1433,1998.

GRYSEELS B, POLMAN K, CLERINX J, KESTENS L. Human schistosomiasis. **Lancet** 368: 1106-1118, 2006.

HAEBERLEIN S, OBIEGLO K, OZIR-FAZALALIKHAN A, CHAYÉ A M M, VENINGA H, VAN DER VLUGT LUCIËN E P M., VOSKAMP A, BOON L, DEN HAAN J M M, WESTERHOF LOTTE B, WILBERS RUUD H P, SCHOTS A, SCHRAMM G, HOKKE CORNELIS H, SMITS HERMELIJN H. Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/ alpha-1, trigger the development of regulatory B cells. **Plos Pathogens** 13(7): e 1006539, 2017.

HAGAN P, BLUMENTHAL U J, DUNN D, SIMPSON A J, & WILKINS H.A. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. **Nature**, 349(6306), 243-245, 1991.

HARRIS N L & LOKE P N. Recent advances in type-2 cell-mediated immunity: insights from helminth infection. **Immunity** 47, 1024–1036, 2017.

HARTNELL A, ROBINSON D S, KAY A B, & WARDLAW A J. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. **Immunology**, 80(2), 281, 1993.

HENRI S, CHEVILLARD C, MERGANI A. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fbrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. **The Journal of Immunology**, vol. 169, no. 2, pp. 929–936, 2002.

HERBERT D R, HÖLSCHER C, MOHRS M, ARENDSE B, SCHWEGMANN A, RADWANSKA M. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. **Immunity**. 20:623–35, 2004.

HESSE M, MODOLELL M, LA FLAMME A C, SCHITO M, FUENTES J M, CHEEVER A W. 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.** 167:6533– 44, 2001.

HEWITSON J P, FILBEY K J, ESSER-VON BIEREN J, CAMBERIS M, SCHWARTZ C, MURRAY J & BOON L. Concerted activity of IgG1 antibodies and IL-4/IL-25-dependent effector cells trap helminth larvae in the tissues following vaccination with defined secreted antigens, providing sterile immunity to challenge infection. **PLoS Pathogens**, 11(3), e1004676, 2015.

HOFFMANN K F, CHEEVER A W and WYNN T A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J. Immunol.** 164:6406, 2000.

HOGG K G, KUMKATE S, ANDERSON S, MOUNTFORD A P. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c+ and F4/80+ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infect Immun.** 71:3563–71, 2003.

HOLMES D A, YEH J H, YAN D, XU M, & CHAN A C. Dusp 5 negatively regulates IL-33-mediated eosinophil survival and function. **The EMBO Journal**, 34(2), 218-235, 2015.

HOTEZ P J, FENWICK A. Schistosomiasis in Africa: an emerging tragedy in our new global health decade. **Plos Negl Trop Dis**, 3:e485,2009.

HUANG Y, & PAUL W E. Inflammatory group 2 innate lymphoid cells. **International immunology**, 28(1), 23-28, 2015.

HUME D A, IRVINE K M & PRIDANS C. The mononuclear phagocyte system: the relationship between monocytes and macrophages. **Trends Immunol.** 40, 98–112 ,2019.

HYATT R A, SOTOMAYOR Z R, SANCHES G, ZAMBRANA M, KNIGHT W B. Factors in the pathogenesis of acute *Schistosomiasis mansoni*. **Journal of Infectious Diseases.** V. 139, p 659-666, 1979.

INOBAYA M T, OLVEDA R M, CHAU T N, OLVEDA D U, ROSS A G. Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. **Res Rep Trop Med.**;2014(5):65–75, 2014.

ISKANDER R, DAS P K, AALBERSE R C. IgG4 antibodies in Egyptian patients with schistosomiasis. **Int Arch Allergy Appl Immunol.**66(2):200-207, 1981.

JAKUBZICK C, WEN H, MATSUKAWA A, KELLER M, KUNKEL S L, HOGABOAM C M. Role of CCR4 ligands, CCL17 and CCL22, during *schistosoma mansoni* egg induced pulmonary granulomaformation in mice. **Am J Pathol** 165(4): 1211-1221, 2004.

JANKOVIC D, CHEEVER AW, KULLBERG M C, WYNN TA, YAP G, CASPAR P. CD4+ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. **J Exp Med.** 187:619–29, 1998.

JENKINS S J , HEWITSON P, JENKINS G R, MOUNTFORD A P. Modulation of the host's immune response by schistosome larvae. **Parasite Immunol.** 10–11385–393, 2005.

JOLLIFFE I. Principal component analysis. **Wiley Online Library**, 2002.

JOSEPH M, AURIAULT C, CAPRON A, VORNG H, VIENS P. A new function for platelets: IgE-dependent killing of schistosomes. **Nature**. 303:810– 2, 1983.

JOSEPH S, JONES F M, WALTER K, FULFORD A J, KIMANI G, MWATHA J K & DUNNE D W. Increases in human T helper 2 cytokine responses to *Schistosoma mansoni* worm and worm-tegument antigens are induced by treatment with praziquantel. **Journal of Infectious Diseases**, 190(4), 835-842,2004.

KABATEREINE N B, VENNERVALD B J, OUMA J H, KEMIJUMBI J, BUTTERWORTH A E, DUNNE D W, FULFORD A J C. Adult resistance to *Schistosomiasis mansoni*: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. **Parasitology**. 118:101–5, 1999.

KABATEREINE N B, BROOKER S, KOUKOUNARI A, KAZIBWE F, TUKAHEBWA E M, FLEMING F M, ZHANG Y B, WEBSTER J P, STOTHARD J R, FENWICK A. Impact of a national helminth control programme on infection and morbidity in Ugandan school children. **Bull World Health Organ**.85:91–9, 2007.

KAPLAN M H. Th9 cells: differentiation and disease. **Immunol Rev**;252(1): 104–15, 2013.

KAPLAN M H, HUFFORD M M, OLSON M R. The development and in vivo function of T helper 9 cells. **Nat Rev Immunol** 15:295–307, 2015.

KATZ N; CHAVES A; PELLEGRINO J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical, São Paulo** 14, 817-820, 1972.

KATZ A; ALMEIDA K. Esquistossomose, Xistosa, Barriga d'água. **Ciência e Cultura, São Paulo**, v. 55, n. 1, p. 38-41, 2003.

KATZ N. Inquérito Nacional de prevalência da Esquistossomose mansoni e geohelminthoses Belo Horizonte: **CPqRR**; 2018.

KATSURADA F. *Schistosoma japonicum*, a new parasite of man, by which an endemic disease in various areas of japan is caused. **Annotationes Zoologicae Japonenses** 5: 146-160, 1904.

KEIR M E, BUTTE M J, FREEMAN G J, SHARPE A H. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. **Annu Rev Immunol**. 26:677–704, 2008.

KHALIFE J, DUNNE D W, RICHARDSON B A, MAZZA G, THORNE K J, CAPRON, A, & BUTTERWORTH A E Functional role of human IgG subclasses in eosinophil-mediated killing of schistosome of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Immunology**, 142(12), 4422-4427, 1989.

KING C H. Parasites and poverty: The case of schistosomiasis. **Acta Trop**. 113(2):95–104, 2010.

KLION A D & NUTMAN T B. The role of eosinophils in host defense against helminth parasites. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 113(1), 30-37, 2004.

KORN T, BETTELLI E, OUKKA M, & KUCHROO V K. IL-17 and Th17 cells. **Annual Review of Immunology**, 27(1), 485–517, 2009.

KROIDL I, CHACHAGE M, MNKAI J, NSOJO A, BERNINGHOFF M, VERWEIJ J & GELDMACHER C. *Wuchereria bancrofti* infection is linked to systemic activation of CD4 and CD8 T cells. **Plos Neglected Tropical Diseases**, 13(8), e0007623, 2019.

KUMKATE S, JENKINS G R, PAVELEY R A, HOGG K G, MOUNTFORD A P. CD207+ Langerhans cells constitute a minor population of skin-derived antigen presenting cells in the draining lymph node following exposure to *Schistosoma mansoni*. **Int J Parasitol**. 37:209–20, 2007.

LABUDA L A, ADEGNIKA A A, ROSA B A, MARTIN J, ATEBA-NGOA U, AMOAH A S & YAZDANBAKHS M. A praziquantel treatment study of immune and transcriptome profiles in *Schistosoma haematobium* -infected gabonese schoolchildren. **The Journal of Infectious Diseases**, 222(12), 2103-2113, 2020.

LAFDIL F, MILLER A M, KI S H, GAO B. Th17 cells and their associated cytokines in liver diseases. **Cell Mol Immunol**; 7:250–4, 2010.

LAL R B, KUMARASWAMI V, KRISHNAN N, NUTMAN T B, OTTESEN E A. Lymphocyte subpopulations in bancroftian filariasis: activated (DR+) CD8+ T cells in patients with chronic lymphatic obstruction. **Clinical and experimental immunology**.;77(1):77–82, 1989.

LAMBERTUCCI J R, VOIETA I. & BARBOSA A J A. Colonic polyp in hepatosplenic *Schistosomiasis mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**. 38, 80–81 2005.

LAMBERTUCCI J R. Acute *Schistosomiasis mansoni*: revisited and reconsidered. **Mem Inst Oswaldo Cruz**; 105: 422-435, 2010.

LATCHMAN Y, CR WOOD, T CHERNOVA, D CHAUDHARY, M BORDE, I. CHERNOVA, Y IWAI, AJ LONG, JA BROWN, R NUNES, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. **Nat. Immunol**. 2:261–268, 2001.

LENZI H L, ROMANHA W S, MACHADO M P, MOTA E M, LEZI J Á. Patologia Experimental com Enfoque o Granuloma Esquistossomótico. In Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose. **Uma visão Multidisciplinar**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008 b.

LI H, NOURBAKHS B, CULLIMORE M, ZHANG G X, ROSTAMI A. IL-9 is important for T-cell activation and differentiation in autoimmune inflammation of the central nervous system. **Eur J Immunol**.;41(8):2197–206, 2011.

LI L, XIE H, WANG M, QU J, CHA H, YANG Q, & HUANG J. Characteristics of IL-9 induced by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver. **Scientific reports**, 7(1), 1-9, 2017.

LICONA-LIMÓN P, HENAO-MEJIA J, TEMANN A U, GAGLIANI N, LICONA-LIMÓN I, ISHIGAME H & FLAVELL R A. Th9 cells drive host immunity against gastrointestinal worm infection. **Immunity**. **39**, 744–57, 2013.

LINDHOLZ C G, FAVERO V, DE MARCO V C, CANDIDO R R F, DE SOUZA R P, DOS SANTOS R. R & GRAEFF-TEIXEIRA C. Study of diagnostic accuracy of Helmintex, Kato-Katz, and POC-CCA methods for diagnosing intestinal schistosomiasis in Candeal, a low intensity transmission area in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, *12*(3), e0006274, 2018.

