



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA**

DAVID NASCIMENTO SILVA TEIXEIRA

**ESQUISTOSSOMOSE HUMANA: participação de células da linhagem  
monocítica/macrofágica e de citocinas na imunorregulação da resposta aos antígenos do  
*Schistosoma mansoni*.**

Belo Horizonte

1996

DAVID NASCIMENTO SILVA TEIXEIRA

**ESQUISTOSSOMOSE HUMANA: participação de células da linhagem monocítica/macrofágica e de citocinas na imunorregulação da resposta aos antígenos do *Schistosoma mansoni*.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica e Imunologia.

Área de concentração: Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes.

Belo Horizonte

1996

043

Teixeira, David Nascimento Silva.

Esquistossomose humana: participação de células da linhagem monocítica/macrofágica e de citocinas na imunorregulação da resposta aos antígenos do *Schistosoma mansoni* [manuscrito] / David Nascimento Silva Teixeira. – 1996.

128 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dr. Alfredo Miranda de Goes.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Esquistossomose. 3. Granuloma. 4. Macrófagos. 5. Células Gigantes. 6. Citocinas. I. Goes, Alfredo Miranda de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 577.1



Instituto de Ciências Biológicas  
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica-Imunologia

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE DAVID NASCIMENTO SILVA  
TEIXEIRA REGISTRO: 255/1996

Ao primeiro dia do mês de novembro de 1996, às dez horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Curso em 15 de abril de 1996, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "ESQUISTOSSOMOSE HUMANA: PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS DA LINHAGEM MONOCÍTICA/MACROFÁGICA E DE CITOCINAS NA IMUNORREGULAÇÃO DA RESPOSTA AOS ANTÍGENOS DO *Schistosoma mansoni*" requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências -Imunologia. Abriado a sessão o Presidente da Comissão, Professor Alfredo Miranda de Góes, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: -Dr. Henrique Leonel Lenzi da Fiocruz-Rio de Janeiro, aprovado; -Dr. Mario Mariano da Universidade de São Paulo-USP, aprovado; - Dra. Leda Quercia Vieira-UFMG, aprovado; -Dr. Francisco Juarez Ramalho Pinto-UFMG, aprovado; -Dr. Alfredo Miranda de Góes-UFMG, aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado: APROVADO. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 1º de novembro de 1996.

Prof. Carlos Alberto Petalca Cavacas  
Coordenador do Curso de Pós Graduação  
em Bioquímica e Imunologia ICB UFMG

DR. HENRIQUE LEONEL LENZI-FIOCRUZ-RJ

  
DR. MÁRIO MARIANO-USP  
DRA. LEDA QUERCIA VIEIRA-UFMG  
DR. FRANCISCO JUAREZ RAMALHO PINTO-UFMG  
DR. ALFREDO MIRANDA DE GÓES-UFMG-ORIENTADOR

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, e no Cellular and Molecular Immunology of Parasites Laboratory, Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Texas A & M University, Texas-USA.

**APOIO FINANCEIRO:**

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq);
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);

*A Cris, não só por tudo o que ela representa, mas pelo que ela é  
Entre nós não existe mais a procura ..... Existe o encontro!  
A minha mãe por me dar, além da vida, o amor .....  
Ao meu pai, por tudo .....*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer particularmente ao Dr. Alfredo Miranda de Goes, meu amigo e orientador neste trabalho, pela competência, dedicação e apoio constante.

Agradeço também de forma especial a orientação da Dra. Barbara L. Doughty pelo apoio e desenvolvimento de parte deste trabalho em seu laboratório na Texas A & M University, EUA. Aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e Molecular: Beatriz, Célia, Claudinha, Cláudia, Cristiana, Cristine, Silvana e Simone pelo apoio constante, troca de idéias e agradável convívio.

Agradeço novamente à Simone pela leitura paciente deste trabalho.

Agradeço ao Dr. Rodrigo Correa-Oliveira pelo acesso ao FACScan, possibilitando a análise de alguns resultados obtidos. Agradeço também ao Dr. Evaldo Nascimento que permitiu o uso do computador conectado ao FACScan em seu laboratório.

Meus sinceros agradecimentos a todos os meus colegas de turma e amigos do Departamento de Bioquímica e Imunologia pela amizade compartilhada e constante incentivo.

Agradeço à Dona Raimunda pelo constante suporte para o desenvolvimento dos experimentos e atividades de laboratório.

Agradeço à Doutora Geralda Núzia Simões pela cuidadosa seleção e diagnóstico dos indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

Agradeço também aos professores de Departamento de Bioquímica e Imunologia pelo constante aprendizado científico.

Agradeço às secretárias Celise e Marly pela colaboração prestada no decorrer deste trabalho. Agradeço ao curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia da UFMG, na pessoa de seu coordenador, Dr. Paulo Sérgio Ladeira Beirão, pelo auxílio necessário ao desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço também ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, na pessoa de seu chefe, Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares.

Agradeço antecipadamente aos membros da Banca Examinadora por me honrarem com suas presenças.

Agradeço à Cris por ser o sol da minha vida.

Agradeço a todos os doadores de sangue, conhecidos ou não, que possibilitaram a realização deste trabalho

Gostaria, finalmente, de agradecer de forma sincera a todas as pessoas que direta ou indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho

*A pena e a pedra*

*"Estava com uma pedra na mão e uma pena na outra.*

*Ao soltá-las, e observando ambas as quedas, me veio um pensamento.*

*- Não sei se compensa a solidez da pedra ante a fragilidade da pena.*

*'E que a pena, conhece vários caminhos além da linha reta. Além disto, apesar de não chegar primeiro, a pena, e não a pedra, vai muito mais longe. No seu trajeto, vai fazendo curvas para lá e para cá, sem pressa alguma. Parece que ela pressente que as belezas do caminho são, quem sabe, mais interessantes do que o alívio da chegada. Talvez por isso, a pena, ao contrário da pedra, não se machuca nem nada faz ferir, quando cessa o seu movimento."*

*Antônio N. S. Teixeira*

(Conversas com Toninho, meu querido irmão)

## RESUMO

Os ovos do *Schistosoma mansoni* depositados nos tecidos do hospedeiro induzem ao aparecimento de uma reação de hipersensibilidade do tipo granulomatosa, principal responsável pela imunopatologia observada nesta doença. As células da linhagem monocítica/macrofágica representam uma importante população celular participante destas reações granulomatosas, tanto pelo número quanto pela variedade de fatores solúveis produzidos. Neste trabalho, avaliamos o processo de formação de células gigantes multinucleadas sobre a imunorregulação da resposta aos antígenos do *S. mansoni* durante ensaios de proliferação celular e formação de granuloma *in vitro* por células mononucleares de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica. Avaliamos as principais citocinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) produzidas durante estes ensaios pela técnica de ELISA, a expressão de marcadores de superfície (CD 29, CD 54 e HLA-DR) durante a formação de células gigantes multinucleadas por citometria de fluxo, além das consequências da resposta de células mononucleares de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica aos antígenos do *S. mansoni* sobre aspectos funcionais de monócitos e macrófagos, tais como atividade metabólica avaliada pela metabolização de MTT e a produção da monocinas TNF- $\alpha$  por ELISA. Os resultados obtidos mostram que as células gigantes multinucleadas, uma vez formadas, estão envolvidas em mecanismos de regulação das respostas proliferativas das células mononucleares dos indivíduos infectados e associadas a um concomitante decréscimo na intensidade das reações granulomatosa desenvolvidas *in vitro*. Além disto, verificamos que um dos prováveis mecanismos responsáveis por esta imunorregulação seria a modulação na expressão de HLA-DR, CD29 e CD54. Os dados obtidos pela estimulação com antígenos do parasita mostraram a existência de um padrão irrestrito (Th<sub>0</sub>) e bastante complexo de produção de citocinas na esquistossomose humana, tanto pelos tipos de citocinas secretadas quanto pela sequência em que são produzidas. Os resultados deste trabalho sugerem que, o padrão de produção de citocinas por células mononucleares após estimulação antigênica e o desenvolvimento local de células gigantes multinucleadas, podem ser causas prováveis da imunorregulação da resposta observada na esquistossomose humana.

**Palavras chaves:** Esquistossomose; granuloma; macrófagos; células gigantes; citocinas.

## ABSTRACT

*Schistosoma mansoni* eggs deposited in host tissues induce the appearance of a granulomatous-type hypersensitivity reaction, which is mainly responsible for the immunopathology observed in this disease. The cells of the monocytic/macrophage lineage represent an important cell population participating in these granulomatous reactions, both by the number and variety of soluble factors produced. In this work, we evaluated the process of multinucleated giant cell formation on immunoregulation of the response to *S. mansoni* antigens during cell proliferation and granuloma formation *in vitro* assays by mononuclear cells from individuals with chronic intestinal schistosomiasis. We evaluated the main cytokines (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$ ) produced during these assays by the ELISA technique, the expression of surface markers (CD 29, CD 54 and HLA-DR) during the formation of multinucleated giant cells by flow cytometry, and the consequences of the response of mononuclear cells obtained from individuals with chronic intestinal schistosomiasis to *S. mansoni* antigens on functional aspects of monocytes and macrophages, such as metabolic activity evaluated by MTT metabolization and the production of the monokine TNF- $\alpha$  by ELISA. The results obtained showed that multinucleated giant cells, once formed, are involved in immunoregulatory mechanisms of proliferative responses and also associated with a concomitant decrease in the intensity of granulomatous reactions developed *in vitro*. In addition, we found a probable mechanism responsible for this immunoregulation would be the modulation of HLA-DR, CD29 and CD54 expression. The data obtained by stimulation with *S. mansoni* antigens showed the existence of an unrestricted (Th0) and very complex pattern of cytokine production in human schistosomiasis, both by the types of cytokines secreted and by the sequence in which they are produced. The results of this work suggest that the pattern of cytokine production by mononuclear cells after antigenic stimulation and the local development of multinucleated giant cells may be probable causes of immunoregulation of the response observed in human schistosomiasis.

**Keywords:** Schistosomiasis; granuloma; macrophages; giant cells; cytokines

## LISTA DE FIGURAS

## PÁGINA

Figura 1- Aspecto morfológico <i>in vitro</i> de células humanas da linhagem monocítica/macrofágica recém coletadas de sangue periférico .....	51
Figura 2- Aspecto morfológico <i>in vitro</i> de células humanas da linhagem monocítica/macrofágica no 5º dia de cultura .....	51
Figura 3- Aspecto morfológico <i>in vitro</i> de células humanas da linhagem monocítica/macrofágica no 8º dia de cultura .....	51
Figura 4 – Cinética de formação de células gigantes multinucleadas <i>in vitro</i> .....	52
Figura 5- Taxa de fusão <i>in vitro</i> de monócitos humanos .....	52
Figura 6- Taxa de fusão de monócitos humanos: Efeito da estimulação de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica com antígenos do <i>S. mansoni</i> sobre a formação de células gigantes multinucleadas humanas <i>in vitro</i> .....	53
Figura 7- Efeito da estimulação com antígenos do <i>S. mansoni</i> sobre a taxa de fusão de monócitos <i>in vitro</i> .....	54
Figura 8- Efeito da estimulação de células mononucleares de indivíduos normais com antígenos do <i>S. mansoni</i> sobre a formação de células gigantes multinucleadas humanas <i>in vitro</i> .....	54
Figura 9- Efeito da estimulação de células mononucleares de indivíduos normais com antígenos do <i>S. mansoni</i> sobre a taxa de fusão de monócitos <i>in vitro</i> .....	55
Figura 10- Efeito de sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica estimuladas com antígenos do <i>S. mansoni</i> sobre a formação de células gigantes multinucleadas <i>in vitro</i> .....	55

Figura 11- Efeito de sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica estimuladas com antígenos do <i>S. mansoni</i> sobre a taxa de fusão de monócitos <i>in vitro</i> .....	56
Figura 12- Efeito de sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos normais estimuladas com antígenos do <i>S. mansoni</i> sobre a formação de células gigantes multinucleadas humanas <i>in vitro</i> .....	56
Figura 13- Efeito de sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos normais estimuladas com antígenos do <i>S. mansoni</i> sobre a taxa de fusão de monócitos <i>in vitro</i> .....	57
Figura 14- Cinética da reação granulomatosa e formação de células gigantes multinucleadas <i>in vitro</i> .....	59
Figura 15- Capacidade de apresentação de antígenos solúveis do ovo do <i>S. mansoni</i> (SEA) por células humanas da linhagem monocítica/macrofágica em diversos estágios de diferenciação .....	61
Figura 16- Capacidade de apresentação de antígenos solúveis do verme adulto (SWAP) por células humanas da linhagem monocítica/macrofágica em diversos estágios de diferenciação .....	62
Figura 17- Expressão de moléculas de HLA-DR de superfície em células da linhagem monocítica/macrofágica em diversos estágios de diferenciação avaliada por citometria de fluxo .....	64
Figura 18- Expressão de moléculas de CD29 de superfície em células da linhagem monocítica/macrofágica em diversos estágios de diferenciação avaliada por citometria de fluxo .....	66
Figura 19- Expressão de moléculas de CD54 de superfície em células da linhagem monocítica/macrofágica em diversos estágios de diferenciação avaliada por citometria de fluxo .....	67