LIU Y, MUNKER S, MÜLLENBACH R, WENG H L. IL-13 signaling in liver fibrogenesis. **Front Immunol**. *3*:116, 2012.

LOWRY O H, ROSEBROUGH N J, FARR A L, & RANDALL R J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, *193*(1), 265-275, 1951.

LUKACS N W & BOROS D L. Lymphokine regulation of granuloma formation in murine *Schistosomiasis mansoni*. **Clin Immunol Immunopathol**; *68*: 57-63, 1993

LUNDY S K, LUKACS N W. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. **Front Immunol** *4*: 39 doi: 10.3389, 2013.

MAHMOUD A A. F & WOODRUFF A W. The contribution of adult worms to the development of anaemia in schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. *67*, n. *2*, p. 171-3, 1973.

MAIZELS R M, BUNDY D A, SELKIRK M E, SMITH D F, ANDERSON R M. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. **Nature** *365*:797– 805, 1993.

MAIZELS R M & SMITH K A. Regulatory T cells in infection. **Adv Immunol**; *112*:73-136, 2011.

MARTINS-FILHO O A, DUTRA W O, FREEMAN G L, SILVEIRA A M, RABELLO A, COLLEY D G, PRATA A, GAZZINELLI G, CORREA-OLIVEIRA R, CARVALHO-PARRA J: Flow cytometric study of blood leucocytes in clinical forms of human schistosomiasis. **Scand J Immunol**. 1997.

MARTINS-MELO F R, PINHEIRO M C, RAMOS A N, ALENCAR C H, BEZERRA F S, HEUKELBACH J. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000-2011. **INT J Parasitol.**; *44*(14): 1055-62, 2014.

MARTINS-MELO F R, RAMOS A N, ALENCAR C H, & HEUKELBACH J. Trends and spatial patterns of mortality related to neglected tropical diseases in Brazil. **Parasite Epidemiology and Control**, *1*(2), 56-65, 2016.

MARTINS-MELO F R, CARNEIRO M, RAMOS A N, HEUKELBACH J, RIBEIRO A L P, & WERNECK G L. The burden of neglected tropical diseases in Brazil, 1990-2016:

a subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 12(6), e0006559, 2018.

MASSARA C L, PEIXOTO S V, BARROS H D A S, ENK M J, CARVALHO ODOS S & SCHALL V. Factors associated with *Schistosomiasis mansoni* in a population from the municipality of Jaboticatubas, State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99, 127–134, 2004.

MASSARA C L, PEIXOTO S V, ENK M J, DA SILVA BARROS H, DOS SANTOS CARVALHO O, SAKURAI E & SCHALL V. Evaluation of an improved approach using residences of schistosomiasis-positive school children to identify carriers in an area of low endemicity. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 74, 495–499, 2006.

MASURE D, VLAMINCK J, WANG T, CHIERS K, VAN DEN BROECK W, VERCRUYSSSE J, & GELDHOF P. A role for eosinophils in the intestinal immunity against infective *Ascaris suum* larvae. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 7(3), e2138, 2013.

MATOS SA BARRETO AV, NUNES DE LACERDA G A, DE CASTRO FIGUEIREDO A L, NUNES DINIZ G T, SOUZA GOMES E C, COUTINHO DOMINGUES A L. Evaluation of serum levels of IL-9 and IL-17 in human *Schistosoma mansoni* infection and their relationship with periportal fibrosis. **Immunobiology**. 221:1351– 54, 2016.

MAURI C, GRAY D, MUSHTAQ N, LONDEI M. Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells. **J Exp Med** 197: 489–501, 2003.

MBOW M, LARKIN B M, MEURS L, WAMMES L J, DE JONG S E, LABUDA L A. Thelper17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis. **J Infect dis**;207(1):186–95, 2013.

MCKEE AS & PEARCE E J. CD25+ CD4+ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 2, p. 1224-1231, 2004.

MCMANUS D P, DUNNE D W, SACKO M., UTZINGER J, VENNERVALD B J, & ZHOU X N. Schistosomiasis (Primer). **Nature Reviews: Disease Primers**, 2018.

MENON M, BLAIR P A, ISENBERG D A, MAURI C. A regulatory feedback between plasmacytoid dendritic cells and regulatory B cells is aberrant in systemic lupus erythematosus. **Immunity** 44: 683–697, 2016.

METSALU TAUNO & VILO AAK. Clustvis: a web tool for visualizing clustering of multivariate data using principal component analysis and heatmap. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. W1, p. W566-w570, 2015.

MEURS L, BRIENEN E, MBOW M, OCHOLA E A, MBOUP S, KARANJA D M, & VAN LIESHOUT L. Is PCR the next reference standard for the diagnosis of *Schistosoma* in stool? A comparison with microscopy in Senegal and Kenya. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 9(7), e 0003959, 2015.

MIOSSEC P, KORN T, KUCHROO V K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. **N Engl. J Med**;361: 888–98, 2009.

MION F, TONON S, TOFFOLETTO B, CESSSELLI D, PUCILLO C E. IL-10 production by B cells is differentially regulated by immune-mediated and infectious stimuli and requires p 38 activation. **Mol Immunol** 62: 266–276, 2014.

MIKI-HOSOKAWA T, HASEGAWA A, IWAMURA C, SHINODA K, TOFUKUJI S, WATANABE Y, & NAKAYAMA T. CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. **The Journal of Immunology**, 183(12), 8203-8215, 2009.

MODENA C M, LIMA W S, COELHO P M Z. Wild and domesticated animals as reservoirs of *Schistosoma mansoni* in Brazil. **Acta Tropica** 108: 242-244, 2008.

MOIRA A P, FULFORD A J C, KABATEREINE N B, KAZIBWE F, OUMA J H. Microgeographical and tribal variations in water contact and *Schistosoma mansoni* exposure within a Ugandan fishing community. **Trop Med Inter Health** 12(6): 724–735, 2007.

MONNEY L, SABATOS C A, GAGLIA J L, RYU A, WALDNER H, CHERNOVA T, MANNING S, GREENFIELD E A, COYLE A J, SOBEL R A, FREEMAN G J, KUCHROO V K. Th1-specific cell surface protein TIM-3 regulates macrophage activation and severity of autoimmune disease. **Nature** 415:536–541, 2002.

MOORE D L, GROVE D I, WARREN K S. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. **J Pathol.** 121:41– 50, 1977.

MOUNTFORD A P & TROTTEIN F. Schistosomes in the skin: a balance between immune priming and regulation. **Trends Parasitol.** 20:221–6, 2004.

MORTHA A, & BURROWS K. Cytokine networks between innate lymphoid cells and myeloid cells. **Frontiers in Immunology**, 9, 191, 2018.

MUTAPI F, NDHLOVU P D, HAGAN P, WOOLHOUSE M E J. A comparison of humoral responses to *Schistosoma haematobium* in areas with low and high levels of infection. **Parasite Immunol**, 19:255–63, 1997.

MUTAPI F, NDHLOVU P D, HAGAN P. Chemotherapy accelerates the development of acquired immune responses to *Schistosoma haematobium* infection. **J Infect Dis**; 178:289–93, 1998.

MUTAPI F, BURCHMORE R, MDULUZA T, MIDZI N, TURNER C M, MAIZELS R M. Age-related and infection intensity-related shifts in antibody recognition of defined protein antigens in a schistosome-exposed population. **J Infect Dis.**; 198:167–75, 2008.

MUTENGO M M, MWANSA J C L, MDULUZA T, SIANONGO S, AND CHIPETA J. High *Schistosoma mansoni* disease burden in a rural district of Western Zambia, **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 91, no. 5, pp. 965–972, 2014.

MUTENGO M M, MDULUZA T, KELLY P, MWANSA J C L, KWENDA G, MUSONDA P. Low IL-6, IL-10, and TNF- α and High IL-13 cytokine levels are associated with severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* chronically exposed individuals. **J. Parasitol. Res.** 2018:9754060, 2018.

MWINZI P N M, GANLEY-LEAL L, BLACK C L, SECOR W E, KARANJA D M S, COLLEY D G. Circulating CD23⁺ B cell subset correlates with the development of resistance to *Schistosoma mansoni* reinfection in occupationally exposed adults who have undergone multiple treatments. **J. Infect. Dis.**;199: 272–279, 2009.

NAIR M G, GALLAGHER I J, TAYLOR M D, LOKE P N, COULSON P S, WILSON R A, & ALLEN J E. Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. **Infection and Immunity**, 73(1), 385-394, 2005.

NASCIMENTO M, HUANG S C, SMITH A, EVERTS B, LAM W, BASSITY E & PEARCE E J. Ly6Chi monocyte recruitment is responsible for Th2 associated host-protective macrophage accumulation in liver inflammation due to schistosomiasis. **PLoS Pathogens**, 10(8), e1004282, 2014.

NEUFERT C, BECKER C, WIRTZ S, FANTINI M C, WEIGMANN B, GALLE P R, & NEURATH M F. IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1. **European Journal of Immunology**, 37(7), 1809-1816, 2007.

NOGUEIRA D S, GAZZINELLI-GUIMARAES P H, BARBOSA F S, RESENDE N M, SILVA C C, DE OLIVEIRA L M. Multiple exposures to *Ascaris suum* induce tissue injury and mixed Th2/Th17 immune response in mice. **PLoS Negl Trop Dis.** 10:e0004382, 2016.

NOMURA T, TERADA N, KIM W J, NAKANO K, FUKUDA Y, WAKITA A, & KONNO A. Interleukin-13 induces thymus and activation-regulated chemokine (CXCL17) in human peripheral blood mononuclear cells. **Cytokine**, 20(2), 49-55, 2002.

NONBOONYAWAT T, PUSANASUWANNASRI W, CHANRAT N, WONGTHANAVIMOK N, TUBNGERN D, PANUTRAKUL P, & PIYARAJ P. Prevalence and associates of obesity and overweight among school-age children in a rural community of Thailand. **Journal of the Korean Pediatric Society**, 2019.

NOVATO-SILVA E, GAZZINELLI G, COLLEY D G. Immune response during human *Schistosomiasis mansoni*. XVIII. Immunologic status of pregnant women and their neonate. **Scandinavian Journal of Immunology** 35 (3) 429-437, 1992.

NOYA O, KATZ N, POINTIER J P, THERON A, NOYA B A. Schistosomiasis in America. **Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean, Springer:** 11, 2015.

OH-HORA M. Calcium signaling in the development and function of T-lineage cells. **Immunol Rev;** 231:210–224, 2009.

OLIVEIRA F A, MORENO E C, GAZZINELL G, MARTINS-FILHO O A, SILVEIRA A M S, GAZZINELLI A, MALAQUIAS L C C, LOVERDE P, LEITE P M & CORREA-OLIVEIRA R. Cytokine Production Associated with periportal fibrosis during chronic *Schistosomiasis mansoni* in Humans. **American Society for Microbiology**. All Rights Reserved, 2006.

OLIVEIRA W J, MAGALHAES F C, SALDANHA E A M., **CASTRO VN**, FAVERO V, LINDHOLZ C G, OLIVEIRA A A, BARBOSA F S, GIL F, GOMES M A, GRAEFF-TEIXEIRA C, ENK M J, COELHO P M Z, CARNEIRO M, NEGRAO-CORREA D A, GEIGER S M. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, p. 10.1371/journal, 2018.

OLIVEIRA E C A, PIMENTEL T J F, ARAUJO J P M, OLIVEIRA L C S, FERNANDO V C N, LOYO R M. Investigation of schistosomiasis cases and deaths in the city of Recife, Pernambuco, Brazil, 2005-2013. **Epidemiol Serv Saude**. 27(4):1-11, 2018.

OLSEN A, MAGNUSSEN P, OUMA J H, ANDREASSEN J, & FRIIS H. The contribution of hookworm and other parasitic infections to haemoglobin and iron status among children and adults in western Kenya. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 92(6), 643-649, 1998.

ONILE O S, CALDER B, SOARES N C, ANUMUDU C I, & BLACKBURN J M. Quantitative label-free proteomic analysis of human urine to identify novel candidate protein biomarkers for schistosomiasis. **PLoS neglected tropical diseases**, 11(11), e0006045, 2017.

PAN H F, LENG R X, LI X P, ZHENG S G, YE D Q. Targeting T-helper 9 cells and interleukin-9 in autoimmune diseases. **Cytokine Growth Factor Rev** 24:515–522, 2013.

PAUKEN K E & WHERRY E J. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer. **Trends Immunol**. 36, 265–276, 2015.

PEARCE E J, CASPAR P, GRZYCH J M, LEWIS F A, SHER A. Downregulation of Th1 Cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J Exp Med**; 173: 159-166, 1991.

PEARCE E J & MACDONALD A S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews. Immunology**: 2 499-511, 2002.

PEARCE E J, KANE C M, SUN J, TAYLOR J J, MCKEE A S, CERVI L. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunological Reviews** 201 117-126, 2004.

PEARCE E J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasit Immunol**. 27:265–70, 2005.

PEIXINHO E L; ANDRÉ S B; BINA J C. Sintomatologia intestinal na fase crônica da esquistossomose mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 19, n. 1, p. 27-30, 1986.

PELLEGRINO J & SIQUEIRA A F. A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs. **Revista Brasileira de Malariologia e Doencas Tropicais**. 8(4), 589-597, 1956.

PICQUET M, VERCRUYSSSE J, SHAW D J, DIOP M, LY A L. Efficacy of praziquantel against *Schistosoma mansoni* in northern Senegal. **Trans Roy Soc Trop Med Hyg** 92(1): 90–93, 1998.

PRATA A. Disease in *schistosomiasis mansoni* in Brazil. *Schistosomiasis*. A. Mahmoud. London, **Imperial College Press**: 297-332, 2001.

PRENDERGAST C T, SANIN D E, COOK P C, & MOUNTFORD A P. CD4+ T cell hyporesponsiveness after repeated exposure to *Schistosoma mansoni* larvae is dependent upon interleukin-10. **Infection and Immunity**, 83(4), 1418-1430, 2015.

PRENDERGAST C T, SANIN D E, & MOUNTFORD A P. CD4 T-cell hyporesponsiveness induced by schistosome larvae is not dependent upon eosinophils but may involve connective tissue mast cells. **Parasite Immunology**, 38(2), 81-92, 2016.

PURWAR R, SCHLAPBACH C, XIAO S, KANG H S, ELYAMAN W, JIANG X, JETTEN A M, KHOURY S J, FUHLBRIGGE R C, KUCHROO V K, CLARK R A, KUPPER T S. Robust tumor immunity to melanoma mediated by interleukin-9-producing T cells. **Nat Med**. 10:1038, 2012.

RABELLO A L T, GARCIA M M A, PINTO DA SILVA R A, ROBERTO S, KATZ N. Humoral Immune Responses in Patients with Acute *Schistosoma mansoni* Infection Who were followed up for two years after treatment. **Clin Infect Dis**; 24: 304-8, 1997.

RAJAMANICKAM A & BABU SUBASH. Determining the frequencies of Th9 cells from whole blood. In: Th9 cells. **Humana Press, New York, NY**, P. 83-92, 2017.

RAMAROKOTO C E, KILDEMOE A O, RANDRIANA SOLO B S, RAVONARIMBININA P, RAVAOALIMALALA V E, LEUTSCHER P & VENNERVALD B J. Eosinophil granule proteins ECP and EPX as markers for a potential early-stage inflammatory lesion in female genital schistosomiasis (FGS). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8(7), e2974, 2014.

RANI R, JORDAN M B, DIVANOVIC S, & DE'BROSKI R H. IFN- γ -Driven IDO Production from Macrophages Protects IL-4R α -Deficient Mice against Lethality during *Schistosoma mansoni* Infection. **The American Journal of Pathology**, 180(5), 2001-2008. 2012.

REIMAN R M, THOMPSON R W, FENG C G, HARI D, KNIGHT R, CHEEVER A W. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. **Infect Immun**. 74:1471– 9, 2006.

RESENDE S D, MAGALHÃES F C, RODRIGUES J L, **CASTRO V N**, SOUZA C S A, OLIVEIRAE J, CARNEIRO M, GEIGER S M, NEGRÃO-CORRÊA D A. Modulation of Allergic Reactivity in Humans Is Dependent on *Schistosoma mansoni* Parasite Burden, Low Levels of IL-33 or TNF- α and High Levels of IL-10 in Serum". **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 2018.03158, 2019.

RICHARD M, GRENCIS R K, HUMPHREYS N E, RENAULD J C, VAN SNICK J. Anti-IL-9 vaccination prevents worm expulsion and blood eosinophilia in *Trichuris muris*-infected mice. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97:767–772, 2000.

ROCKEY J H, JOHN T, DONNELLY J J, MCKENZIE D F, STROMBERG B E, & SOULSBY E J. In vitro interaction of eosinophils from ascarid-infected eyes with *Ascaris suum* and *Toxocara canis* larvae. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 24(10), 1346-1357, 1983.

RODRIGUES L C, WHEELER J G, SHIER R, GUERRA H L, PIMENTA J R F. Predicting the community prevalence of *Schistosomiasis mansoni* from the prevalence among 7- to 14-year-olds. **Parasitology** 121(5): 507–512, 2000.

RODRIGUES O J L, TEIXEIRA M M, LAMBERTUCCI J R, ANTUNES C M F, CARNEIRO M, & NEGRÃO-CORRÊA D. Plasma levels of innate immune mediators are associated with liver fibrosis in low parasite burden *Schistosoma mansoni*-infected individuals. **Scandinavian Journal of Immunology**, 87(3), e12642, 2018.

ROLOT M, DOUGALL A M, CHETTY A, JAVAUX J, CHEN T, XIAO X & DEWALS B G. Helminth-induced IL-4 expands bystander memory CD8+ T cells for early control of viral infection. **Nature Communications**, 9(1), 1-16, 2018.

ROSS A G, VICKERS D, OLDS G R, SHAH S M. & MCMANUS D P. Katayama syndrome. **Lancet Infect. Dis.** 7, 218–224 ,2007.

ROSSER E C & MAURI C. Regulatory B cells: Origin, phenotype, and function. **Immunity** 42: 607–612, 2015.

ROSSI A G, HASLETT C, HIRANI N, GREENING A P, RAHMAN I, METZ C N & DONNELLY S C. Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). Potential role in asthma. **The Journal of clinical Investigation**, 101(12), 2869-2874, 1998.

ROTHENBERG M E, & HOGAN S P. The eosinophil. **Annual Review of Immunology**, 24,2006.

ROTTMAN J B. Key role of chemokines and chemokine receptors in inflammation, immunity, neoplasia, and infectious disease. **Vet Pathol**; 36: 357-367, 1999.

RUMBLEY C A, SUGAYA H, ZEKAVAT S A, EL REFAEI M, PERRIN P J, PHILLIPS S M. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. **J Immunol.** 162:1003–9, 1999.

RUTITZKY L I, LOPES DA ROSA J R, STADECKER M J. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. **J Immunol** ,175:3920–6, 2005.

RUTITZKY L I, BAZZONE L, SHAINHEIT M G, JOYCE-SHAIKH B, CUA D J, STADECKER M J. IL-23 is required for the development of severe egg induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression. of IL-17. **J Immunol**. 180:2486–95, 2008.

RUTITZKY L I & STADECKER M J. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ . **Eur J Immunol**. 41:2677– 87, 2011.

SATTI M Z, VENNERVALD B J, SULAIMAN S M, DAFFALLA A A, GHALIB H W. Specific immunoglobulin measurements related exposure and resistance to *Schistosoma mansoni* infection in Sudanese canal cleaners. **Clin Exp Immunol**. 106,45-54, 1996.

SCHALL V, MASSARA C L, ENK M J, BARROS H S, MIRANDA E S. Os caminhos da Esquistossomose dentro do nosso corpo. Série esquistossomose nº 8 parte 1. Belo horizonte: **Fiocruz/Instituto René Rachou**, 2007.

SCHLAPBACH C, GEHAD A, YANG C, WATANABE R, GUENOVA E, TEAGUE J E, CAMPBELL L, YAWALKAR N, KUPPER T S, CLARK R A. Human Th9 cells are skin-tropic and have autocrine and paracrine proinflammatory capacity. **Sci Transl Med** 6:219ra8, 2014.

SCHWARTZ C, OESER K, PRAZERES DA COSTA C, LAYLAND L E, VOEHRINGER D. T cell derived IL-4/IL-13 protects mice against fatal *Schistosoma mansoni* infection independently of basophils. **J Immunol**. 193:3590– 9, 2014.

SCHWARTZ C & FALLON PG. *Schistosoma* “eggs-iting” the host: granuloma formation and egg excretion. **Front Immunol**. 9:2492, 2018.

SESAY S, PAYE J, BAH M S, MCCARTHY F M, CONTEH A, SONNIE M. *Schistosoma mansoni* infection after three years of mass drug administration in Sierra Leone. **Parasit Vectors**;7(1):1–9, 2014.

SHARPE A H, & PAUKEN, K E. The diverse functions of the PD1 inhibitory pathway. **Nature Reviews Immunology**, 18(3), 153, 2018

SHAINHEIT M G, LASOCKI K W, FINGER E, LARKIN B M, SMITH P M, SHARPE A H. The pathogenic Th17 cell response to major schistosome egg antigen is sequentially dependent on IL-23 and IL-1 beta. **J Immunol**. 187:5328– 35, 2011.

SHER A, COFFMAN R L, HIENY S, SCOTT P, CHEEVER A W. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proc Natl Acad Sci USA**. 87:61–5, 1990.

SHIMIZU T, ABE R, OHKAWARA A, & NISHIHARA J. Increased production of macrophage migration inhibitory factor by PBMCs of atopic dermatitis. **Journal of allergy and clinical immunology**, 104(3), 659-664, 1999.