Figura 20- Produção de citocinas (IL-5, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , e TNF- $\alpha$ ) por células mononucleares após estimulação com PHA .....	68
Figura 21- Produção de IL-4 por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do <i>S. mansoni</i> .....	69
Figura 22- Produção de IL-5 por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do <i>S. mansoni</i> .....	70
Figura 23- Produção de IL-10 por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do <i>S. mansoni</i> .....	71
Figura 24- Produção de IL-13 por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do <i>S. mansoni</i> .....	72
Figura 25- Produção de IFN- $\gamma$ por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do <i>S. mansoni</i> .....	73
Figura 26- Produção de TNF- $\alpha$ por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do <i>S. mansoni</i> .....	74
Figura 27- Produção de IL-4 por células mononucleares durante a formação de granuloma <i>in vitro</i> .....	76
Figura 28- Produção de IL-5 por células mononucleares durante a formação de granuloma <i>in vitro</i> .....	77
Figura 29- Produção de IL-10 por células mononucleares durante a formação de granuloma <i>in vitro</i> .....	78
Figura 30- Produção de IL-13 por células mononucleares durante a formação de granuloma <i>in vitro</i> .....	79

Figura 31- Produção de IFN $\gamma$ por células mononucleares durante a formação de granuloma <i>in vitro</i> .....	80
Figura 32- Produção de TNF- $\alpha$ por células mononucleares durante a formação de granuloma <i>in vitro</i> .....	81
Figura 33- Formação de células gigantes multinucleadas após estimulação de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica com antígenos solúveis do <i>S. mansoni</i> ou com antígenos imobilizados em microesferas de poliacrilamida ...	83
Figura 34- Metabolização de MTT por células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica após estimulação com antígenos solúveis do <i>S. mansoni</i> ou com antígenos imobilizados em microesferas de poliacrilamida .....	85
Figura 35- Resposta blastogênica de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica após estimulação com antígenos solúveis do <i>S. mansoni</i> ou com antígenos imobilizados em microesferas de poliacrilamida .....	87
Figura 36- Pré-estimulação de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica com antígenos solúveis do <i>S. mansoni</i> ou com IL-10 recombinante: Efeito sobre a produção de TNF- $\alpha$ por monócitos estimulada por LPS, e sobre a formação do granuloma <i>in vitro</i> .....	89
Figura 37- Modelo teórico proposto para a ação dos antígenos do <i>S. mansoni</i> sobre o processo de formação de células gigantes na esquistossomose humana .....	95
Figura 38- Modelo teórico proposto para a participação do processo de diferenciação de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas nos mecanismos de imunorregulação da resposta aos antígenos do <i>S. mansoni</i> .....	96
Figura 39- Modelo proposto para a ação da IL-10 e TNF- $\alpha$ sobre monócitos e macrófagos e os efeitos resultantes sobre a formação de granuloma na esquistossomose humana .....	108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB+ - Tipo Sanguíneo AB - Rh Positivo

APC - Célula Apresentadora de Antígenos-"Antigen Presenting Cell"

cmp - Contagens de Cintilação por Minuto

DMSO - Dimetil Sulfoxido

D.P. - Desvio Padrão

DTH - Hipersensibilidade do Tipo Retardada - "Delayed Type Hypersensitivity"

E-C - Valor experimental - Valor do controle

EDAC - Cloreto de 1-etil 3-(3-dimetilaminopropil) Carbodiimida

E.P. - Erro Padrão

Ig - Imunoglobulina

I.G. - Índice de Granuloma Interleucina

IFN- $\gamma$  - Interferon-gama

kDa - Unidade de peso molecular ( $10^3$  Da)

MEM - Meio Essencial Mínimo - "Minimal Essential Medium"

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade - "Major Histocompatibility Complex"

MIP-1 $\alpha$  - "Macrophage Inflammatory Protein 1 - alpha"

MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il) 2,5-difenil tetrazólio

PB - Microesferas de poliacrilamida - "Polyacrylamide Beads"

PB-SEA - Microesferas de poliacrilamida conjugadas a SEA

PB- SWAP Microesferas de poliacrilamida conjugadas a SWAP

PB- PPD - Microesferas de poliacrilamida conjugadas a PPD

PBS - Tampão Fosfato Salina

PBMCS - Células Mononucleares do Sangue Periférico -"Peripheral Blood Mononuclear Cells"

PGE - Prostaglandina E

PGF - Prostaglandina F

PHA-PFitohemaglutinina-P - "Phytohemagglutinin-P,

P.M. - Peso Molecular

PPO- 2,5, Difeniloxazole e 0,05 g de POPOP

POPOP- 2,2'-p-fenileno-bis-5 feniloxazol,2,5-difeniloxazol

rpm - Rotações por Minuto

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio - "Sodium Dodecyl Sulfate"

SEA - Preparação Antigênica Solúvel de Ovos - "Soluble Egg Antigens"

SWAP - Preparação Antigênica Solúvel de Verme Adulto - "Soluble Adult Worm Antigénic Preparation"

TMB - tetrametilbenzidina

Th<sub>1</sub> - Linfócitos T helper com perfil de secreção de citocinas do tipo 1.

Th<sub>2</sub> - Linfócitos T helper com perfil de secreção de citocinas do tipo 2.

TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral Alfa - "Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ "

## SUMÁRIO

<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.1- Esquistossomose mansoni: ciclo biológico do parasita</b> .....	18
<b>1.2- Imunopatologia da esquistossomose no hospedeiro definitivo</b> .....	19
<b>1.3- Imunorregulação da resposta do hospedeiro aos antígenos do parasita</b> .....	21
<b>2- JUSTIFICATIVA</b> .....	38
<b>3- OBJETIVOS</b> .....	39
<b>3.1- Objetivo geral</b> .....	39
<b>3.2- Objetivos específicos</b> .....	39
<b>4- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	40
<b>4.1- Sangue Humano</b> .....	40
4.1.1- Sangue de doadores infectados pelo <i>S. mansoni</i> .....	40
4.1.2- Sangue de doadores normais .....	40
<b>4.2- Obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano</b> .....	40
<b>4.3- Preparação de monócitos</b> .....	41
<b>4.4- Preparações de antígenos do <i>S. mansoni</i></b> .....	41
4.4.1- Preparação de antígenos solúveis de ovo do <i>S. mansoni</i> (SEA) .....	41
4.4.2- Preparação de antígenos solúveis de verme adulto (SWAP) .....	42
<b>4.5- Resposta proliferativa de células mononucleares</b> .....	42
<b>4.6- Ensaio de formação do granuloma <i>in vitro</i></b> .....	43
4.6.1- Conjugação das preparações antigênicas às microesferas de poliacrilamida .....	43
4.6.2- Reação granulomatosa <i>in vitro</i> .....	43
<b>4.7- Formação de células gigantes e cálculo da porcentagem (%) de fusão</b> .....	45
<b>4.8- Detecção de marcadores na membrana celular por citometria de fluxo</b> .....	45
<b>4.9- Metabolização de sal de tetrazólio (MTT)</b> .....	46
<b>4.10- Quantificação de citocinas</b> .....	46
4.10.1- ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay") .....	46
4.10.2- Bioensaio para a detecção de TNF .....	47
<b>4.11 – Tratamento estatístico</b> .....	49
<b>5- RESULTADOS</b> .....	50
<b>5.1- Diferenciação de células da linhagem monocítica/macrofágica e formação de células gigantes <i>in vitro</i> na esquistossomose humana</b> .....	50
<b>5.2- Imunorregulação da resposta do hospedeiro aos antígenos do <i>S. mansoni</i></b> .....	58

<b>5.3- Expressão de marcadores de superfície em células da linhagem monocítica/macrofágica durante o processo de diferenciação <i>in vitro</i> .....</b>	<b>63</b>
<b>5.4- Identificação de citocinas produzidas <i>in vitro</i> por células mononucleares em resposta aos antígenos solúveis do <i>S. mansoni</i> .....</b>	<b>68</b>
<b>5.5- Identificação de citocinas produzidas por células mononucleares durante formação de granuloma <i>in vitro</i> em resposta aos antígenos imobilizados do <i>S. mansoni</i> .....</b>	<b>75</b>
<b>5.6- Conseqüências do desenvolvimento da resposta aos antígenos do <i>S. mansoni</i> sobre as funções de monócitos e macrófagos <i>in vitro</i> .....</b>	<b>82</b>
<b>6- DISCUSSÃO .....</b>	<b>91</b>
<b>7- CONCLUSÕES .....</b>	<b>109</b>
<b>8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>110</b>

## 1-INTRODUÇÃO

A Esquistossomose constitui-se em grave problema de saúde pública afetando mais de duzentos milhões de pessoas em todo o planeta. É uma doença parasitária endêmica capaz de reduzir a produtividade levando, em alguns casos, ao desenvolvimento de esplenomegalia, varizes esofagianas, hipertensão portal e até mesmo a morte dos indivíduos infectados (Allison *et al.*, 1974). O parasita causador desta doença é um trematódeo digenético do gênero *Schistosoma*. Existem atualmente cinco espécies deste gênero que infectam o homem: *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1853), *Schistosoma japonicum* (Katsurada, 1904), *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), *Schistosoma intercalatum* (Fischer, 1934) e *Schistosoma mekongi* (Voge *et al.*, 1978). O *S. mansoni* é endêmico no hemisfério sul em partes da África, ilhas do Caribe, em regiões da América do Sul e principalmente no Brasil.

### 1.1 Esquistossomose mansoni: Ciclo biológico do parasita

O ciclo evolutivo do *S. mansoni* é bastante complexo e começou a ser elucidado a partir de 1915, simultaneamente por Leiper no Egito e Lutz no Brasil (Coelho,1970). No ciclo podemos detectar formas de vida livre, parasitária e a dependência de um hospedeiro intermediário. Indivíduos com esquistossomose mansoni apresentam vermes adultos acasalados capazes de produzir cerca de 300 ovos por dia, por par de vermes sexualmente ativos (von Lichtenberger, 1987). Os ovos consistem de um embrião que vive em meio fluido envolto por uma membrana vitelina dentro de uma proteção de esclerotina. A presença de uma espícula lateral é uma característica morfológica do ovo do *S. mansoni* capaz de diferenciá-lo dos ovos de outras espécies pertencentes ao mesmo gênero. Os ovos eliminados junto às fezes do hospedeiro eclodem em meio aquoso, liberando uma larva ciliada de vida livre (miracídio) capaz de penetrar ativamente no hospedeiro intermediário. Este geralmente é um molusco da família Planorbidae do gênero *Biomphalaria*. No Brasil existem três espécies deste gênero (*Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagofia*) que são vetores do *S. mansoni* (Pessoa; Martins, 1982).

No interior do hospedeiro intermediário os miracídios se reproduzem assexuadamente originando inicialmente os esporocistos de primeiro estágio e algum tempo depois (8 a 10 dias) os esporocistos de segundo estágio. Posteriormente os esporocistos de segundo estágio migram para as glândulas digestivas do molusco e se reproduzem assexuadamente formando as cercárias. Neste processo um único miracídio é capaz de produzir milhares de cercárias do mesmo sexo (Allison *et al.*,1974; Pessoa; Martins,1982) que abandonam o molusco e penetram

ativamente nos hospedeiros vertebrados definitivos, entre eles o homem (Jordan; Webe, 1982). Durante a penetração as cercárias perdem a sua cauda bifurcada característica e transformam-se em esquistossômulos (Gordon; Griffiths, 1951; Standen, 1953; Alisson *et al.*, 1974). Os esquistossômulos permanecem na pele pelo menos 2 dias até migrarem para os pulmões, 4 a 7 dias após a penetração, utilizando o sistema vascular do hospedeiro (Miller; Wilson, 1978). Posteriormente alcançam o fígado pela corrente circulatória ou através do espaço diafragma-peritônio-fígado, ou ainda através da utilização de ambas as rotas (Pereira *et al.*, 1972; Miller; Wilson, 1978). Atingindo o sistema porta- hepático crescem rapidamente, tornando-se adultos e sexualmente ativos.