SMITHERS S, DOENHOFF M J, COHEN S, WARREN S K. Immunology of parasitic diseases. **Blackwell Scientific, Oxford** p. 527, 1982.

SILVEIRA A M S, GAZZINELLI G, OLIVEIRA L F, BETHONY J, GAZZINELLI A, QUEIROZ C C, ALVAREZ M C B, SILVA F C, PRATA A, LOVERDE P T, OLIVEIRA R C. Human *Schistosomiasis mansoni*: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon- γ and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene** 98(9): 514-519, 2004.

SILVEIRA-LEMOES D, TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO O A, OLIVEIRA L F A, COSTA-SILVA M F, MATOSO L F & CORRÊA-OLIVEIRA R. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. **Acta Tropica**, 108(2-3), 150-159, 2008.

SMITHERS S, DOENHOFF M J, COHEN S, WARREN S K. Immunology of parasitic diseases. **Blackwell Scientific, Oxford** p. 527, 1982.

SMITH P, WALSH C. M, MANGAN N E, FALLON R E, SAYERS J. R, MCKENZIE A N, & FALLON P G. *Schistosoma mansoni* worms induce anergy of t cells via selective up-regulation of programmed death ligand 1 on macrophages. **The journal of immunology**, 173(2), 1240-1248, 2004.

SMITH K A, FILBEY K J, REYNOLDS L A, HEWITSON J P, HARCUS Y, BOON L. Low level regulatory T cell activity is essential for functional type-2 effector immunity to expel gastrointestinal helminths. **Mucosal Immunol**; 9:428-43, 2016.

SOROOSH P & DOHERTY T A. Th9 and allergic disease. **Immunology**.127:450–458, 2009.

SOUZA C P F, VITORINO R R, COSTA A P, FARIA F C F, SANTANA L A, GOMES A P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**: 9 (4) 300-307, 2011.

STADECKER M J, ASAHI H, FINGER E, HERNANDEZ H J, RUTITZKY L I, SUN J. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunol Rev**; 201: 168-79, 2004.

STEEL C & NUTMAN T B. CTLA-4 in filarial infections: implications for a Role in diminished T cell reactivity. **J Immunol** 170:1930 –1938 ,2003.

STEINMANN P, KEISER J, BOS R, TANNER M, UTZINGER J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 411–425, 2006.

STEMPIN C C, MOTRAN C C, AOKI M P, FALCON C R, CERBAN F M, CERVI L. PD-1 2 negatively regulates Th1-mediated immunopathology during *Fasciola hepática* infection. **Oncotarget** 7:77721–31, 2016.

STIREWALT M A. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. In: **Advances in Parasitology**. Academic press, P. 115-182, 1974.

STUMHOFER J S, LAURENCE A, WILSON E H, HUANG E, TATO C M, JOHNSON L M & HUNTER C A. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. **Nature Immunology**, 7(9), 937-945, 2006.

STURROCK R F, KARIUKI H C, THIONGO F W, GACHARE J W, OMONDI B G, OUMA J H. *Schistosomiasis mansoni* in Kenya: Relationship between infection and anaemia in schoolchildren at the community level. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 90: 48–54, 1996.

STIREWALT M A Penetration stimuli for schistosome cercariae, 1971.

STRAUSS E. Hepatosplenic schistosomiasis: a model for the study of portal hypertension. **Ann. Hepatol.** 1, 6–11, 2002.

SUN X, CAI Y, FLEMING C, TONG Z, WANG Z, DING C. Innate $\gamma\delta$ T17 cells play a protective role in DSS-induced colitis *via* recruitment of Gr-1+CD11b+ myeloid suppressor cells. **Oncoimmunology**; 6:e1313369, 2017.

TAYLOR M D, VAN DER WERF N, & MAIZELS R M. T cells in helminth infection: the regulators and the regulated. **Trends in Immunology**, 33(4), 181-189, 2012.

NASH T E, CHEEVER A W, OTTESEN E A, COOK J Á. Schistosome infections in humans: perspectives and recent findings, **Ann. Intern. Med.** 97, 740e754, 1982.

TEIXEIRA C F, NEUHAUSS E, BEN R, ROMANZINI J & GRAEFF-TEIXEIRA C. Detection of *Schistosoma mansoni* eggs in feces through their interaction with paramagnetic beads in a magnetic field. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 2, p. e73, 2007.

TEIXEIRA-CARVALHO A, MARTINS-FILHO A O, PERUHYPE-MAGALHÃES V, SILVEIRA-LEMOS D, MALAQUIAS L C C, ALVES-OLIVEIRA L F, SILVEIRA A M S, GAZZINELLI A, ALVAREZ M C B, GAZZINELLI G, CORRÊA-OLIVEIRA R. Cytokines, chemokines receptors, CD4+CD25^{HIGH} T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. **Acta Trop**; 108: 139-149, 2008.

TESTI R Â, PHILLIPS J H, LANIER L L. T cell activation via Leu-23 (CD69). **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 4, p. 1123-1128, 1989.

TESTI R, D'AMBROSIO D, DE MARIA R, & SANTONI A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. **Immunol Today**, 15(10): 479-83, 1994.

TODD C W, GOODGAME R W & COLLEY D G. Immune responses during human *Schistosomiasis mansoni*. VII. Further analysis of the interactions between patient sera and lymphocytes during in vitro blastogenesis to schistosome antigen preparations, **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 29 ,875e881, 1980.

TRAN M H, PEARSON M S, BETHONY J M, SMYTH D J, JONES M K, DUKE M. Tetraspanins on the surface of *Schistosoma mansoni* are protective antigens against schistosomiasis. **Nat Med.** 12:835–40, 2006.

TURNER J D, JENKINS G R, HOGG K G, AYNSLEY S A, PAVELEY R A, COOK P C, COLES M C, MOUNTFORD A P. “CD4CD25 regulatory cells contribute to there gelation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by schistosome infection. **PLoS Negl Trop Dis** 5:(8) 1269, 2011.

TUXUN T, APAER S, MA H Z, ZHANG H, AIERKEN A, LIN RY. The potential role of Th9 cell related cytokine and transcription factors in patients with hepatic alveolar echinococcosis. **J Immunol Res.** (2):895416, 2015.

VAN DAM G J, BOGITSH B J, VAN ZEYL R J M, ROTMANS J P. & DEELDER A M. *Schistosoma mansoni*: in vitro and in vivo excretion of CAA and CCA by developing schistosomula and adult worms. **J. Parasitol.** 82, 557, 1996.

VAN DAM G J, WICHERS J H, FERREIRA T F, GHATI D, VAN AMERONGEN A, & DEELDER A M. Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. **Journal of Clinical Microbiology**, 42(12), 5458-5461, 2004.

VAN DAM G J, CLAUDIA J, LEWIS M, DEELDER A M, VAN LIESHOUT L, TANKE H J, & CORSTJENS P L. A robust dry reagent lateral flow assay for diagnosis of active schistosomiasis by detection of *Schistosoma* circulating anodic antigen. **Experimental Parasitology**, 135(2), 274-282, 2013.

VAN DAM G J, ODERMATT P, ACOSTA L, BERGQUIST R, CLAUDIA J, KORNELIS D, & CORSTJENS P L. Evaluation of banked urine samples for the detection of circulating anodic and cathodic antigens in *Schistosoma mekongi* and *S. japonicum* infections: a proof-of-concept study. **Acta Tropica**, 141, 198-203, 2015.

VAN DER VLUGT L E, LABUDA L A, OZIR-FAZALALIKHAN A, LIEVERS E, GLOUDEMANS A K, LIU K Y, & SMITS H H Schistosomes induce regulatory features in human and mouse CD1d (hi) B cells: inhibition of allergic inflammation by IL-10 and regulatory T cells. **PLoS One**, 7(2), e30883, 2012.

VAN LIESHOUT L, POLDERMAN A M, DE VLAS S J, DE CALUWÉ P, KRIJGER FW, GRYSEELS B, & DEELDER A M. Analysis of worm burden variation in human *Schistosoma mansoni* infections by determination of serum levels of circulating anodic antigen and circulating cathodic antigen. **Journal of Infectious Diseases**, 172(5), 1336-1342,1995.

VANNELLA K M, BARRON L, BORTHWICK L A, KINDRACHUK K N, NARASIMHAN P B, HART K M & WYNN T A. Incomplete deletion of IL-4R α by

LysMCre reveals distinct subsets of M2 macrophages controlling inflammation and fibrosis in chronic schistosomiasis. **PLoS Pathogens**, 10(9), e1004372, 2014.

VELDHOEN M, UYTENHOVE C, VAN SNICK J, HELMBY H, WESTENDORF A, BUER J, & STOCKINGER B. Transforming growth factor- β 'reprograms' the differentiation of T helper 2 cells and promotes an interleukin 9-producing subset. **Nature Immunology**, 9(12), 1341, 2008.

VENNERVALD B J, KENTY L, BUTTERWORTH A E, KARIUKI C H, KADZO H, IRERI E & BOOTH M. Detailed clinical and ultrasound examination of children and adolescents in a *Schistosoma mansoni* endemic area in Kenya: hepatosplenic disease in the absence of portal fibrosis. **Trop. Med. Int. Health** 9, 461–470, 2004.

VIANA A G, GAZZINELLI-GUIMARÃES PH, **DE CASTRO V N**, DOS SANTOS Y L D O, RUAS A C L, DE M BEZERRA F S, BUENO L L, DOLABELLA S S, GEIGER S M, PHILIPS A E & FUJIWARA R T. Discrepancy between batches and impact on the sensitivity of point-of-care circulating cathodic antigen tests for *Schistosoma mansoni* infection. **Acta Tropica**, 105049, 2019.

VOGE M, BRUCKNER D & BRUCE J I. *Schistosoma mekongi* sp. N. From man and animals, compared with four geographic strains of *Schistosoma japonicum*. **The Journal of Parasitology**: 577-584, 1978.

VON LICHTENBERG F, ERICKSON D G, SADUN E H. Comparative histopathology of schistosome granulomas in the hamster. **Am J Pathol**. 72:149–78, 1973.

VOS T, FLAXMAN A D, NAGHAVI M, LOZANO R, MICHAUD C, EZZATI M. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. **Lancet**. 380:2163–96, 2012.

WANG L M, KEEGAN A D, PAUL W E, HEIDARAN M A, GUTKIND J S, PIERCE J H. IL-4 activates a distinct signal Transduction Cascade from IL-3 in factor-dependent myeloid cells. **Embo J**. Dec;11(13):4899-908, 1992.

WATANABE K, MWINZI PN, BLACK CL, MUOK E M, KARANJA D M, SECOR WE, & COLLEY DG. T regulatory cell levels decrease in people infected with *Schistosoma mansoni* on effective treatment. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 77(4), 676-682, 2007.

WEBSTER M, FALLON P G, FULFORD A J C, BUTTERWORTH A E, OUMA J H, KIMANI G & DUNNE D W. Effect of praziquantel and oxamniquine treatment on human isotype responses to *Schistosoma mansoni*: elevated IgE to adult worm. **Parasite Immunol**. 19:333–5, 1997.

WEERAKOON K G, GOBERT G N, CAI P. & MCMANUS D P. Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. **Clin. Microbiol. Rev**. 28, 939–967, 2015.

WILKINS H A, GOLL P H, MARSHALL T F D, MOORE P J. Dynamics of *Schistosoma haematobium* infection in a gambian community.III. Acquisition and loss of infection. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, 78:227–32, 1984.

WILLENBORG D O, FORDHAM S A, STAYKOVA M A, RAMSHAW I A & COWDEN W B. IFN- γ is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. **J. Immunol.** 163, 5278–5286, 1999.

WINKEL B M, DALENBERG M R, DE KORNE C M, FEIJT C, LANGENBERG M. C, PELGROM L & EVERTS B. Early induction of human regulatory dermal antigen presenting cells by skin-penetrating *Schistosoma mansoni* Cercariae. **Frontiers in Immunology**, 9, 2510, 2018.

WOOLHOUSE M E J, HAGAN P. Seeking the ghost of worms past. **Nature Med.** 5:1225–27, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Physical status - the use and interpretation of anthropometry: report of a WHO expert committee. **Geneva:** WHO, 1995. 452p. (WHO Technical report series; 854).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Anthro Plus Software and macros. 2005. Disponível em <http://www.who.int/childgrowth/software/en/>. Acesso em 31 de janeiro de 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. **Geneva: World Health Organization.** 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Elimination of schistosomiasis from low-transmission areas: report of a who informal consultation, Salvador, Bahia, Brazil, 18-19 August 2008. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases. **A roadmap for implementation.** 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2014. **Wkly Epidemiol rec.** 2016;91(5):53–60, 2014.

WHO/PAHO-WORLD HEALTH ORGANIZATION/PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis regional meeting. Defining a road map toward verification of elimination of schistosomiasis transmission in Latin America and the Caribbean by 2020. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO methods and data sources for global burden of disease estimates 2000-2016. **Geneva;** 2018.

YANG Y Y, VAN DIEPEN A, BRZEZICKA K, REICHARDT N C, & HOKKE C H. Glycan microarray-assisted identification of IgG subclass targets in schistosomiasis. **Frontiers in Immunology**, 9, 2331, 2018.

- YAMAGUCHI E, NISHIHARA J, SHIMIZU T, TAKAHASHI T, KITASHIRO N, HIZAWA N & KAWAKAMI Y. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) in bronchial asthma. Clinical and experimental allergy: **Journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, 30(9), 1244-1249, 2000.
- YANABA K, BOUAZIZ J D, HAAS K M, POE JC, FUJIMOTO M. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. **Immunity** 28: 639–650, 2008.
- YAZDANBAKHSH M. Common features of T cell reactivity in persistent helminth infections: lymphatic filariasis and Schistosomiasis. **Immunol Lett**, 65:109–115, 1999.
- YOSHIMOTO T, YASUDA K, MIZUGUCHI J & NAKANISHI K. IL-27 suppresses Th2 cell development and Th2 cytokines production from polarized Th2 cells: a novel therapeutic way for Th2-mediated allergic inflammation. **J. Immunol.** 179: 4415–4423, 2007.
- YUYUN D, ZHIHUA T, HAIJUN W, ZHAOPING L, XIAOLI Z, WENFANG X & HONGMEI L. Predictive value of the red blood cell distribution width-to-platelet ratio for hepatic fibrosis. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, 54(1), 81-86, 2019.
- ZHANG Y, HUANG D, GAO W, YAN J, ZHOU W, HOU X. Lack of Il-17 signaling decreases liver fibrosis in murine *Schistosomiasis japonica*. **Int immunol.** 27(7):317–25, 2015.
- ZHAN T, ZHANG T, WANG Y, WANG X, LIN C, MA H, & XIA C. Dynamics of Th9 cells and their potential role in immunopathogenesis of murine schistosomiasis. **Parasites & Vectors**, 10(1), 305, 2017.
- ZHAN T, MA H, JIANG S, ZHONG Z, WANG X, LI C & XIA C. Interleukin-9 blockage reduces early hepatic granuloma formation and fibrosis during *Schistosoma japonicum* infection in mice. **Immunology**, 158(4), 296-303, 2019.
- ZHENG B, ZHANG J, CHEN H, NIE H, MILLER H, GONG Q & LIU C T lymphocyte-mediated liver immunopathology of schistosomiasis. **Frontiers in Immunology**, 11, 61, 2020.
- ZHOU S, JIN X, LI Y, LI W, CHEN X, XU L. Blockade of PD-1 signaling enhances Th2 cell responses and aggravates liver immunopathology in mice with *schistosomiasis japonica*. **Plos Negl Top Dis.** 10:e5094, 2016.
- ZHU J, YAMANE H, & PAUL W E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annual Reviews of Immunology**, 28, 445–489, 2010.
- ZIEGLER S F, RAMSDELL F, HJERRILD K A, ARMITAGE R J, GRABSTEIN K H, HENNEN K B & ALDERSON M. R. Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. **Eur J Immunol**, 23(7): 1643-8, 1993.

15. Apêndice

15.1. Apêndice A- Questionário

Pesquisa de esquistossomose e outras possíveis parasitoses intestinais na região de Januária –mg questionário

Município _____ Criança n° _____

Idade _____

Nome _____

Escola _____

Endereço _____

Antropometria

Peso | _____ | kg estatura | _____ | cm

Circunferências: Perímetro abdominal | _____ | cm

Antecedentes patológicos

- 1) Possui alguma doença crônica? () Sim () Não Se sim, qual?
- 2) Já teve alguma doença parasitária intestinal? () Sim () Não. Se sim, qual? () lombriga (*A. lumbricoides*) () Amarelão (*A. duodenale* e *N. americanus*) () Outra,
- 3) Já teve a doença esquistossomose? () sim () não.
- 4) Usou medicação com praziquantel? () sim () não Se sim, com que frequência?
- 5) Apresenta algum dos seguintes sintomas? () diarreia () perda de peso () dor abdominal () anemia () Distensão abdominal

Informações sobre família, residência e saneamento

- 6) Escolaridade da mãe/pai: () analfabeto () fundamental incompleto () fundamental completo () Médio incompleto () Médio completo () superior incompleto () superior completo
- 7) Perímetro: () Urbano () Rural
- 8) Há quanto tempo a família reside no local? () < 6 meses () entre 6 e 11 meses () > 12 meses
- 9) Número de membros da casa _____
- 10) Tipo de casa:
- 11) Onde o provedor da casa trabalha? () roça, () bolsa família, () Dona de casa

Parede () alvenaria () madeira () lata () outros

Teto () telha () amianto () laje () outros

Piso () terra () cimento () taco () cerâmica () outros

12) N° de cômodos _____

- 13) Quem cuida da casa – Higiene/Alimentos? () Mãe () Pai () Tia(o) () Avó(ô) ()
Empregada () Outros
- 14) Possuem horta em casa? () Sim () Não
- 15) Origem da água para consumo: () Mina () Poço artesiano () Torneira pública ()
Encanada () Rio () Açude () Outros
- 16) A água bebida é: () Coadada () Filtrada () Fervida () Direto da coleção hídrica ()
Fluoretada () Clorada () Outros
- 17) Coleção hídrica mais próxima: () Vala de horta () Cachoeira () Córrego () Lago ()
Poço artesiano () Açude () Rio () Mina () Represa () Poça d' água em ponto de
passagem obrigatório
- 18) Tempo gasto a pé até a coleção hídrica: () < 15 min () 15 a 30 min () > 30 min
- 19) Falta água na casa? () Sim () Não 16) Em caso afirmativo: Quantos dias/mês?
- 20) A casa possui caixa d'água? () Sim () Não
- 21) Periodicidade com que a água cai na caixa d'água (vezes por semana): () 1 () 2 () 3 ()
() 4 () 5 () 6 () Todos os dias
- 22) Tipo de instalação sanitária: () Privada com água e descarga () Privada com fossa seca ()
() Sem privada, com assento no chão () Nenhum
- 23) Localização da instalação sanitária: () Dentro da residência () Fora da residência
- 24) Se fora da residência: () Acima da horta () Acima da fonte de água () NA
- 25) Destino do esgoto: () Via pública canalizada () Rio ou córrego () Fossa séptica () Mato
() Vala negra () Outros:
-
- 26) Destino do lixo da casa: () Coleta pública () Queima () Mato () Buraco () Rio/Córrego
() Outros:
-

Hábitos alimentares e de higiene pessoal

- 27) Quando você lava as mãos? () antes de comer () após usar o banheiro () após brincar
com animais () nunca lava
- 28) Costuma andar descalço fora de casa? () sim () Não
- 29) Brinca em córregos, riachos, lagoas? () sim () não
- 30) Lavagem dos vegetais crus e frutas: () Não lava () Lava em água corrente () Lava com
água e sabão () Deixa de molho com água e vinagre () Deixa de molho com água e água
sanitário
- 31) Onde adquire esses vegetais: () Horta/pomar própria () Horta/pomar de vizinho ou
parente () Horta/pomar comunitária () Feira livre () Mercado/Supermercado () Outros
() NA
- 32) Tipo de carne consumida (S/N): **Boi:** () Cozida () Churrasco bem passado ()
Churrasco mal passado () Bife bem passado () Bife mal passado () Quibe cru () Quibe
frito ou assado () Outros **Porco:** () Cozida () Churrasco bem passado () Churrasco mal
passado () Bife bem passado () Bife mal passado () Lingüiça crua () Lingüiça mal
passada () Outros

15.2. Apêndice B- Análise de medianas e interquartis de sobrenadantes de PBMCs dos grupos NE, CB e CMA sem estímulo (SE) e com estímulos positivo (PMA+I), antes do tratamento (T0) e 30 dias após tratamento (T30d).