A fêmea adulta é filiforme, quase cilíndrica, medindo de 7 a 17 mm, possuindo duas ventosas, uma oral e outra ventral. O macho é alongado, mede de 6 a 12 mm e seu corpo é composto de duas porções distintas, uma anterior que possui duas ventosas e outra posterior que dobra-se no sentido longitudinal formando o canal ginecóforo que abriga a fêmea (Alisson *et al.*, 1974; Pessoa; Martins, 1982). O processo de penetração, transformação, migração e desenvolvimento que origina os vermes adultos ativos, ocorre no homem, em um período que varia de 4 a 6 semanas. Eveland *et al.* (1982) demonstraram a existência de um tropismo entre machos e fêmeas do *S. mansoni*, e que tal atração é de natureza química, fato este que explicaria o encontro e acasalamento dos vermes no hospedeiro definitivo. O processo de pareamento de machos e fêmeas que vivem *in copula* no sistema porta resulta na indução da completa maturidade dos vermes que, assim pareados, podem migrar até as veias mesentéricas inferiores (Damian, 1984). A partir daí inicia-se a postura, e os ovos que passam através das paredes do intestino alcançam as fezes e são eliminados para o meio exterior, completando-se assim o ciclo biológico do parasita. Aproximadamente entre 20 e 60% dos ovos permanecem no interior do hospedeiro, sobretudo no intestino, fígado e pulmões provocando em torno de si uma reação granulomatosa, principal responsável pela patogenicidade da doença (Warren, 1963; Warren, 1966; Warren, 1978; Domingos; Warren, 1969; Colley, 1977a; Colley, 1981a; Phillips; Colley, 1978; Nash *et al.*, 1982).

## **1.2 Imunopatologia da esquistossomose mansoni no hospedeiro definitivo**

A esquistossomose é uma doença cuja patologia envolve a participação de efetores imunológicos. Os ovos do parasita depositados no fígado, intestino e pulmões do hospedeiro induzem ao aparecimento de uma reação de hipersensibilidade do tipo granulomatosa (von Lichtenberg, 1962; von Lichtenberg, 1987; Domingos; Warren, 1969; Warren, 1972a; Colley, 1977b; Colley, 1978; Nash *et al.*, 1982). O granuloma hepático pode apresentar um volume até

cem vezes maior que o ovo, levando ao bloqueio do fluxo sanguíneo local, desenvolvimento de fibrose, hipertensão portal e aparecimento das manifestações clínicas próprias desta patologia (von Lichtenberg, 1962; von Lichtenberg, 1987; Warren, 1963; Warren, 1973; Warren, 1977a; Warren, 1978; Warren, 1982; Domingos; Warren, 1969; Cheever, 1972; Colley, 1977b).

As respostas dirigidas aos ovos imaturos são inicialmente pequenas, mas aumentam quando o miracídio amadurece e, posteriormente, regredem de forma lenta e gradual com a morte do ovo e sua desintegração (von Lichtenberg, 1987). Diversos trabalhos sugerem que o granuloma esquistossomótico seja uma reação de hipersensibilidade mediada basicamente por linfócitos T sensibilizados por antígenos liberados pelo miracídio vivo através de poros ultramicroscópicos existentes na casca dos ovos (Warren *et al.*, 1967; Domingos & Warren, 1968; Warren, 1972b; Boros *et al.*, 1973; Boros *et al.*, 1975; Hang *et al.*, 1974; Byram; von Lichtenberg, 1977; Phillips *et al.*, 1977,; Phillips *et al.*, 1980; Lamiie *et al.*, 1986; Mathew; Boros, 1986; Wyler *et al.*, 1987). Esta resposta é um processo dinâmico, onde a população de células infiltradas no local varia com o decorrer da infecção (Stenger *et al.*, 1967; Smith, 1977; Chensue; Boros, 1979).

O estabelecimento de modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* possibilitou a identificação de linfócitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, eosinófilos, neutrófilos, mastócitos e fibroblastos como as principais células participantes da resposta granulomatosa (von Lichtenberg, 1962; Moore *et al.*, 1977; Phillips *et al.*, 1980; van Marck *et al.*, 1980; Doughty; Phillips, 1982a; Bentley *et al.*, 1985; Silva-Teixeira *et al.*, 1993). As causas que regulam o influxo de diferentes tipos celulares são em parte desconhecidas, podendo estar relacionadas às características próprias do parasita, do tecido e a reatividade imunológica do hospedeiro (Akpon *et al.*, 1970; Lukacs *et al.*, 1994a).

Diversos trabalhos mostraram que as reações granulomatosas são necessárias para se conter os efeitos tóxicos de enzimas e secreções do ovo e evitar danos aos hepatócitos circunvizinhos (Buchanan *et al.*, 1973; Doenhof *et al.*, 1979). Por outro lado, é importante ressaltar que as respostas celulares exacerbadas e sem controle provocam o aparecimento de fibrose e aumentam o risco do desenvolvimento de hepatoesplenomegalia (Warren, 1982). Nos camundongos infectados pelo *S. mansoni*, os granulomas recém-formados mudam de aspecto à medida que a infecção evolui, atingindo um diâmetro máximo por volta da oitava semana de infecção e uma acentuada regressão a partir da vigésima quinta semana (Andrade; Warren, 1964; Warren, 1982). Na esquistossomose humana, a fase aguda pós-postural é caracterizada por um quadro clínico variado que inclui eosinofilia, febre, dores musculares, mal estar e

desconforto abdominal (Hiati *et al.*, 1979). A fase crônica compreende basicamente as formas intestinal (geralmente assintomática), além das formas hepatointestinal e hepatoesplênica (com sintomatologia mais severa). Apenas uma porcentagem relativamente pequena da população infectada (1 a 10%) apresenta as manifestações e formas mais graves da doença, caracterizadas por hipertensão portal, varizes esofagianas e hepatoesplenismo (Warren, 1973; Warren, 1982; Pessoa; Martins, 1982; Andrade; Van Marck, 1984). Durante a infecção existe uma progressão da fase aguda para uma fase crônica, provavelmente associada ao desenvolvimento de mecanismos reguladores da resposta imune do hospedeiro (Ottesen *et al.*, 1978; Ottesen, 1979; Ellner, 1980; Ottesen; Poindexter, 1980; Colley, 1981a; Colley, 1981b; Colley *et al.*, 1986; Gazzinelli *et al.*, 1987). Dentro deste contexto, o estudo e a compreensão dos fatores que controlam o estabelecimento e a manutenção de mecanismos imunorreguladores na esquistossomose constituem-se em aspectos essenciais à uma melhor compreensão desta parasitose.

### **1.3-Imunorregulação da resposta do hospedeiro aos antígenos do parasita**

Na infecção esquistossomótica parece existir uma relação hospedeiro-parasita bastante complexa oriunda de uma exposição contínua do hospedeiro aos antígenos de diversos estádios do parasita (esquistossômulo, verme adulto e ovo). A intensidade das reações inflamatórias no hospedeiro parece ser controladas por mecanismos imunorreguladores desenvolvidos na fase crônica da doença. Atualmente, os principais mecanismos imunorreguladores descritos na esquistossomose envolvem os seguintes aspectos:

#### **1.3.1-Estudo da resposta proliferativa de células mononucleares *in vitro***

A maioria dos trabalhos publicados envolvendo mecanismos imunorreguladores na esquistossomose enfoca principalmente a reatividade de células mononucleares frente a antígenos e/ou mitógenos (Colley *et al.*, 1978; Colley *et al.*, 1979a; Ottesen *et al.*, 1978; Ottesen, 1979; Todd *et al.*, 1979; Ottesen; Poindexter, 1980; Ellner *et al.*, 1980; Ellner *et al.*, 1981; Rocklin *et al.*, 1980; Rocklin *et al.*, 1981; Barral-Neto *et al.*, 1982; Gazzinelli *et al.*, 1985). Ellner *et al.* (1980) demonstraram que a resposta blastogênica *in vitro* das células obtidas de pacientes com a forma clínica hepatoesplênica compensada frente a antígenos do parasita é maior do que aquela observada para células de pacientes portadores da forma intestinal crônica. Gazzinelli *et al.* (1985) verificaram que pacientes de área não endêmica, na fase aguda da infecção esquistossomótica, apresentavam índices maiores de proliferação linfocitária *in vitro* induzida por antígenos solúveis de ovo (SEA) do que pacientes de área

endêmica na fase crônica da infecção. Segundo Ottesen *et al.* (1978) e Gazzinelli *et al.* (1985) a diminuição progressiva da reatividade linfocitária frente aos antígenos do parasita no decorrer da infecção poderia estar associada ao desenvolvimento de mecanismos imunorreguladores e a "cronificação" da doença. Colley *et al.* (1986) investigaram especificamente a resposta proliferativa de células mononucleares frente a SEA e concluíram que as células de pacientes com forma hepatoesplênica apresentavam respostas mais altas do que as células de pacientes com a forma intestinal crônica. Estes autores formularam a hipótese de que após uma intensa resposta imunológica dirigida contra os antígenos do parasita (fase aguda) e posterior estabelecimento de uma infecção estável (fase crônica), muitos pacientes desenvolvem diversos mecanismos que modulam o grau da resposta imune dirigida contra os antígenos do *S. mansoni* (Colley *et al.*, 1986). Entretanto, alguns pacientes nunca expressam esta modulação e respondem vigorosamente durante toda a infecção levando ao aparecimento de reações imunopatológicas graves, capazes de afetar a função de fibroblastos. Os resultados de Dunn *et al.* (1979), mostrando que os tecidos hepáticos de indivíduos com esquistossomose na forma hepatoesplênica descompensada sintetizam colágeno com uma velocidade até 25 vezes maior que a normal, reforçam este ponto de vista.

### 1.3.2-Imunorregulação e a participação de linfócitos T supressores

Outros mecanismos imunomoduladores foram descritos na esquistossomose mostrando que até 50% dos pacientes infectados possuem linfócitos T capazes de serem induzidos *in vitro* a exercer funções supressoras, como a inibição da resposta proliferativa de células mononucleares estimuladas por mitógenos ou por SEA. (Colley *et al.*, 1978; Ellner *et al.*, 1980; Rocklin *et al.*, 1981). Colley *et al.* (1978) demonstraram que a supressão mediada por linfócitos T afetava somente a resposta blastogênica inespecífica induzida por mitógenos enquanto que Rocklin *et al.* (1981) apresentaram estudos com células supressoras capazes de inibir a reatividade *in vitro* de linfócitos a antígenos do parasita.

### 1.3.3-Imunorregulação e a participação de células aderentes.

A participação de células aderentes (monócitos/macrófagos) em circuitos imunorreguladores presentes na esquistossomose também tem sido investigada por muitos pesquisadores (Ottesen, 1979; Todd *et al.*, 1979; Rocklin *et al.*, 1980; Tweardy, 1983). Todd *et al.* (1979) realizaram experimentos onde as células aderentes eram removidas da população de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos na fase crônica, resultando em um aumento da resposta proliferativa linfocitária estimulada por antígenos do parasita (verme adulto e cercária) sem, contudo, alterar a resposta a mitógenos e antígenos não relacionados

como a *Candida albicans* (Ottesen, 1979; Todd *et al.*, 1979; Tweardy *et al.*, 1983). Ottessen (1979) mostrou que a reposição de macrófagos restaurava a inibição anteriormente apresentada frente a estimulação antigênica (antígenos do ovo, cercária e verme adulto). Segundo este autor a atividade supressora por células aderentes não está presente com 4 meses, mas só é desenvolvida após 20 meses de infecção. Por outro lado, não foram encontradas evidências desta atividade supressora mediada por macrófagos em pacientes com hepatoesplenomegalia (Tweardy *et al.*, 1983).