MIF (Intensidade Média de fluorescência)	NE (PMA+I) T0 n=10	NE (SE) T0 n=10	CB (PMA+I) T0 n=10	CB (SE) T0 n=10	CMA (PMA+I) T0 n=9	CMA (SE) T0 n=9
CD69	478 (287,0-3473)	173,5 (138,5-265,3)	82,55 (83,93-2655)	85,75 (82,88-318)	1619 (64,50-2314)	124 (115,5-148)
HLA-DR	847,5 (279-1060)	424 (199-621,5)	381,5 (0-849)	255 (0-650,8)	503 (446-4169)	445 (234,5-2973)
PD-1	284 (129,7-653)	186 (167,0-221)	337 (180,0-644,8)	188 (180,0-608)	166 (56,1-409)	33,6 (25,7-163,3)
TIM-3	114 (71,9-187,5)	102,7 (61,1-170,3)	105,7 (-17,70-253,8)	-14,3 (-18,15-218,5)	108 (94,3-131,5)	69,35 (63,4-98,8)
IL-9	953 (469,0-1858)	732 (297,6-1036)	79,2 (30,5-119,6)	-169 (-242,0-0,1)	372 (181-744)	391 (186,5-447,5)
IL-4	534 (365,3-1195)	435 (260,5-514)	224,9 (8,3-490,5)	11,5 (8,1-281)	769 (520,5-889,5)	594,5 (382-677,3)
IL-10	549 (70,2-879)	464 (46,1-585)	99,34 (-4,5-215,5)	-0,93 (-3,8-159)	280 (180,5-386)	246 (189,5-328,5)
RORγT	281,5 (227,3-359,8)	208 (166-230,8)	72,4 (4,6-163,8)	6,3 (4-91,4)	305 (174-399)	195 (153-244)
CCR-6	392 (172,5-900)	256 (156,8-772,8)	376,6 (15,3-944,8)	21,25 (13,7-216,2)	143 (83,7-252)	77,9 (73,6-216,2)
IL-17	182 (120,9-776,5)	141 (34,6-157,5)	159,4 (25,7-238,5)	-1,61 (-3,2-54,1)	223 (191,5-286,5)	243,5 (210,3-258,8)

PMA+ I (PMA + Ionomicina); SE (Sem estímulo) em 24 h de incubação . Mediana e interquartis

% (Porcentagem)	NE (PMA+I) T0 n=10	NE (SE) T0 n=10	CB (PMA+I)T0 n=10	CB (SE) T0 n=10	CMA (PMA+I) T0 n=9	CMA (SE) T0 n=9
CD69	75,2 (29,0-92,5)	79,5 (23,4-84,0)	14,8 (3,9-32,8)	7,8 (3,5-10,2)	70,7 (7,1-73,7)	40,3 (12,8-63,7)
HLA-DR	93,9 (65,63-98,3)	85,3 (14,18-98,4)	45,8 (21,35-70,60)	35,1 (4,405-65,05)	45,9 (28,1-93,90)	36,9 (10,8-81,05)
PD-1	56,8 (16,8-84,5)	53,3 (18,4-67,6)	27,8 (23,3-36,8)	30,7 (18,3-51,8)	60,4 (21,3-64,6)	42 (4,6-49)
TIM-3	2,5 (1,8-9,1)	1,5 (1-2,9)	1 (0-2,7)	0,5 (0-0,8)	5,2 (1,7-18)	1,07 (0,6-3,2)
IL-9	6,7 (1,7-10,6)	4,8 (2,4-9,5)	5,5 (2,8-13,9)	3,9 (1,1-9,5)	4,5 (1,4-7,8)	3,4 (2-5,7)
IL-4	7,2 (4,3-19,5)	3,3 (2,3-5,6)	6,5 (1,6-10,4)	1,4 (1,2-8,7)	7,1 (2,9-10,4)	4,2 (2,4-5,6)
IL-10	3,54 (1,3-7,6)	1,23 (0,3-5,5)	2,79 (0,3-6,8)	1,395 (0,4-1,6)	1,76 (1-5,6)	0,93 (0,6-1,3)
RORγT/IL-17	13,8(5,6-20,3)	5,7 (3,8-8,4)	9,7 (5,9-15,6)	4,7 (2,5-16,8)	11,3 (7,5-18)	3,9 (2,1-8,4)
CCR-6	68,5 (33,1-80,4)	65 (10,5-80,6)	24,4 (12,7-34,1)	10,2 (2,7-30,8)	51,7 (44,2-63,8)	54,7 (39,6-70,4)

PMA+ I (PMA + Ionomicina); SE (Sem estímulo) em 24 h de incubação . Mediana e interquartis

MIF (Intensidade Média de fluorescência)	CB (PMA+I) T30d n=8	CB (SE) T30d n=8	CMA (PMA+I) T30d n=8	CMA (SE) T30d n=8
CD69	698,5 (176,5-1149)	436 (129,3-552,5)	1808 (235,0-3039)	-65,7 (-128,3-148,3)
HLA-DR	611 (544,3-755,5)	500 (416,0-608,0)	611 (544,3-755,5)	514 (441,3-826,0)
PD-1	945 (839-2320)	888 (882-1998)	567 (314-641,5)	460 (362,5-613,8)
IL-9	198,5 (149,3-221,8)	172,5 (134,8-193,5)	301 (243,3-327,3)	118 (101,0-295,0)
IL-4	156 (140,5-256,8)	132 (116,0-237)	267 (198,8-333,8)	174 (137,5-191,0)
IL-10	132 (120-162)	123,5 (116,5-132,8)	202 (156-243)	113,5 (79,6-123,3)
ROR γ T	87,1 (75,7-143,3)	68,9 (59,6-89,4)	125,5 (78-138)	70 (17,9-76,6)
CCR-6	346 (53,8-804)	107,4 (-171,8-486,3)	859 (474,3-1090)	372,5 (199-581)
IL-17	185 (178-209)	171 (140,8-185,8)	116 (103-170)	54 (42,8-60,3)

PMA+ I (PMA + Ionomicina); SE (Sem estímulo) em 24 h de incubação . Mediana e interquartis

% (Porcentagem)	CB (PMA+I) T30d n=8	CB (SE) T30d n=8	CMA (PMA+I) T30d n=8	CMA (SE) T30d n=8
CD69	27,5 (6,0-32,8)	6,2 (4,8-7,7)	59,9 (9,8-71,7)	5,4 (3,3-10,3)
HLA-DR	2,4 (1,6-7,5)	1,3 (0,9-12,1)	31,6 (12,5-50,3)	5,6 (3,3-6,9)
PD-1	4,9 (3,6-27,3)	10,8 (4,5-21,7)	16,05 (12,2-48,3)	13,2 (6,8-28)
IL-9	10,6 (6,7-14,4)	6,4 (3-12,1)	24,4 (19,8-33,2)	8,6 (6,3-18,2)
IL-4	4,3 (3,2-7,4)	3,1 (1,9-8,9)	18,1 (11,7-29,8)	3,4 (0,9-9,6)
IL-10	0,9 (0,5-2,7)	0,8 (0,1-3,8)	12,8 (5,2-23,5)	1,2 (0,5-4,5)
ROR γ T/IL-17	5,8 (3,4-17,1)	4,5 (2,2-18,7)	3,6 (1,6-7,1)	1,5 (1,1-3,2)
CCR-6	11,5 (5,4-23,8)	10,4 (5,4-17,5)	37,8 (27-51,7)	11,6 (7,6-16,9)

PMA+ I (PMA + Ionomicina); SE (Sem estímulo) em 24 h de incubação . Mediana e interquartis

15.3. **Apêndice C-** Análise da frequência de respondedores dos sobrenadantes de PBMCs dos grupos NE, CB e CMA sem estímulo (SE) e com estímulos (SWAP), antes do tratamento (T0) e 30 dias após tratamento (T30d).

Citocinas e quimiocina	NE (SE) T0 n=9	NE (SWAP) T0 n=8	valor de <i>p</i>
TNF- α			
Detectável	55,50%	100%	<0,0001****
Não detectável	44,50%	0	
IL-27			
Detectável	22,20%	87,50%	<0,0001****
Não detectável	77,8%	12,5	
MIF			
Detectável	11,10%	75%	<0,0001****
Não detectável	88,90%	25%	
IL-5			
Detectável	44,40%	37,50%	0,38
Não detectável	55,60%	62,50%	
IL-13			
Detectável	66,60%	12,50%	<0,0001****
Não detectável	33,40%	87,50%	
CCL17			
Detectável	77%	100%	0,45
Não detectável	23%	0	
IL-10			
Detectável	89%	100%	0,3
Não detectável	11%	0	
Teste de Fisher's			
Citocinas e quimiocina	CB (SE) T0 n=10	CB (SWAP) T0 n=10	valor de <i>p</i>
TNF- α			
Detectável	100%	100%	0,99
Não detectável	0	0	
IL-27			
Detectável	90%	100%	0,1
Não detectável	10%	0	
MIF			
Detectável	90%	80%	0,1
Não detectável	10%	20%	
IL-5			
Detectável	10%	60%	<0,0001****
Não detectável	90%	40%	
IL-13			
Detectável	50%	20%	0,01*
Não detectável	50%	80%	
CCL17			
Detectável	50%	50%	0,8
Não detectável	50%	50%	
IL-10			
Detectável	90%	100%	0,1
Não detectável	10%	0	
Teste de Fisher's			

Cítocinas e quimiocina	CB (SE) T30 n=8	CB (SWAP) 30 n=8	valor de <i>p</i>
TNF- α			
Detectável	100%	11,10%	<0,0001****
Não detectável	0	88,90%	
IL-27			
Detectável	100%	44,40%	<0,0001****
Não detectável	0	55,60%	
MIF			
Detectável	100%	0	<0,0001****
Não detectável	0	100%	
IL-5			
Detectável	50%	66%	0,3
Não detectável	50%	34%	
IL-13			
Detectável	87,50%	62,50%	0,1
Não detectável	12,50%	37,50%	
CCL17			
Detectável	100%	11,10%	<0,0001****
Não detectável	0	88,90%	
IL-10			
Detectável	100%	75%	0,2
Não detectável	0	25%	
Teste de Fisher's			
Cítocinas e quimiocina	CMA (SE) T0 n=9	CMA (SWAP) T0 n=9	valor de <i>p</i>
TNF- α			
Detectável	100%	100,00%	0,99
Não detectável	0	0	
IL-27			
Detectável	100%	77,70%	0,1
Não detectável	0	22,30%	
MIF			
Detectável	100%	100%	0,99
Não detectável	0	0	
IL-5			
Detectável	0	77,70%	<0,0001****
Não detectável	100%	22,30%	
IL-13			
Detectável	60%	33,30%	0,01*
Não detectável	40%	66,70%	
CCL17			
Detectável	88,8%	55,50%	0,001**
Não detectável	11,20%	44,50%	
IL-10			
Detectável	80%	100%	0,2
Não detectável	20%	0	
Teste de Fisher's			

Citocinas e quimiocina	CB (SE) T30 n=8	CMA (SWAP) 30 n=8	valor de <i>p</i>
TNF- α			
Detectável	100%	100%	0,99
Não detectável	0	0	
IL-27			
Detectável	75%	87,50%	0,1
Não detectável	25%	12,50%	
MIF			
Detectável	62,50%	37,50%	0,0007***
Não detectável	37,50%	62,50%	
IL-5			
Detectável	62,50%	62,50%	0,99
Não detectável	37,50%	37,50%	
IL-13			
Detectável	37,50%	100%	<0,0001****
Não detectável	62,50%	0	
CCL17			
Detectável	62,50%	75%	0,09
Não detectável	37,50%	25%	
IL-10			
Detectável	100%	90%	0,2
Não detectável	0	10%	

Teste de Fisher's

16. Anexo

16.1. Anexo 1- Artigo produzido sobre indivíduos com baixa carga parasitária na infecção por *S. mansoni* durante o doutoramento.



Systemic Cytokine and Chemokine Profiles in Individuals With *Schistosoma mansoni* Infection and Low Parasite Burden

Vanessa N. Castro¹, Jailza L. Rodrigues¹, Diogo T. Cardoso¹, Samira D. Resende¹, Fernanda C. Magalhães¹, Dayane C. Souza¹, Maira H. Requeijo², Deborah Negrão-Corrêa¹ and Stefan M. Geiger^{1*}

¹ Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, ² Faculdade da Saúde e Ecologia Humana (FASEH) Vespasiano, Belo Horizonte, Brazil

16.2. Anexo 2-Artigos produzidos em colaborações durante o doutoramento.

RESEARCH ARTICLE

Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test

Warlem Junio Oliveira^{1*}, Fernanda do Carmo Magalhães^{1*}, Andressa Mariana Saldanha Elias¹, Vanessa Normandio de Castro¹, Vivian Favero², Catieli Gobetti Lindholz², Aureo Almeida Oliveira³, Fernando Sergio Barbosa¹, Frederico Gil¹, Maria Aparecida Gomes¹, Carlos Graeff-Teixeira², Martin Johannes Enk⁴, Paulo Marcos Zech Coelho³, Mariângela Carneiro¹, Deborah Aparecida Negrão-Corrêa¹, Stefan Michael Geiger^{1*}

¹ Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil, ² Grupo de Parasitologia Médica, Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil, ³ Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brasil, ⁴ Secretaria de Vigilância em Saúde, Instituto Evandro Chagas, Ministério da Saúde, Belém, Brasil

* These authors contributed equally to this work.
* stefan.geiger76@gmail.com

Abstract



OPEN ACCESS

Citation: Oliveira WJ, Magalhães FdC, Elias AMS, de Castro VN, Favero V, Lindholz CG, et al. (2018) Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. *PLoS Negl Trop Dis* 12(2): e0006232. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006232>



Modulation of Allergic Reactivity in Humans Is Dependent on *Schistosoma mansoni* Parasite Burden, Low Levels of IL-33 or TNF- α and High Levels of IL-10 in Serum

Samira D. Resende¹, Fernanda C. Magalhães¹, Jailza L. Rodrigues-Oliveira¹, Vanessa N. Castro¹, Carolina S. A. Souza², Edward J. Oliveira², Mariângela Carneiro¹, Stefan M. Geiger¹ and Deborah A. Negrão-Corrêa^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Michael Henson, United Kingdom

¹ Department of Parasitology, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, ² Schistosomiasis Laboratory, René Rachou Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Brazil

Acta Tropica 197 (2019) 105049



Contents lists available at ScienceDirect

Acta Tropica

journal homepage: www.elsevier.com/locate/actatropica



Discrepancy between batches and impact on the sensitivity of point-of-care circulating cathodic antigen tests for *Schistosoma mansoni* infection



Agostinho Gonçalves Viana^a, Pedro Henrique Gazzinelli-Guimarães^b, Vanessa Normandio de Castro^c, Yvanna Louise de Oliveira dos Santos^c, Ana Cristina Loliola Ruas^a, Fernando Schemelzer de M. Bezerra^d, Lilian Lacerda Bueno^e, Silvio Santana Dolabella^f, Stefan Michael Geiger^g, Anna E. Phillips^h, Ricardo Toshio Fujiwara^{h*}

^a Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil
^b Laboratory of Parasitic Diseases, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIH, USA
^c Laboratório de Parasitologia e Entomologia Tropical, Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, Brazil
^d Programa de Pós-Graduação em Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brazil
^e Imperial College, London, United Kingdom



Previous History of American Tegumentary Leishmaniasis Alters Susceptibility and Immune Response Against *Schistosoma mansoni* Infection in Humans

Guilherme Silva Miranda^{1,2}, Samira Diniz Resende¹, Diogo Tavares Cardoso², Genil Mororó Araújo Camelo¹, Jeferson Kelvin Alves Oliveira Silva¹, Vanessa Normandio de Castro², Stefan Michael Geiger², Mariângela Carneiro⁴ and Deborah Negrão-Corrêa^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:
Cristina Toscano Fonseca,
Oswaldo Cruz Foundation
(Fiocruz), Brazil

¹ Laboratory of Immunohelminthology and Schistosomiasis, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ² Laboratory of Biology, Department of Biology, Institute of Education, Science and Technology of Maranhão, São Raimundo das Mangabeiras, Brazil, ³ Laboratory of Intestinal Helminthiasis, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, ⁴ Laboratory of Epidemiology of Infectious and Parasitic Diseases, Department of Parasitology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

16.3. Anexo 3 Comitê de  tica da UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Otimiza o de estratégias de diagnóstico e controle da esquistossomose em áreas de baixa e moderada endemicidade no Brasil

Pesquisador: Ricardo Toshio Fujiwara

 rea Temática:

Versão: 2

CAAE: 63621316.4.0000.5149

Institui o Proponente: Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.978.864

Apresenta o do Projeto:

Primeiramente, serão escolhidas 20 escolas primárias do norte de Minas Gerais, onde serão coletadas amostras de 100 crianças em idade escolar (6-16 anos) por escola para serem realizados exames parasitológicos de fezes (Kato-Katz), urina (POC-CCA) e sorológicos (anti-SEA). Posteriormente, serão comparados os desempenhos dos testes de diagnóstico nessa área, considerada de baixa endemicidade, de Minas Gerais.

O estudo será conduzido em duas áreas do Brasil. Uma  rea considerada de baixa endemicidade localizada no norte de Minas Gerais e uma, outra, área considerada de moderada endemicidade localizada no estado de Sergipe.

Popula o de estudo: Nesta proposta, 20 escolas primárias do norte de Minas Gerais e 20 escolas primárias de Aracaju/Sergipe serão selecionadas de maneira randomizada.

Serão coletadas amostras de 100 crianças em idade escolar (6-16 anos) por escola e serão feitos os exames parasitológicos (KK), urina (POC-CCA) e sorológicos (anti-SEA).

Os indivíduos considerados positivos receberão tratamento com praziquantel e serão acompanhados, com a coleta de amostras, por 30 dias e 12 meses após o tratamento.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2  Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.978.864

A maior sensibilidade e a especificidade dos métodos de diagnósticos em esquistossomose contribuirão para um diagnóstico mais adequado para detecção de indivíduos com baixas cargas parasitárias, em áreas de baixa endemicidade. Assim, o diagnóstico será mais acurado, tornando mais eficaz o monitoramento da prevalência da doença nas áreas endêmicas e melhorando as estratégias de prevenção da esquistossomose na região.

Objetivo Primário:

O objetivo principal deste projeto é comparar o desempenho do teste de urina POC-CCA com o teste parasitológico Kato-Katz e o teste sorológico anti-SEA para observação de anticorpos específicos IgE, IgG1 e IgG4 para o diagnóstico de *S. mansoni* em áreas de baixa endemicidade no norte de Minas Gerais, MG e em uma região de moderada prevalência no estado de Sergipe.

Objetivo Secundário:

- O objetivo secundário deste projeto é utilizar os achados deste estudo no auxílio do programa de controle nacional de esquistossomose, para

planejar estratégia de quimioterapia preventiva em regiões de baixa e moderada endemicidade.- Analisar o desempenho do teste de urina POC-CCA como uma ferramenta para avaliar o impacto da quimioterapia, pela administração do praziquantel, 30 dias após o tratamento. Os resultados encontrados poderão contribuir para monitorar e avaliar o programa nacional de tratamento da esquistossomose.- Analisar o desempenho do teste

POC-CCA com o teste parasitológico KK para detectar níveis de reinfecção doze meses depois do tratamento. Além disso, essa análise será realizada para investigar o impacto da quimioterapia sobre a eficácia do método de diagnóstico.- Estes resultados contribuirão para redefinir o limiar da infecção por *S. mansoni* para a frequência de quimioterapia preventiva baseada pela WHO.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não existirão risco para a saúde dos indivíduos participantes da pesquisa. O que pode existir é um leve desconforto da picada da agulha durante a coleta do sangue. No entanto, a coleta será realizada por profissionais especializados, utilizando material descartável.

Benefícios:

Os benefícios da participação na pesquisa serão importantes para conhecer número de casos de esquistossomose na região e controlá-los mediante confirmação da doença através de um diagnóstico preciso. Independente de sua participação na pesquisa, os indivíduos que forem diagnosticados com esquistossomose, receberão o tratamento adequado de acordo com o ministério da saúde.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de relevância nas áreas de Ciências da Saúde e Ciências biológicas tendo em vista que aproximadamente, 200 milhões de indivíduos estão infectados por espécies de Schistosoma nos países tropicais, e, ainda, 700-800 milhões de pessoas estão em risco de infecção. Em Minas Gerais, S. mansoni é prevalente em 519 de 853 municípios e é estimado que 1 milhão de pessoas estejam infectadas em uma área de 300.000 km². Dessa forma, a esquistossomose intestinal e urinária é considerada como sério problema de saúde pública em regiões da África, Ásia e América Latina (WHO, 2002). Nos últimos anos, novos esforços têm sido feitos para mapear a esquistossomose no Brasil (Guimarães et al., 2008; Guimarães et al., 2010a,b; Scholte et al., 2012).

Os métodos atuais de diagnóstico para esquistossomose intestinal (detecção de ovos) em fezes realizado pelo método de Kato-Katz (KK) são limitados e não apresentam uma confiabilidade quando apresentam baixos níveis de infecção, o que seria esperado após alguns protocolos de tratamentos ou em regiões onde a transmissão é baixa. Para melhorar algumas das falhas do método KK, criou-se o interesse em desenvolver um teste para diagnóstico de esquistossomose que fosse mais sensível. A detecção de antígeno em urina (CCA) tem mostrado ser uma alternativa ao método KK, pois possui alta sensibilidade e especificidade em áreas de alta e moderada endemicidade. Faltam dados específicos comparando o desempenho dos testes KK e CCA em região de baixa prevalência de esquistossomose. Neste contexto, o objetivo principal deste projeto é comparar o desempenho dos testes CCA com KK em uma área de baixa endemicidade em Minas Gerais e uma área de moderada endemicidade em Sergipe. O objetivo do presente estudo é melhorar os conhecimentos a cerca da distribuição espacial da esquistossomose em Minas Gerais e, assim, auxiliar no planejamento da prevenção das estratégias de quimioterapia para o programa nacional de controle da esquistossomose.

Critério de Inclusão:

Serão incluídos no projeto, os indivíduos (6-16 anos) da região de baixa endemicidade de esquistossomose no norte de Minas Gerais.

Os indivíduos considerados positivos receberão tratamento com praziquantel e serão acompanhados, com a coleta de amostras, por 30 dias e 12 meses após o tratamento.