Outros fatores também associados às células aderentes podem afetar a resposta imune do hospedeiro na esquistossomose. Macrófagos obtidos de granulomas desenvolvidos pela embolização de ovos do *S. mansoni* nos pulmões de camundongos secretam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio quando comparados com macrófagos controle (granuloma de corpo estranho). A administração de anti-oxidantes como o alfa-tocoferol, por via oral ou parenteral, é capaz de reduzir em até 60% o tamanho dos granulomas recém-formados. Além disto, a administração parenteral de superóxido dismutase e catalase é capaz de provocar uma redução de até 40% no tamanho dos granulomas. Estes resultados sugerem que as espécies reativas de oxigênio produzidas por macrófagos também participem no desenvolvimento das reações granulomatosas. (Chensue *et al.*, 1984)

#### 1.3.4- O estudo da imunorregulação a partir do granuloma *in vitro*

Na década de 80, a abordagem do papel imunorregulador das células mononucleares na esquistossomose, através do estudo da resposta blastogênica, foi ampliada pelo advento da técnica de análise monológica da formação do granuloma *in vitro* (Phillips *et al.*, 1980; Bentley *et al.*, 1985; Doughty; Phillips, 1982a; Doughty; Phillips, 1982b; Doughty; Phillips, 1984a; Doughty; Phillips, 1984b). Utilizando esta metodologia foi possível demonstrar que pacientes de área não-endêmica infectados há mais de dois anos apresentam uma reatividade celular bastante reduzida, se comparada a pacientes com infecção recente (Doughty; Phillips, 1984a). Esta técnica também pennitiu uma melhor investigação dos mecanismos e fatores envolvidos na modulação da reação granulomatosa. Esta reação é bloqueada quando a apresentação de antígenos aos linfócitos T pelos macrófagos é inibida (Phillips; Lammie, 1986). Em alguns pacientes a remoção de células CD8<sup>+</sup> aumenta a formação de granuloma *in vitro* anti-antígenos do ovo do parasita (Doughty *et al.*, 1984b). Foi demonstrado com o uso desta metodologia que a estimulação de células T anti-idiotípicas (isolada da população de células mononucleares de pacientes esquistossomóticos) também pode regular a formação de granuloma *in vitro* SEA específico (Doughty *et al.*, 1987; Doughty *et al.*, 1989). Atualmente acredita-se que a formação do granuloma *in vivo* e *in vitro* seja uma reação dependente de

linfócitos T sensibilizados (Wellhausen; Boros, 1981; Doughty; Phillips, 1982b; Doughty *et al.*, 1984b; Lammie *et al.*, 1985), mantida por mediadores solúveis produzidos localmente (Phillips; Colley, 1978; Colley 1981a; Colley 1981b; Phillips & Lammie, 1986).

#### 1.3.5- Imunorregulação e participação de componentes do soro

Além da participação de células na imunorregulação da resposta do hospedeiro, o soro de pacientes infectados também possui fatores supressores capazes de inibir a proliferação *in vitro* de linfócitos estimulados com antígenos do parasita (Colley *et al.*, 1977c; Cottrel *et al.*, 1980; Ottesen; Poindexter, 1980; Rocklin *et al.*, 1980; Barral-Neto, 1982; Kamal; Higashi, 1982). Existe um grande número de trabalhos sugerindo que essa soro-supressão seja antígeno específica (Colley *et al.*, 1977b; Ottesen; Poindexter, 1980; Rocklin *et al.*, 1980; Barral-Neto *et al.*, 1982). Segundo Tody *et al.* (1980) esta modulação específica pode ser o resultado de interações entre as células e os soros com capacidade supressora. Gazzinelli *et al.* (1985) verificaram que os níveis de anticorpos anti antígenos do parasita (ovo, cercária ou verme adulto) em indivíduos com infecção aguda, eram maiores do que aqueles encontrados no soro de pacientes com a forma intestinal crônica. A natureza da imunorregulação por componentes presentes no soro também pode envolver interações idiotipo/anti-idiotipo. Foi demonstrado que pacientes crônicos desenvolvem anticorpos anti-SEA capazes de estimular células T anti-idiotípicas em ensaios de proliferação celular (Lima *et al.*, 1986; Parra *et al.*, 1988).

#### 1.3.6- Participação de imunocomplexos e prostaglandinas

O envolvimento de imunocomplexos na regulação da reação granulomatosa *in vitro* e da resposta proliferativa celular também foi demonstrado na esquistossomose humana (Goes *et al.*, 1991; Goes *et al.*, 1994; Rezende *et al.*, 1993). Verificou-se que as prostaglandinas E<sub>1</sub> e E<sub>2</sub> eram algumas das substâncias responsáveis pelo controle da reatividade celular anti-antígenos de ovo do *S. mansoni* (Goes *et al.*, 1994). A adição exógena de prostaglandinas E ou F (PGE ou PGF<sub>2</sub>-a) em camundongos infectados pelo

*S. mansoni* mostrou ser capaz de modular *in vivo* a resposta aos antígenos do ovo do parasita reduzindo o tamanho dos granulomas formados no fígado e nos pulmões (Chensue *et al.*, 1986). Os efeitos imunomodulatórios das prostaglandinas envolvem a supressão da produção de IL-2, menor produção de O<sub>2</sub><sup>·</sup> e queda na expressão de antígenos Ia pelos macrófagos dos granulomas periovulares (Chensue *et al.*, 1986).

#### 1.3.7-O envolvimento de fatores genéticos

A predisposição genética para o desenvolvimento dos sintomas associados às formas mais graves da esquistossomose pode depender de uma série de eventos que compreendem desde o processamento e apresentação dos antígenos, até a produção de citocinas, mobilização

de células inflamatórias e a síntese e degradação do colágeno. Dentro deste contexto surgiram trabalhos tentando associar um determinado haplotipo do MHC à morbidez e ao aparecimento das diversas formas clínicas observadas nesta parasitose (Abdel-Alam *et al.*, 1979; Abdel-Alam *et al.*, 1981; Abdel-Alam *et al.*, 1986; Bina *et al.*, 1978). Foram descritas associações entre os pacientes que expressavam HLA-A<sub>1</sub> e B<sub>5</sub> e o desenvolvimento de hepatoesplenismo (Abdel-Alam *et al.*, 1979; Abdel-Alam *et al.*, 1986).

#### 1.3.8-Alterações metabólicas e imunoregulação na esquistossomose.

Estudos realizados com pacientes esquistossomóticos portadores da forma intestinal crônica identificaram alterações funcionais e metabólicas na população de células mononucleares durante a infecção. Nogueira-Machado *et al.* (1983) verificaram que as células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos possuem uma reduzida capacidade citotóxica dirigida contra esquistossômulos se comparada às células de doadores normais. Chaves *et al.* (1990) observaram que as células mononucleares de doadores esquistossomóticos com a forma intestinal crônica apresentam uma menor reatividade à estimulação por PHA do que doadores não infectados. Estas alterações envolvem uma menor formação de inositolpolifosfatos (IPx) e parecem estar relacionadas ao início da interfase mitótica (retardamento de G<sub>0</sub> para G<sub>1</sub>), o que também pode estar associado a produção de citocinas. O desenvolvimento de reações granulomatosas em camundongos infectados pelo *S. mansoni* também é bloqueado pelo tratamento com inibidores da via das lipooxigenases. Estes inibidores também suprimem a expressão de antígenos Ia pelos macrófagos presentes nos granulomas enquanto que os inibidores da via das ciclooxygenases exercem um efeito contrário nos macrófagos. Os principais metabólitos da via das lipooxigenases sintetizados pelos macrófagos presentes nos granulomas são o leucotrieno C<sub>4</sub> e os ácidos mono-hidroxi-eicosatetraenoicos (Kunkel *et al.*, 1984). Outros grupos de pesquisadores encontraram também o tromboxano A<sub>2</sub> como o principal produto da via das lipooxigenases sintetizado pelos macrófagos presentes nos granulomas de camundongos infectados pelo *S. mansoni* (Tripp *et al.*, 1988).

Embora diversas alterações tenham sido detectadas em células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos, poucos foram os trabalhos realizados no sentido de se investigar a reatividade e a participação do outro compartimento leucocitário, os granulócitos, em circuitos imunorregulatórios presentes nesta doença. Na realidade, a grande maioria dos trabalhos realizados com granulócitos na esquistossomose envolveu apenas o estudo dos mecanismos associados à regulação da função citotóxica.

#### 1.3.9-A imunoregulação da função citotóxica dos granulócitos

A maioria dos trabalhos publicados envolvendo granulócitos enfocam somente a

capacidade deste tipo celular em matar ou lesar a larva do *S. mansoni in vitro*. Neste contexto Dean *et al.* (1974) demonstraram que eosinófilos de cobaias, em presença de anticorpos, eram capazes de aderir aos esquistossômulos sem induzir lesão ou morte. Segundo estes autores os neutrófilos eram, na realidade, os efetores da morte da larva. Resultados análogos foram obtidos com neutrófilos de rato (Dean *et al.*, 1975). Entretanto, Mackenzie *et al.* (1977), Ramalho-Pinto *et al.* (1978) e Capron *et al.* (1979) demonstraram que os eosinófilos de rato também são capazes de aderir aos esquistossômulos na presença de anticorpos, provocando lesão e morte. Butteworth *et al.* (1974) verificaram, usando a técnica de liberação do  $^{51}\text{Cr}$ , que granulócitos humanos induziam lesões na larva do *S. mansoni* na dependência de anticorpos. Prosseguindo em seus experimentos, Butteworth *et al.* (1975, 1977a) mostraram que, dentre os granulócitos humanos, somente o eosinófilo era citotóxico para o esquistossômulo. Contudo, Vadas *et al.* (1979) demonstraram que os neutrófilos também eram citotóxicos para a larva. Anwar *et al.* (1979), Kazura (1981) e Moser; Sher (1982) apresentaram resultados onde a morte dos esquistossômulos era mediada por eosinófilos e/ou neutrófilos na dependência de anticorpos. Novato-Silva *et al.* (1980) verificaram que granulócitos de indivíduos esquistossomóticos também têm atividade citotóxica contra a larva do *S. mansoni* em mecanismo dependente de complemento. Nogueira-Machado *et al.* (1983) demonstraram que as capacidades citotóxicas de granulócitos obtidos de indivíduos normais e infectados pelo *S. mansoni* contra esquistossômulos *in vitro*, são idênticas em mecanismo dependente de complemento. As investigações realizadas envolvendo a capacidade citotóxica de granulócitos contra esquistossômulos *in vitro* (Butteworth *et al.*, 1974; Butteworth *et al.*, 1975; Butteworth *et al.*, 1977a; Butteworth *et al.*, 1977b; Capron *et al.*, 1978; Anwar *et al.*, 1979; Vadas *et al.*, 1979; Vadas *et al.*, 1980) visavam obter informações necessárias ao desenvolvimento *in vivo* de métodos de proteção do hospedeiro ("vacinas"). Entretanto, estudos posteriores demonstraram que estes efeitos tóxicos mediados por células contra esquistossômulos *in vitro* não apresentavam qualquer correlação com a indução da proteção ou efeito *in vivo* (Bloch, 1984; Vignali *et al.*, 1988).

Estudos atuais sobre a capacidade citotóxica celular na esquistossomose adicionaram novos dados a estas antigas questões. Foi demonstrado que, além dos granulócitos, as células endoteliais de camundongo ativadas com diversas citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ., IL-1 $\alpha$ . ou IL-1 $\beta$  também são capazes de matar esquistossômulos *in vitro*, em um mecanismo dependente de arginina que envolve a produção de óxido nítrico (Oswald *et al.*, 1994). As células endoteliais são capazes de matar formas mais maduras do parasita (18 dias) em comparação com a capacidade citotóxica de outros tipos celulares.

Além das células endoteliais, estudos mais recentes com macrófagos lançaram novas hipóteses sobre o ataque aos esquistossômulos *in vivo* dentro do sistema vascular do hospedeiro. Na realidade, a imunidade obtida por protocolos de vacinação que utilizam cercárias atenuadas pela radiação, seria uma consequência do desenvolvimento de macrófagos ativadas capazes de iniciar e manter reações de hipersensibilidade nos pulmões dos camundongos vacinados. Este processo deixaria os parasitas "presos" no local, bloqueando a sua posterior rota migratória e levando, em última consequência a morte dos mesmos (Menson; Wilson, 1989).

#### 1.3.10-Imunorregulação e participação de moléculas de adesão

A presença das moléculas de adesão, ICAM-1 ("intercellular adhesion molecule-1") e selectina-E, no soro de pacientes esquistossomóticos em diversas formas clínicas foi recentemente investigada (Secor *et al.*, 1994). Todos os grupos de pacientes avaliados tinham níveis séricos elevados de ICAM-1 quando comparados aos indivíduos não infectados. Pacientes com a forma hepatoesplênica da doença tinham níveis mais elevados de ICAM-1 do que pacientes com a forma intestinal. Os níveis de selectina-E eram menores nos pacientes hepatoesplênicos quando comparados aos pacientes portadores da forma intestinal. Foi observada uma relação inversa entre os níveis de ICAM-1 e a resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico frente à estimulação com SEA, mas não com outros antígenos do parasita, PPD ou mitógenos. É possível que a liberação de ICAM-1 solúvel no microambiente do granuloma possa interromper a co-estimulação necessária ao desenvolvimento de uma resposta específica para SEA (Secor *et al.*, 1994).

Na esquistossomose murina experimental foi demonstrado que a resposta proliferativa de linfócitos T é dependente das moléculas de adesão ICAM-1, LFA-1 ("lymphocyte function-associated antigen-1") e VLA-4 ("very late antigen-4"). O bloqueio destas moléculas de adesão com anticorpos monoclonais inibe a produção de IL-2 e IL-4 por linfócitos assim como a sua capacidade de resposta linfoproliferativa (Langle; Boros, 1995). Estes resultados sugerem que estas moléculas de adesão estão envolvidas na iniciação e manutenção das respostas dirigidas aos antígenos do *S. mansoni*.

#### 1.3.11-Imunorregulação e a participação de citocinas e fatores solúveis.

Acredita-se que as citocinas exerçam um papel fundamental em inúmeros fenômenos imunorregulatórios. No final da década de 70 e início da década de 80 as principais citocinas descritas na esquistossomose eram:

- O fator promotor da estimulação de eosinófilos, "ESP" (Kazura *et al.*, 1975)
- O fator mitogênico, "MF" (Gazzineli *et al.*, 1983);
- O fator inibidor da citotoxicidade de granulócitos, "GIF" (Nogueira-Machado *et al.*, 1983);

- O fator inibidor da migração de leucócitos, "LIF" (Lima *et al.*, 1985);
- O fator inibidor da aderência de leucócitos, "LAIF" (Nogueira-Machado *et al.*, 1985);
- O fator inibidor da agregação de leucócitos (Rouviex *et al.*, 1985).

Durante a fase crônica da infecção foram descritos alguns fatores supressores como o fator supressor de células T que regula a produção de M1F (Chensue *et al.*, 1983), o fator inibidor de leucócitos (Lima *et al.*, 1985) e o fator solúvel inibidor da citotoxicidade de granulócitos (Nogueira-Machado *et al.*, 1983).

A partir da segunda metade da década de 80, novos conceitos surgiram em relação à produção de citocinas por linfócitos T. Mosmann *et al.* (1986) identificaram em camundongos, subpopulações de linfócitos T helper capazes de produzir padrões distintos de citocinas. A subpopulação que produzia IL-2, IFN- $\gamma$  e linfotóxina foi denominada de Th<sub>1</sub>, enquanto que a subpopulação que produzia IL-4, IL-5 e IL-10 foi denominada de Th<sub>2</sub>. Posteriormente foi identificado um terceiro subgrupo, denominado de Th<sub>0</sub>, com a capacidade de produzir citocinas de ambos os tipos e considerado como provável precursor das subpopulações Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub>. Além da produção diferencial de citocinas, os linfócitos Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> também apresentam funções biológicas distintas, onde o desenvolvimento de uma determinada subpopulação leva à supressão da produção das citocinas e ao bloqueio dos efeitos biológicos resultantes da atividade da outra subpopulação (Mosmann; Moore, 1991). Estas descobertas tiveram um grande impacto sobre a investigação das respostas imunológicas em diversos estados patológicos.

Atualmente, o estudo da produção diferencial de citocinas do tipo Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> na esquistossomose murina experimental é um tópico recente de intensa investigação onde já encontram-se descritos alguns mecanismos envolvidos na imunorregulação da resposta do hospedeiro aos antígenos do *S. mansoni*. Na esquistossomose humana, no entanto, existem poucos trabalhos publicados e os estudos realizados encontram-se ainda em fase inicial. A investigação dos mecanismos associados ao "balanço" Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> poderá trazer uma maior compreensão dos mecanismos envolvidos na resistência e no desenvolvimento da imunopatologia na esquistossomose mansoni humana.

### 1.3.12- O "balanço" Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> e a regulação da resposta na esquistossomose

Os mecanismos associados ao desenvolvimento das respostas do tipo Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> na esquistossomose ainda não são totalmente conhecidos. Os trabalhos atualmente publicados revelam a existência de interações complexas entre tipos celulares e citocinas, conforme descreveremos a seguir: Na esquistossomose murina, as células do baço e as células

participantes das reações granulomatosas secretam citocinas tanto do tipo Th<sub>1</sub> quanto do tipo Th<sub>2</sub> (Cook *et al.*, 1993; Joseph; Boros, 1993; Wynn *et al.*, 1993).

Resultados de vários laboratórios têm demonstrado a importância de algumas citocinas na esquistossomose experimental, entre as quais destacam-se a IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IFN- $\gamma$  e o TNF- $\alpha$  (Boros; Lukacs, 1992; Chensue *et al.*, 1992; Henderson *et al.*, 1992). Cheever *et al.* (1992) demonstraram que o tratamento de camundongos infectados com anticorpos monoclonais anti-IL-2 é capaz de reduzir a produção de IL-5 estimulada por antígenos do parasita, o tamanho dos granulomas hepáticos e a fibrose em comparação com camundongos não tratados. Ramadan *et al.* (1995) mostraram a importância da IL-2 através da utilização da DA-B389IL-2 ("difteria toxin-IL-2 fusion toxin protein") que mata ou inativa funcionalmente as células que possuem receptores para IL-2 de alta afinidade. A DA-B389IL-2 é capaz de suprimir a formação de granuloma *in vitro*, a expressão de receptores para IL-2 em linfócitos T, a resposta proliferativa frente a antígenos do parasita, o desenvolvimento de granulomas e a deposição de colágeno *in vivo* no fígado dos camundongos infectados. Os trabalhos de el-Cheikh *et al.* (1990) ressaltam a importância da IL-5 e de outros fatores solúveis no controle da proliferação e diferenciação de eosinófilos em granulomas esquistossomóticos. Na fase aguda da infecção a atividade de IL-5 é predominante, enquanto que na fase crônica a eosinofiloiose periférica é sustentada por fatores solúveis produzidos pela população de células aderentes (el-Cheikh; Borojevic, 1990). Cheever *et al.* (1991) também mostraram que a neutralização dos efeitos da IL-5 ou do IFN- $\gamma$  *in vivo* com anticorpos monoclonais é capaz de reduzir o tamanho dos granulomas hepáticos assim como o número de eosinófilos presentes nestas lesões, mas não é capaz de reduzir a fibrose hepática em camundongos infectados pelo *S. mansoni*. Estes resultados sugerem que o tamanho e a quantidade de fibrose presente nos granulomas sejam processos regulados independentemente. Por outro lado, Sher *et al.* (1990) obtiveram resultados contrários aos anteriormente descritos onde a neutralização da IL-5 ou do IFN- $\gamma$  não apresentou nenhum efeito sobre o tamanho dos granulomas desenvolvidos em camundongos infectados pelo *S. mansoni*.

Na esquistossomose experimental a IL-4 está associada ao desenvolvimento de respostas do tipo Th<sub>2</sub> além de contribuir para o desenvolvimento de fibrose hepática nos camundongos infectados (Cheever *et al.*, 1994). Além disto a IL-4 é capaz de inibir a produção de óxido nítrico e a morte de esquistossômulos *in vitro* (Cheever *et al.*, 1994). Os níveis de RNA-mensageiro para IL-2 e IL-4 foram avaliados em granulomas do fígado de camundongos infectados pelo *S. mansoni* e os resultados obtidos mostraram uma grande produção de RNA

mensageiro para IL-4 e baixos níveis para IL-2 (Henderson *et al.*, 1991; Henderson *et al.*, 1992). Posteriormente foram avaliados os níveis de RNA mensageiro para IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-2 em células totais de linfonodos mesentéricos, baço e granulomas de fígado de camundongos durante o curso de modulação e cronificação da infecção esquistossomótica (Gregory *et al.*, 1992). Os resultados obtidos revelaram uma queda generalizada na produção de citocinas (tanto Th<sub>1</sub> quanto Th<sub>2</sub>) após a 16<sup>a</sup> semana de infecção. Foi demonstrado também, em camundongos infectados, que a postura de ovos pelo parasita é o principal estímulo para o aumento na produção das citocinas características da resposta Th<sub>2</sub> e uma supressão da resposta mediada por linfócitos Th<sub>1</sub> (Pearce *et al.*, 1991). Vella; Pearce, (1992) demonstraram que esta resposta do tipo Th<sub>2</sub> desenvolve-se rapidamente a partir de um estágio intermediário denominado Th<sub>0</sub> caracterizado por um aumento no número de células expressando altos níveis do Pgp-1 (receptor cuja expressão está elevada em células de memória). O desenvolvimento da resposta T helper do tipo 2 em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, caracteriza-se pela produção de altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10. Além disto, durante a resposta aos ovos do parasita, a queda observada na produção de IFN- $\gamma$  correlaciona-se com o aumento da produção de IL-10 (Vella *et al.*, 1992).

A IL-10 é uma citocina capaz de inibir a produção de óxido nítrico, a capacidade citotóxica contra esquistossômulos e a síntese de TNF- $\alpha$ . por monócitos (Bogdan *et al.*, 1991; Fiorentino *et al.*, 1991; Cunha *et al.*, 1992; Gazzinelli *et al.*, 1992, Oswald *et al.*, 1992). Em camundongos a IL-10 é produzida por linfócitos Th<sub>0</sub>, Th<sub>2</sub>, monócitos, macrófagos e linfócitos B (Howard & O'garra, 1992). Flores-Villanueva *et al.* (1993) demonstraram que a IL-10 inibe a capacidade de macrófagos de camundongos infectados de apresentarem antígenos do ovo do *S. mansoni*. Posteriormente, este mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que a IL-10 inibe a capacidade de apresentação de antígenos do *S. mansoni* através da modulação expressão de moléculas co-estimuladoras como o B7 e o B7-2 (Flores-Villanueva & Stadecker, 1994). Recentemente, Flores-Villanueva *et al.* (1996) demonstraram que a administração de IL-10 recombinante em camundongos infectados pelo *S. mansoni* também inibe a formação de granuloma.

O papel da IL-12 na esquistossomose murina experimental também foi recentemente investigado (Chensue *et al.*, 1995a). A IL-12 promove a atividade de células "natural killer" e o desenvolvimento das respostas do tipo Th<sub>1</sub>. Macrófagos obtidos de granulomas induzidos nos pulmões através da embolização de microesferas acopladas a SEA em camundongos pré-sensibilizados revelam um bloqueio na capacidade de produzir IL-12. Por outro lado, macrófagos

obtidos de granulomas induzidos por microesferas acopladas a proteínas derivadas do *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) são capazes de produzir grandes quantidades de IL-12 (Chensue *et al.*, 1995a). Anticorpos monoclonais anti-IL-10 e anti IL-4 reverterem o bloqueio na produção de IL-12 em macrófagos obtidos do granuloma anti-SEA, e monoclonais anti-IL-12 e anti-IFN- $\gamma$  reduzem a produção de IL-12 por macrófagos provenientes do granuloma anti-PPD. Estes resultados sugerem a existência de um "feedback" positivo da estimulação da produção de IL-12 por IFN- $\gamma$ , que por sua vez é regulada pela produção de IL-10 e IL-4. Este grupo de pesquisadores denominaram os granulomas anti-SEA de granulomas com envolvimento de citocinas Th<sub>2</sub> (ou granulomas tipo 2) e os granulomas anti-PPD de granulomas com o envolvimento de citocinas do tipo Th<sub>1</sub> (ou granulomas do tipo 1). Estes granulomas diferem profundamente quanto à modulação induzida por diferentes citocinas. Anticorpos monoclonais anti-IFN- $\gamma$  reduzem em 20% o tamanho de granulomas anti-PPD mas aumentam em até 50% o tamanho de granulomas anti-SEA. Anticorpos monoclonais anti-TNF- $\alpha$  diminuem o tamanho de granulomas do tipo 1 em até 40% e do tipo 2 em 15%. Além disto, a neutralização de TNF $\alpha$ . em camundongos onde foram induzidos granulomas do tipo 2 é capaz de reduzir a produção de IL-4 e IL-10 nos linfonodos regionais, mas não produz nenhum efeito nos camundongos onde foram induzidos granulomas do tipo 1 (Chensue *et al.*, 1995b).