Desfecho Primário:

Coletar amostras de fezes, sangue e urina de indivíduos (8-13 anos) presentes na região endêmica no norte de Minas Gerais.

Tamanho da Amostra no Brasil: 2.000

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.978.864

Previsão de término do projeto:05/11/2018

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos foram apresentados de forma correta nessa versão.

Estão presentes: Informações básicas da pesquisa;Declaração de anuência Secretaria Municipal de Saúde;Carta resposta CEP;TALE e TCLE; Projeto;Aprovação câmara departamental;Carta de colaboração;Folha de rosto.

A carta resposta ao CEP foi acrescentada, contendo as alterações sugeridas pelo COEP e realizadas pelos pesquisadores, a saber:

Alteração na ordem da primeira atividade do cronograma;

Carta de interesse e anuência já assinada pela secretaria de saúde do município de Januária;

Foi reescrita a parte que fala quantas vezes a criança deverá estar disponível para a coleta;

Esclarecimento de onde serão coletados os materiais;

A linguagem do TALE foi adequado para crianças;

Foi justificada a presença do TCLE para adultos embora o projeto a princípio envolva apenas crianças.

Recomendações:

Todas as alterações solicitadas pelo COEP foram respondidas e esclarecidas, como apresentado na carta resposta e nos respectivos locais dos documentos.

Recomenda-se a aprovação desse projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Salvo maior juízo, sou favorável à aprovação do projeto "Otimização de estratégias de diagnóstico e controle da esquistossomose em áreas de baixa e moderada endemicidade no Brasil" do (a) pesquisador(a) responsável Prof.(a) Dr (a.) Ricardo Toshio Fujiwara.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.978.864

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_794302.pdf	09/03/2017 23:55:05		Aceito
Outros	Declaracao_de_interesse_e_anuencia.pdf	09/03/2017 23:50:56	Ricardo Toshio Fujiwara	Aceito
Outros	Carta_resposta_CEP.pdf	09/03/2017 23:47:09	Ricardo Toshio Fujiwara	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	09/03/2017 23:46:11	Ricardo Toshio Fujiwara	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Esquistossomose.pdf	09/03/2017 23:45:28	Ricardo Toshio Fujiwara	Aceito
Outros	Aprovacao_FAPEMIG.pdf	09/01/2017 08:52:37	Ricardo Toshio Fujiwara	Aceito
Outros	Aprovacao_camara_departamental.pdf	12/12/2016 09:12:10	Ricardo Toshio Fujiwara	Aceito
Outros	Colaboracao_UFS.pdf	12/12/2016 09:11:04	Ricardo Toshio Fujiwara	Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto.pdf	12/12/2016 09:06:52	Ricardo Toshio Fujiwara	Aceito
Outros	63621316parece.pdf	23/03/2017 09:08:58	Vivian Resende	Aceito
Outros	63621316aprovacao.pdf	23/03/2017 09:09:09	Vivian Resende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 23 de Março de 2017

Assinado por:
Vivian Resende
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

16.4. Anexo 4- Termo de Assentimento TCLE

TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Crianças participantes (6-16 anos)

Título da pesquisa: Otimização de estratégias de diagnóstico e controle da esquistossomose em áreas de baixa e moderada endemicidade no Brasil.

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

1. NOME DA CRIANÇA: _____

DATA DE NASCIMENTO: _____

Informações ao voluntário participante da pesquisa

Estamos convidando você para participar de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). O projeto será realizado em sua escola. O objetivo deste estudo é verificar se existe a presença de vermes ou produto deles nas suas amostras de fezes, de urina e no sangue para, assim, saber se você tem xistose. A xistose ou barriga d'água como é conhecida é uma doença que é transmitida no contato com águas que contém caramujos infectados. Importante saber que as pessoas que tem a doença podem ser tratadas e curadas, mas para isso é preciso saber se você tem ou não a doença.

Riscos e benefícios

Caso aceite participar da pesquisa, não existirão risco para a sua saúde. O que pode existir é um leve desconforto da picada da agulha durante a coleta do sangue. No entanto, a coleta será realizada por profissionais especializados. Isso irá te beneficiar, pois se for descoberto a presença do verme, nós iremos tratar e você ficará forte e saudável.

Confidencialidade

Não falaremos para ninguém que você está participando deste projeto.

Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As suas amostras de fezes, urina e sangue que serão utilizadas para saber se você tem a xistose, serão guardadas em freezer.

Participação voluntária: Você não é obrigado a participar. Não haverá problemas nas suas atividades na escola. O seu tratamento médico será realizado se você quiser participar ou não da pesquisa.

Assentimento: Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do assentimento e que uma delas ficará comigo. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Assinatura da criança (6 a 16 anos): _____

Assinatura do entrevistador: _____

Data: ____ de _____ de 201__

Impressão digital
(opcional)

Endereço e telefone do pesquisador:

Para maiores informações sobre o estudo, você poderá se comunicar com o pesquisador responsável:

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4, Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte-MG; Tel.: (31)3409-2871.

Para informações éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética da UFMG (Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Minas Gerais). Endereço: Av. Antônio Carlos, n° 6627, Unidade Administrativa II, Sala 2005–Bairro Pampulha/ Belo Horizonte – MG. CEP: 31270-901. Tel.: (31) 3409 4592
Email: coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pais das crianças

Seu filho(a) ou menor sob sua responsabilidade, cujo nome é _____ foi convidado a participar voluntariamente do projeto de pesquisa: Otimização de estratégias de diagnóstico e controle da esquistossomose em áreas de baixa e moderada endemicidade no Brasil.

Informações sobre o estudo

O projeto será realizado em comunidades no norte de Minas Gerais onde será conduzido por pesquisadores experientes. O objetivo deste estudo é avaliar e comparar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicos para o diagnóstico e controle da esquistossomose. A esquistossomose, conhecida popularmente como xistose, barriga d'água e doença dos caramujos é uma doença que é transmitida no contato com águas que contém caramujos infectados. O menor, sob a sua responsabilidade, ao aceitar com a sua participação você autoriza a coleta de uma pequena quantidade de fezes, urina e sangue que serão utilizadas para detectar ovos ou produtos do verme que permitam confirmar a presença da esquistossomose. Além disso, iremos investigar nas amostras de fezes a presença de outros vermes. Os exames serão repetidos 30 dias após tratamento em pessoas com xistose e tratadas com o remédio adequado. Após um ano, o menor será examinado novamente (fezes, sangue e urina) para observar se aconteceu uma nova infecção.

Riscos e benefícios

Não existirá risco para a saúde do menor. O que pode existir é um leve desconforto da picada da agulha durante a coleta do sangue. No entanto, a coleta será realizada por profissionais especializados. Isso irá beneficiar a criança, pois se for descoberto a presença do verme, o tratamento adequado será feito sem custo algum.

Confidencialidade

Todas as informações da pesquisa serão sigilosas. Ninguém divulgará o nome dos participantes e os resultados dos exames identificados com o nome dos participantes.

Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras de fezes, urina e sangue que serão utilizadas para confirmar o diagnóstico de esquistossomose e, para o seu seguimento, serão guardadas nos laboratórios da instituição para que possam ser utilizadas em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com a mesma doença.

Participação voluntária: A participação do seu menor sob sua responsabilidade nesta pesquisa é totalmente voluntária. Se o menor não quiser mais participar da pesquisa ele poderá sair a qualquer momento.

Consentimento: Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do assentimento e que uma delas ficará comigo. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Nome do responsável: _____

Assinatura do responsável _____

Assinatura do entrevistador: _____

Data: ____ de _____ de 201__

Endereço e telefone do pesquisador:

Para maiores informações sobre o estudo, você poderá se comunicar com o pesquisador responsável:

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4, Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte-MG; Tel.: (31)3409-2871.

Para informações éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética da UFMG (Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Minas Gerais). Endereço: Av. Antônio Carlos, n° 6627, Unidade Administrativa II, Sala 2005–Bairro Pampulha/ Belo Horizonte – MG. CEP: 31270-901. Tel.: (31) 3409 4592
Email: coep@prpq.ufmg.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Participantes maiores de 18 anos

Título da pesquisa: Otimização de estratégias de diagnóstico e controle da esquistossomose em áreas de baixa e moderada endemicidade no Brasil.

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO

1. NOME DO PACIENTE: _____

DATA NASCIMENTO _____

Informações ao voluntário participante da pesquisa

Estamos te convidando para participar como voluntário de um projeto de pesquisa desenvolvido por pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e de outras instituições brasileiras. O objetivo deste estudo é avaliar e comparar técnicas de exames de fezes, de urina e sorológicos para o diagnóstico e controle da esquistossomose. A esquistossomose, conhecida popularmente como xistose, barriga d'água e doença dos caramujos é uma doença que é transmitida no contato com águas que contém caramujos infectados. Ao aceitar com a sua participação você autoriza a coleta de uma pequena quantidade de fezes, urina e sangue que serão utilizadas para detectar ovos ou produtos do verme que permitam confirmar a presença da esquistossomose e outras co-infecções. Os exames serão repetidos 30 dias após tratamento em pessoas com xistose e tratadas com o remédio adequado. Após um ano, você será examinado novamente (fezes, sangue e urina) para observar se aconteceu uma nova infecção.

Riscos e benefícios

Caso aceite a participação na pesquisa, não existirão risco para a sua saúde. A coleta será realizada por profissionais especializados, utilizando material descartável.

Confidencialidade

Todas as informações da pesquisa serão sigilosas, ou seja, não falaremos para outras pessoas que o menor está participando nesta pesquisa.

Armazenamento de amostras biológicas para uso em pesquisas futuras

As amostras que serão utilizadas para confirmar o diagnóstico de esquistossomose e, para o seu seguimento, serão guardadas nos laboratórios da instituição para que possam ser utilizadas em novas pesquisas que precisem de amostras de pacientes com a mesma doença.

Participação voluntária: A sua participação na pesquisa é totalmente voluntária.

Consentimento e Assentimento: Declaro que li e entendi as informações relativas a este estudo. Fui informado que assinarei duas vias do assentimento e que uma delas ficará comigo. Concordo com a minha participação voluntária nesta pesquisa.

Assinatura do participante: _____

Assinatura do entrevistador: _____

Data: ____ de _____ de 201_

Endereço e telefone do pesquisador:

Para maiores informações sobre o estudo, você poderá se comunicar com o pesquisador responsável:

Dr. Ricardo Toshio Fujiwara

Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia/ICB, Bloco E4, Sala 167; Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901, Pampulha, Belo Horizonte-MG; Tel.: (31)3409-2871.

Para informações éticas do estudo, você poderá contatar o Comitê de Ética da UFMG (Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Minas Gerais). Endereço: Av. Antônio Carlos, nº 6627, Unidade Administrativa II, Sala 2005–Bairro Pampulha/ Belo Horizonte – MG. CEP: 31270-901. Tel.: (31) 3409 4592
Email: coep@prpq.ufmg.br