Alguns estudos também têm tentado utilizar a IL-12 como uma vacina para prevenção da fibrose induzida na infecção pelo *S. mansoni*, uma vez que a sensibilização de camundongos com ovos do parasita e IL-12 é capaz de inibir parcialmente a formação de granuloma e reduz drasticamente a fibrose nos tecidos (Wynn *et al.*, 1994, Wynn *et al.*, 1995a). Todavia, estes resultados devem ser analisados com cautela pois na ausência de IFN- $\gamma$  (utilizando camundongos "knock-out" para IFN- $\gamma$ ), ao invés de suprimir, a IL-12 exacerba as reações imunopatológicas dependentes de linfócitos Th<sub>2</sub> (Wynn *et al.*, 1995b). Estes resultados mostram que a IL-12 inibe indiretamente o desenvolvimento de linfócitos Th<sub>2</sub> *in vivo* através da estimulação da síntese de IFN- $\gamma$ . Tomando em conjunto todos os dados expostos parece que na esquistossomose murina experimental, de uma forma geral, os vermes adultos estimulam respostas do tipo Th<sub>1</sub> que são moduladas por respostas do tipo Th<sub>2</sub> induzidas preferencialmente pelos antígenos do ovo no decorrer da infecção (Pearce; Sher 1991). Na esquistossomose humana, Zwingenberger *et al.* (1989) demonstraram a presença de baixas concentrações de IL-2 no sobrenadante de cultura de células de pacientes intestinais e hepatoesplênicos estimuladas com PWM ("pookweed mitogen"), SEA ou SWAP quando comparada a indivíduos não infectados. Foi constatada também

a produção de níveis reduzidos de IFN- $\gamma$  por células mononucleares de indivíduos infectados após estimulação com antígenos do *S. mansoni*.

Willians *et al.* (1994) não constataram nenhum aumento na produção de RNA mensageiro para IFN- $\gamma$  e IL-2 pelas células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos após estimulação com antígenos do ovo *S. mansoni*. Viana *et al.* (1994) avaliaram a produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares de indivíduos identificados por Correa-Oliveira *et al.* (1989) como normais endêmicos (NE). Este grupo de indivíduos reside em áreas endêmicas, tem contato permanente com águas contaminadas, mas não apresentam sinais da infecção. Células mononucleares de indivíduos NE produzem mais IFN- $\gamma$  do que as células dos indivíduos infectados, mostrando uma correlação entre resistência à infecção e a produção desta citocina. Recentemente foram publicados alguns trabalhos indicando que a IL-10 tem um papel importante na modulação das respostas proliferativas de linfócitos T e na regulação da produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*. (Pemberton *et al.*, 1994; Araujo *et al.*, 1996; King *et al.*, 1996). No entanto, existem ainda poucos trabalhos publicados envolvendo a identificação de respostas Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> na esquistossomose humana e os estudos realizados encontram-se ainda em fase inicial. O fato de que, em humanos, a IL-10 é produzida por monócitos, linfócitos B, linfócitos Th<sub>0</sub>, Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> (Yssel *et al.*, 1992; Del Prete *et al.*, 1993), torna ainda mais complexa a análise dos resultados atualmente disponíveis neste sistema.

Inúmeras questões ainda permanecem sem resposta, tais como: Porque o ovo do *S. mansoni* estimula preferencialmente uma resposta Th<sub>2</sub> na esquistossomose experimental? Quais são os fatores que levam preferencialmente ao desenvolvimento de respostas do tipo Th<sub>1</sub> ou Th<sub>2</sub>? Quais seriam as citocinas adicionais que regulariam o desenvolvimento das populações de linfócitos Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> *in vivo*? Seriam monocinas? Qual o papel das diferentes populações de células apresentadoras de antígenos neste processo? Esta lista de perguntas está longe de esgotar todas as lacunas da compreensão atual sobre os mecanismos de desenvolvimento e regulação das células Th e a conseqüente produção de citocinas na esquistossomose. As respostas a várias destas questões podem estar associadas a investigação de novos mecanismos envolvidos na imunorregulação das respostas do hospedeiro aos antígenos do parasita.

Dentro deste contexto, estudos recentes estão adicionando novos graus de complexidade aos eventos envolvidos na atividade inflamatória anti-antígenos do ovo do *S. mansoni*. Estes trabalhos mostram que, além das citocinas, outras substâncias como os neuropeptídeos, enzimas

proteolíticas e prostaglandinas também são capazes de alterar a atividade dos linfócitos Th<sub>1</sub> e Th<sub>2</sub> (Phipps *et al.*, 1991; Blum *et al.*, 1992; Finkelman; Urban, 1992; Pearce; Appleton, 1992; Cook *et al.*, 1994), conforme veremos a seguir:

#### 1.3.13-O "balanço" Th1/Th2 e produção de neuropeptídeos

Recentemente foi demonstrada a produção de neuropeptídeos (P-endorfina e ACTH) pelo *S. mansoni* com propriedades de inibir a produção de IFN- $\gamma$  pelo hospedeiro e favorecer o aparecimento de uma resposta característica de linfócitos Th<sub>2</sub> (Pearce; Appleton, 1992). Linfócitos T isolados de granulomas esquistossomóticos em camundongos infectados possuem receptores para a substância P produzida por eosinófilos. A substância P é capaz de modular a produção de IFN- $\gamma$  após interação com este receptor (Cook *et al.*, 1994). Além disto, linfócitos CD4<sup>+</sup> presentes nos granulomas também possuem receptores para somatostatina e respondem a estimulação destes receptores com uma queda na produção de IFN- $\gamma$  (Blum *et al.*, 1992). Derivados da somatostatina quando administrados a camundongos infectados reduzem as reações granulomatosas *in vivo* (Blum *et al.*, 1992).

Uma grande parte da população de macrófagos, linfócitos e granulócitos participantes das reações granulomatosas também possuem receptores para histamina. No interior do granuloma encontramos predominantemente células que expressam receptores do tipo H<sub>1</sub> e alguns linfócitos que expressam receptores do tipo H<sub>2</sub>. O tratamento de camundongos infectados com cimetidina (antagonista dos receptores H<sub>1</sub>) aumenta a resposta granulomatosa enquanto que o tratamento com difenildramina (antagonista dos receptores H<sub>2</sub>) reduz esta mesma resposta. Linfócitos que não expressam receptores para histamina parecem mediar a produção de MIF estimulada por SEA e participam da supressão de reações granulomatosas por transferência adotiva de células ("T<sub>DH</sub> cells") enquanto que linfócitos Ts que regulam a produção de citocinas dentro das reações granulomatosas parecem possuir receptores para histamina. (Weinstock *et al.*, 1983).

#### 1.3.14-O "balanço" Th1/Th2 e a ação de enzimas proteolíticas

Produtos secretados em grandes quantidades pelo parasita, como algumas enzimas proteolíticas, começaram a ser testados como possíveis indutores de respostas do tipo Th<sub>2</sub> (Finkelman; Urban, 1992). Esta hipótese baseia-se no papel obrigatório que certas enzimas proteolíticas desempenham no processo de desenvolvimento dos vermes e invasão dos tecidos do hospedeiro sem que ocorra a eliminação do parasita. Os resultados obtidos reforçaram a hipótese inicial mostrando que injeções subcutâneas de 100  $\mu$ g de papaína em camundongos BALB/c estimula um aumento de cerca de 10 vezes nos níveis de IgE no soro, além de um

aumento de 10 a 30 vezes na produção de RNA mensageiro para IL-4, IL-5 e IL-9 (Finkelman; Urban, 1992).

#### 1.3.15-O "balanço" Th1/Th2 e a ação das prostaglandinas

As prostaglandinas também podem afetar a resposta imune, alterando o "balanço" da produção de citocinas em linfócitos Th1 e Th2. Prostaglandinas da série E (PGE<sub>1</sub> e PGE<sub>2</sub>) secretadas por macrófagos, fibroblastos e células dendríticas inibem a síntese de IFN- $\gamma$ , mas não a síntese de IL-4 por linfócitos, favorecendo o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2 (Phipps *et al.*, 1991). Diversos mecanismos imunorreguladores foram descritos até aqui nesta parasitose, incluindo a soro-supressão, participação de linfócitos T supressores, citocinas e fatores solúveis, interações idiotípicas, fatores genéticos, alterações bioquímicas e participação de imunocomplexos, entre outros. Por outro lado, existem aspectos dos fenômenos de imunorregulação que atualmente encontram-se pouco investigados na esquistossomose humana. Dentro deste contexto, podemos destacar o efeito do processo de diferenciação celular sobre a geração e manutenção da resposta imune aos antígenos do parasita. O estudo da diferenciação celular e dos fatores solúveis envolvidos neste processo podem auxiliar na elucidação dos mecanismos associados as respostas inflamatórias crônicas.

#### 1.3.16- Diferenciação de células da linhagem monocítica/macrofágica e a produção de citocinas na esquistossomose humana: a investigação de novos mecanismos imunoreguladores.

Os monócitos não são células "maduras" quando liberados da medula óssea e o seu processo de maturação tem sido demonstrado tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Lewis, 1927; Gilman; Wright, 1966; Adams, 1974; Schlesinger *et al.*, 1984). Morfologicamente, metabolicamente e funcionalmente, a diferenciação *in vitro* assemelha-se ao processo *in vivo* (Adams, 1974; Adams, 1976). Os monócitos diferenciam-se em macrófagos quando atingem os tecidos, podendo também ocorrer a formação de células gigantes multinucleadas. Estas células gigantes multinucleadas foram primeiramente identificadas em granulomas na tuberculose (Rokitansky, 1885) e posteriormente encontradas em associação com diversos estados patológicos crônicos (Adams, 1976; Chambers, 1978; Hill, 1992). As células gigantes multinucleadas surgem por fusão de monócitos e macrófagos precursores (Adams, 1976; Chambers, 1978; Hassan *et al.*, 1989; Weinberg *et al.*, 1989). Postlethwaith *et al.* (1982) identificaram uma proteína termolábil de 60.000 daltons derivada de linfócitos T, capaz de induzir a formação de células gigantes *in vitro* a partir da fusão de monócitos do sangue periférico. Esta proteína foi denominada GCF ("giant cell factor"). Posteriormente foi descoberto que a formação de células gigantes multinucleadas também pode ser acelerada pela

estimulação de monócitos com anticorpos monoclonais anti moléculas de classe II do MHC (Orentas *et al.*, 1992), pela estimulação de determinadas moléculas existente na superfície de monócitos denominadas proteínas reguladoras da fusão ("FRP,s") (Tabata *et al.*, 1994) ou ainda pela adição de vitamina D<sub>3</sub> (Abe, 1981), ésteres de forbol (Hassan *et al.*, 1989), IL-4 (McInnes; Rennick, 1988), TNF- $\alpha$  (Takasihma *et al.*, 1993) ou IFN- $\gamma$  (Weinberg *et al.*, 1989).

Na esquistossomose murina foi descrita a produção de um fator solúvel por granulomas de fígado anti-ovo do *S. mansoni* mantidos *in vitro* capaz de induzir a formação de células gigantes (Acosta *et al.*, 1992). Estudos recentes na esquistossomose humana demonstraram a formação *in vitro* de células gigantes multinucleadas induzida pela estimulação com antígenos do parasita (Silva-Teixeira *et al.*, 1993). Embora a presença de células gigantes multinucleadas tenha sido observada em inúmeros tipos de reações inflamatórias crônicas inclusive no granuloma esquistossomótico, sua participação em circuitos imunorreguladores associados ao desenvolvimento das respostas granulomatosas contra os antígenos do *S. mansoni* ainda não está esclarecida e necessita de investigação.

Resultados de vários laboratórios têm demonstrado que macrófagos humanos derivados de diferentes compartimentos ou em estados de diferenciação variados, exibem respostas antagônicas a imunomoduladores (Strieter *et al.*, 1989; Hurme *et al.*, 1992). Toosi *et al.* (1996) mostraram que macrófagos alveolares humanos produzem menos TGF- $\beta$  do que monócitos obtidos do sangue periférico. Lipopolissacarídeos (LPS) são capazes de mobilizar mais cálcio em monócitos do que em macrófagos (Hurme *et al.*, 1992). A produção de TNF- $\alpha$  estimulada por LPS é inibida por prostaglandina e dexametasona em monócitos do sangue periférico, mas não é inibida em macrófagos alveolares (Strieter *et al.*, 1989).

O processo de diferenciação também é acompanhado por mudanças funcionais e bioquímicas características (Cohn, 1968; Adams, 1976). A expressão de inúmeros receptores e moléculas de superfície altera-se durante o processo de diferenciação celular (Andersen *et al.*, 1983; Becker *et al.*, 1987; Wahl *et al.*, 1987, 1989; Geissler *et al.*, 1989; Blanchard; Djeu, 1991; Silva-Teixeira *et al.*, 1996). Estas moléculas são essenciais em diversos processos de ativação, adesão e interações célula-célula. Durante a diferenciação de monócitos existe um aumento na expressão dos receptores para adenosina envolvidos na regulação da fagocitose (Eppel, 1989). A secreção de IL-1 estimulada por LPS diminui durante a maturação, assim como a capacidade de apresentar antígenos (Janson *et al.*, 1990; Rupper; Peters, 1991). Esta capacidade é restaurada em macrófagos "diferenciados" pela adição de IL1 e/ou IL6 exógenos (Rupper; Peters, 1991). Os níveis de fosfatase ácida aumentam durante a diferenciação de

monócitos (Rupper; Peters, 1991), enquanto a atividade de peroxidase diminui (Andersen, 1983). Existe também um aumento na capacidade citotóxica de macrófagos durante a diferenciação *in vitro* (Cottrel *et al.*, 1989; James *et al.*, 1990). Provavelmente, a importância do processo de maturação está em direta associação com o local e a função específica a ser exercida pela célula.

Os monócitos e macrófagos representam uma importante população celular participante das respostas granulomatosas tanto em número de células quanto na variedade de fatores solúveis secretados (Akpon *et al.*, 1970; Adams, 1976; Bentley *et al.*, 1985). As estimulações recíprocas entre macrófagos e células T nas reações granulomatosas levam à produção de diversas monocinas e citocinas (Phillips; Lammie, 1986; Shikama *et al.*, 1989). Estas moléculas efetoras podem regular os processos de diferenciação, recrutamento e ativação das células envolvidas na formação do granuloma (Phillips & Lammie, 1986; Shikama *et al.*, 1989). Utilizando citocinas conjugadas à microesferas de sephadex, Shikama *et al.* (1989) demonstraram que o TNF- $\alpha$  tem um papel fundamental no acúmulo e desenvolvimento de macrófagos durante a formação de granuloma *in vitro*. Além disto, macrófagos isolados de granulomas de fígado de camundongos em fase aguda de infecção secretam mais TNF- $\alpha$  do que os macrófagos isolados de camundongos em fase crônica (Joseph; Boros, 1993). A administração repetida de anticorpos policlonais anti-TNF- $\alpha$  é capaz de suprimir significativamente o tamanho de granulomas desenvolvidos em camundongos infectados em fase aguda da infecção e a administração de TNF- $\alpha$  recombinante a camundongos em fase crônica de infecção aumenta o tamanho de granulomas desenvolvidos no fígado e nos pulmões (Joseph; Boros, 1993). É importante notar que o TNF- $\alpha$  é capaz de restaurar a formação de granulomas em camundongos SCID ("Severe Combined Immunodeficiency") infectados pelo *S. mansoni* (Amiri *et al.*, 1992) sugerindo um papel muito importante desta citocina nos processos de formação do granuloma. O mecanismo de formação do granuloma na esquistossomose mediado pelo TNF- $\alpha$  pode estar associado à indução do aumento de expressão de ICAM-1 por esta citocina (Lukacs *et al.*, 1994). Além disto, o TNF- $\alpha$  é capaz de estimular a postura de ovos pelo parasita, que desta forma utiliza-se de um produto do sistema imune do hospedeiro em seu próprio benefício (Amiri *et al.*, 1992).

Sabe-se atualmente que os macrófagos ativados secretam IL-1 e TNF- $\alpha$  que são capazes de estimular fibroblastos (Nimer *et al.*, 1989; Hamilton, 1993). Por sua vez, os fibroblastos ativados secretam GM-CSF e M-CSF que são citocinas capazes de ativar macrófagos (Hamilton, 1993), o que poderia criar uma "alça" auto-amplificadora da produção destas

citocinas. Além disto, macrófagos isolados de granulomas periovulares, na esquistossomose murina experimental, secretam fatores solúveis com atividade estimulatória para recrutamento e proliferação de células da própria linhagem monocítica/macrofágica, ampliando ainda mais este processo (Sluiter *et al.*, 1987). Estes dados nos levam a pensar que a produção de citocinas na esquistossomose necessita estar altamente regulada a fim de limitar a intensidade da resposta inflamatória anti-antígenos do parasita e prevenir um excesso de dano tecidual.

Chensue *et al.* (1989) obtiveram evidências de uma produção sequencial de IL-1 (entre o 2° e 4° dias) e posteriormente de TNF- $\alpha$ . (entre o 8° e 16° dias), na formação do granuloma pulmonar. Estes resultados sugeriram a IL-1 como importante nos primeiros estágios de recrutamento para formação do granuloma enquanto que o TNF- $\alpha$ . teria um papel importante mais tardiamente na manutenção das funções efetoras dos macrófagos. Outros estudos com modelos sincrônicos de formação de granuloma em camundongos (Chensue *et al.*, 1992) demonstram que o pico de IL-4 ocorre entre os picos de IL-1 e TNF- $\alpha$ .

Todos os resultados aqui expostos sugerem que a formação e o desenvolvimento do granuloma envolve uma produção "orquestrada" de citocinas, possivelmente resultante da participação sequencial de diferentes populações celulares. O estudo da diferenciação celular e a investigação das citocinas produzidas na esquistossomose mansoni humana poderá acrescentar novos graus de complexidade à cascata de eventos envolvidos no desenvolvimento e regulação das respostas imunes do hospedeiro aos antígenos do parasita. Obviamente, estes dados devem ser importantes para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na formação dos granulomas e desenvolvimento da imunopatologia na esquistossomose. Diante do exposto, pretendemos investigar o processo de diferenciação das células da linhagem monocítica/macrofágica na esquistossomose humana e identificar as principais citocinas produzidas nas respostas dirigidas aos antígenos do *S. mansoni*.

**2 - JUSTIFICATIVA:**

O estudo da diferenciação de células da linhagem monocítica/macrofágica e a investigação das citocinas produzidas na esquistossomose mansoni humana poderá ampliar os conhecimentos sobre a cascata de eventos envolvidos no desenvolvimento e regulação das respostas imunes do hospedeiro aos antígenos do parasita. Estes dados são ser importantes para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na formação dos granulomas e desenvolvimento da imunopatologia na esquistossomose.

### 3 - OBJETIVOS:

OBJETIVO GERAL: Investigar o processo de diferenciação das células da linhagem monocítica/macrofágica na esquistossomose humana e identificar as principais citocinas produzidas nas respostas dirigidas aos antígenos do *S. mansoni*.

#### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1-Investigar o efeito da estimulação com antígenos do *S. mansoni* sobre o processo de diferenciação de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*.
- 2-Avaliar a atividade de sobrenadantes de cultura obtidos de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos estimuladas com antígenos do *S. mansoni* sobre o processo de diferenciação de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*.
- 3-Investigar a participação do processo de diferenciação de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas na imunorregulação da resposta aos antígenos do *S. mansoni* durante ensaios de proliferação celular e formação de granuloma *in vitro*.
- 4-Investigar a expressão de marcadores de superfície (CD 29, CD 54 e HLA-DR) durante o processo de diferenciação *in vitro* de monócitos até a formação de células gigantes multinucleadas utilizando citometria de fluxo.
- 5-Detectar as principais citocinas produzidas pelas células mononucleares de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica após estimulação *in vitro* com antígenos do *S. mansoni*. A detecção das citocinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) por ELISA, será feita no seguintes casos:
  - 5.1- Durante a resposta proliferativa celular (estimulação com antígenos solúveis).
  - 5.2- Durante a formação do granuloma *in vitro* (estimulação com antígenos conjugados).
- 6-Investigar as consequências da resposta aos antígenos do *S. mansoni* sobre os seguintes aspectos funcionais de monócitos e macrófagos:
  - 6.1- Atividade metabólica.
  - 6.2- Produção de monocinas (TNF- $\alpha$ ).
  - 6.3- Formação de granuloma *in vitro*.

## **4- MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Sangue Humano**

#### 4.1.1 Sangue de doadores infectados pelo *S. mansoni*

Os doadores de sangue eram todos voluntários e foram informados por técnicos e por médicos do Hospital Sofia Feldman, do Hospital das Clínicas-UFMG, e do ambulatório da AÇOFORJA S.A. em Santa Luzia-MG de que o sangue coletado seria usado para pesquisa básica. Os indivíduos infectados pelo *S. mansoni* foram diagnosticados e selecionados por exames clínicos e parasitológicos (presença de ovos do *S. mansoni* nas fezes) realizados por profissionais que compoem as equipes médicas desses dois centros de saúde sob a responsabilidade da Dr<sup>a</sup> Geralda Nuzia Simões.

#### 4.1.2 Sangue de doadores normais

Os indivíduos normais não apresentavam sintomas clínicos de infecção pelo *S. mansoni* e não apresentavam ovos deste parasita em suas fezes. Além disto as células mononucleares do sangue periférico desses pacientes não reagem em testes de proliferação celular com SEA ou SWAP. Estes indivíduos foram selecionados no Departamento de Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais - Brasil e no Department of Veterinary Medicine, College of Veterinary Medicine - Texas A & M University, Texas - USA.

### **4.2 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico humano**

As células mononucleares do sangue periférico humano foram separadas segundo procedimento descrito por Thorsby; Bratlier (1984). O sangue dos pacientes era colhido em presença de heparina (20 Unidades de heparina por 20 ml de sangue). 20 ml do sangue recém-coletado era colocado cuidadosamente sobre 12,5 ml de uma solução de Ficoll -Hypaque [Ficoll 6,42% (SIGMA) e Hypaque 20% (WINTHROP)] em tubosplásticos cônicos (FALCON) de 50 ml. Os tubos eram centrifugados a 1450 rpm por 45 minutos a 18°C em centrífuga refrigerada. Ao final da centrifugação, obtinha-se um anel de células mononucleares na interface entre a solução de Ficoll e o plasma. O plasma era retirado cuidadosamente e o anel de células coletado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo cônico de 50,0 ml (FALCON). O excesso de Ficoll era removido por centrifugação lavando-se as células por 3 vezes com 30,0 ml de MEM ("Minimal Essential Medium", SIGMA) em cada lavagem, a 4°C e a velocidade de 1500 rpm por 10 minutos. As células eram finalmente ressuspensas em 5,0 ml de RPMI (SIGMA) contendo 4,75 g/l de Hepes (SIGMA), 10% de soro humano AB<sup>+</sup> inativado, 1,6% de L-glutamina (SIGMA), 3% de coquetel dos antibióticos penicilina e estreptomicina (SIGMA), e 0,05 mg de gentamicina (SCHERING). A quantidade de células

obtidas era determinada por contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade celular foi determinada utilizando-se o teste do azul de tripan. Todos os procedimentos eram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar, com excessão da contagem de células.

### 4.3 Preparação de monócitos

Os monócitos eram obtidos a partir da população de células mononucleares por aderência ao plástico. As células mononucleares eram incubadas em garrafas de cultivo de células (em duas passagens) por 45 minutos a 37°C em estufa de CO<sub>2</sub> na presença de RPMI contendo 10% de soro humano AB<sup>+</sup> inativado pelo calor (56°C por 30 minutos), 4,75 g/l de HEPES, 1,6% de L-glutamina, 3% de coquetel dos antibióticos penicilina e estreptomicina e 0,05 mg de gentamicina. As células aderentes eram então recuperadas em RPMI gelado e com o auxílio de raspador apropriado ("cell scraper"). Todos os procedimentos eram realizados em condições estéreis utilizando-se capela de fluxo laminar.

### 4.4 Preparações de antígenos do *S. mansoni*

Camundongos BALB/C (com 8 a 10 semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Bioterismo do ICB-UFMG) eram inoculados subcutaneamente com 100 a 120 cercárias de *S. mansoni* cepa LE. Estas cercárias eram obtidas pela infecção experimental de caramujos *Biomphalaria glabrata* e foram gentilmente cedidas pelo Grupo Interdepartamental de Desenvolvimento da Esquistossomose (GIDE) - ICB-UFMG e pelo Centro de Pesquisas "René Rachou, de Belo Horizonte-MG.

#### 4.4.1 Preparação de antígenos solúveis de ovo do *S. mansoni* (SEA).

Antígenos solúveis do ovo (SEA) foram preparados a partir de homogenatos do ovo do *S. mansoni* de acordo com procedimentos publicados por Carter; Colley (1978). Os ovos do *S. mansoni* foram obtidos através de perfusão do fígado de camundongos infectados pelo parasita segundo procedimento descrito por Smithers; Terry (1965) e triturados em um potter com pistilo de teflon para a obtenção de um homogenato. A limpeza dos ovos liberados dos tecidos era feita por decantação em solução salina, filtração em tela de Kato (poros: 0,09 mm), redução do volume da suspensão e lavagens adicionais com PBS 0,15M pH 7,4. A suspensão era centrifugada a 37.000 rpm (ultracentrifuga SORVALL OTDSB rotor T875) por 1 hora a 4°C, esterilizada em filtro com poros de 0,22 µm de diâmetro (MILLIPORE), distribuída em alíquotas

e armazenada a  $-70^{\circ}\text{C}$ . O conteúdo protéico era dosado pelo ensaio de microdosagem de Bradford (Bradford., 1976). Para ensaios celulares., o SEA era diluído na concentração de  $5\mu\text{g}/25\mu\text{l}$ .

#### 4.4.2 Preparação de antígenos solúveis de verme adulto (SWAP).

Preparações solúveis de vermes adultos (SWAP) são obtidos por perfusão das veias mesentéricas de camundongos infectados (Smithers; Terry, 1965) com cercárias na oitava semana após a infecção. Os vermes adultos são coletados e lavados em PBS. O antígeno era preparado em um homogenizador de tecidos e o extrato obtido era centrifugado a 37.000 rpm (ultracentrífuga SORVALL OTD5B rotor T875) a  $4^{\circ}\text{C}$  por 1 hora. O sobrenadante era então esterilizado em filtro com poros de  $0,22\mu\text{m}$  de diâmetro (MILLIPORE}, aliquotado e congelado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . O conteúdo proteico era dosado pelo ensaio de microdosagem de Bradford (Bradford, 1976). Para ensaios celulares, o SWAP era diluído na concentração de  $5\mu\text{g}/25\mu\text{l}$ .

#### 4.5. Resposta proliferativa de células mononucleares

O ensaio de proliferação celular era realizado segundo procedimento já descrito previamente (Gazzinelli *et al.*, 1983) com ligeiras modificações. Cerca de 200.000 células em  $200\mu\text{l}$  de RPMI (1,6% de L-glutamina, 3% de coquetel dos antibióticos- penicilina e estreptomicina, 0,05 mg de gentamicina e 10% de soro humano normal AB<sup>+</sup> inativado) eram pipetadas para placas de cultivo de 96 cavidades de fundo chato. Preparações de antígenos do *S. mansoni* eram adicionadas ( $5\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ) e as placas incubadas em presença de 5% de CO<sub>2</sub> a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 dias. Eram mantidas, como controle, células cultivadas em meio de cultura não acrescido de antígenos, mitógenos e sobrenadantes. Nos experimentos realizados para a avaliação da capacidade de apresentação de antígenos por células da linhagem monocítica/macrofágica, foi utilizado aproximadamente 20% de células aderentes ( $4 \times 10^4$  células/cavidade) para 80% de células não aderentes ( $2 \times 10^5$  células/cavidade). No último dia de cultivo eram adicionados  $0,5\mu\text{Ci}$  de timidina tritiada com atividade específica de 61 Ci/mmol (ICM BIOMEDICALS) e as placas reincubadas por 18 horas. Após esse período, as células eram coletadas em papel de fibra de vidro (WHATMAN) com o auxílio de um aparelho coletor de células ("cell-harvester"- SKATRON). Este papel era seco e colocado em frascos próprios para determinação de cintilação líquida. Acrescentava-se a cada frasco  $2,5\text{ml}$  de coquetel de cintilação contendo  $5,0\text{g}$  de PPO (2,5, Difeniloxazole, SIGMA) e  $0,05\text{g}$  de POPOP {IA-bis[2-(feniloxazolil)]-Benzeno fenil-oxazolilfenil-oxazolil-fenil, SIGMA}

em 1,0 litro de Tolueno. A radioatividade incorporada era determinada pelo número de cintilações por minuto (cpm) utilizando-se um contador de cintilação líquida (Beckman LS100C). Cada amostra era contada por 2 minutos com os canais de H<sup>3</sup> abertos e todos os ensaios eram feitos em triplicata. Sobrenadantes de cultura foram coletados em diferentes períodos de tempo, centrifugados e estocados a -70°C para posterior quantificação das citocinas presentes.

#### **4.6. Ensaio de formação do granuloma *in vitro***

##### 4.6.1 Conjugação das preparações antigênicas às microesferas de poliacrilamida.

Segundo Doughty *et al.* (1987), 100 mg de microesferas de poliacrilamida (40-60µm Bio-Gel P-40, BIO-RAD) eram hidratadas em 50 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada e esterilizadas por autoclavagem a 120°C, 1 atm por 30 min. As microesferas de poliacrilamida (PB) eram lavadas e ativadas em 50,0 ml de tampão bicarbonato estéril (NaHCO<sub>3</sub> 0,25M, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,25M, pH 8,3) por 4 horas a 63°C em banho-maria. Após esse tempo, as microesferas eram lavadas 3 vezes com H<sub>2</sub>O destilada estéril, e então conjugadas a 10 mg de antígenos (SEA, SWAP ou PPD) em 50 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada acidificada (pH 6,5 a 6,8) contendo 50 mg de EDAC [cloreto de 1-etil.3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida, SIGMA]. A mistura era mantida em homogeneização por 18 horas a 4°C. As microesferas eram lavadas exaustivamente com PBS 0,15M (pH 7,4) estéril e armazenadas a 4°C em 20 ml de PBS estéril contendo 0,1% de azida sódica. Em paralelo submetiam-se as microesferas de poliacrilamida (PB) aos mesmos reagentes e procedimentos anteriormente descritos, apenas na ausência de antígenos. Para utilização em ensaios celulares, uma alíquota de cada suspensão de microesferas (conjugadas ou não aos antígenos) era lavada 3 vezes com MEM e ressuspensas em RPMI na concentração de 200 microesferas por 25 µl. Todos os procedimentos eram realizados em condições estéreis em capela de fluxo laminar.

##### 4.6.1 Reação granulomatosa *in vitro*

O ensaio para formação de granuloma *in vitro* foi realizado segundo procedimento descrito por Doughty *et al.* (1987) com ligeiras modificações. Duzentas (200) microesferas de poliacrilamida recobertas com preparações antigênicas do parasita (SEA ou SWAP) ou com antígenos proteicos derivados do *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) eram adicionadas em um volume de 100 µl em placas de cultura de tecidos de 24 cavidades. Células do sangue periférico (1,0 x 10<sup>6</sup>) obtidas de pacientes com esquistossomose ou de indivíduos não infectados são

adicionadas para cada cavidade em um volume final de 2 ml de meio de cultura RPMI contendo 10% de soro humano AB<sup>+</sup> inativado, 1,6% de L-glutamina, 3% de coquetel penicilina-estreptomicina e 0,05 mg de gentamicina. Cada grupo, experimental e controle, era feito em triplicata e as células mantidas em incubadora de CO<sub>2</sub> a 37°C. A reação granulomatosa *in vitro* era avaliada pela quantificação da reatividade celular em torno das microsferas utilizando um microscópio invertido (MICF, NIKON). A reatividade celular era determinada baseando-se nos critérios de contagem do número de células que aderidas as microsferas, evidência visual de transformações blásticas seguida de migração celular e camadas de aderência celular em torno das microsferas. Para cada grupo experimental eram feitas 300 determinações separadas da reatividade celular. Um valor numérico era atribuído à reação verificada que correspondia à seguinte classificação do granuloma *in vitro*:

1. Nenhuma célula ligada à microesfera,
2. < de 5 células ligadas à microesfera,
3. > de 5 células ligadas à microesfera,
4. > de 5 células ligadas à microesfera, acompanhada por migração de células mononucleares e transformação blástica,
5. Monocamada de células aderentes ligada a microesfera acompanhada por migração de células mononucleares,
6. Múltiplas camadas de células em volta da microesfera seguida por migrações de células mononucleares.

O número de granulomas contados era multiplicado pela classificação correspondente, somado e dividido por 100. A média resultante era expressa como Índice de Granuloma (I.G.). Para cada triplicata era calculada a média do I.G., dado como média ponderada de 100 determinações de acordo com a fórmula (Hirsch, 1992):

$$I.G. = \frac{\sum_{i=1}^6 (a_i \times i)}{N}$$

onde:

N = 100 determinações,  
a = número de esferas contadas por classificação,  
i = classificação do granuloma.

Sobrenadantes foram coletados em diversos períodos de tempo das culturas, centrifugados e estocados a -70°C para posterior quantificação das citocinas presentes.

#### 4.7. Formação de células gigantes e cálculo da porcentagem (%) de fusão

De acordo com o tipo de experimento a ser realizado, células mononucleares de sangue periférico ( $1 \times 10^6$  células) ou monócitos ( $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ ) eram cultivados a  $37^\circ\text{C}$  em estufa de  $\text{CO}_2$  em placas de 24 cavidades em presença de RPMI e 10% de soro humano inativado AB<sup>+</sup>. O processo de diferenciação dos monócitos era acompanhado pelas alterações morfológicas e contagem do número de células gigantes (em microscópio invertido). O ensaio consiste da incubação de  $1,0 \times 10^6$  monócitos em placas de cultura de 24 cavidades, com os sobrenadantes e substâncias a serem testadas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera 5%  $\text{CO}_2$ . Após o período de incubação, conta-se o número de células gigantes formadas por campo (mínimo de 20 campos ao acaso verificados com aumento de 200X). Considera-se células gigantes as células com características morfológicas da linhagem monocítica/macrofágica e que apresentavam dois ou mais núcleos para o mesmo citoplasma. Posteriormente as células eram lavadas com PBS e coradas pelo método de Giemsa-Wright (Andersen *et al.*, 1983) para cálculo da taxa de fusão (%). Esta porcentagem é calculada pela contagem total do número de núcleos dentro das células gigantes sobre o total de núcleos encontrados por campo.

$$\% \text{ de fusão} = \frac{\text{número total de núcleos dentro das células gigantes em x campos}}{\text{número total de núcleos em x campos}} \times 100$$

#### 4.8. Detecção de marcadores na membrana celular por citometria de fluxo.

Células aderentes, mantidas por diferentes períodos de tempo em cultura, eram coletadas, lavadas por 2 vezes (5 minutos - 1000 rpm cada) e ressuspensas em PBS contendo 1% de soro fetal bovino (FCS) e 0.1% de azida sódica.  $2.0 \times 10^5$  células (40  $\mu\text{l}$ ) eram incubadas, em cada caso, com 10  $\mu\text{l}$  dos seguintes anticorpos monoclonais: anti- HLA-DR (SIGMA), anti-CD29 (BIOSOURCE) ou anti-CD54 (PHARMINGEN) por 30 min, a  $4^\circ\text{C}$  ao abrigo da luz. As células eram novamente lavadas e ressuspensas em 500  $\mu\text{l}$  de PBS com 1% de FCS e 0.1 % de azida sódica para aquisição dos dados em um citômetro de fluxo (BECTON-DICKSON – Flowcytometer-FACScan). Antes de cada experimento a estabilidade e reprodutibilidade do citômetro era checada com o kit Calibrite™ beads (BECTON DICKSON). Os tubos controle incluíam células incubadas somente com meio de cultura (controle de fluorescência basal) e células incubadas com anticorpos de camundongo IgG controle conjugados a isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE) como controle negativo de ligação

inespecífica. Durante a aquisição, dez mil eventos eram contados por amostra. Monócitos e macrófagos eram identificados pelas características de tamanho e granulosidade desta população ("forward *versus* side scatter") e confirmado por "backgating" através do uso do kit Leucogate Simultest (BECTON DICKSON) com anticorpos monoclonais anti-CD14 conjugado a PE e anti-CD45 conjugado a FITC.

#### 4.9. Metabolização de sal de tetrazólio (MTT)

A metabolização de MTT [brometo de 3-(4,5 dimeteiltiazol-2-il)2,5 difenil tetrazólio, SIGMA] foi avaliada segundo Mosmann (1983) em placas de cultura de 96 cavidades de fundo chato contendo  $2 \times 10^5$  células por cavidade e um volume final ajustado para 200  $\mu$ l com RPMI. A solução de MTT (5 mg/ml de PBS) era adicionada (20  $\mu$ l/cavidade) e as placas eram incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 horas. A reação era paralisada pela adição de 100  $\mu$ l de solução de SDS/HCl (29,9 ml de SDS a 10% e 0,1 ml de HCl concentrado) e a leitura realizada em leitor de ELISA a 570nm.

#### 4.10. Quantificação de citocinas

##### 4.10.1 ELISA ("Enzyme Linked Immunosorbent Assay")

As citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura foram dosadas por ELISA utilizando kits comerciais disponíveis para IL-4, IL-10, IL-13, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ . (BIOSOURCE) e IL-5 (R&D SYSTEMS) segundo as respectivas instruções contidas em cada kit. Placas de 96 poços de fundo chato, foram recobertas com os anticorpos monoclonais específicos para a captura da citocina que ia ser dosada. Foram adicionados 100  $\mu$ l de citocina padrão recombinante seguindo diluições seriadas 1:2 à partir das concentrações iniciais. Às outras fileiras foram adicionados controles e 100  $\mu$ l/poço do sobrenadante obtido de cultura a ser dosado. As placas eram incubadas a 37°C por uma hora e lavadas por 6 vezes com uma solução contendo PBS-Tween 20 (PBS-T). A seguir, eram adicionados 100  $\mu$ l/poço do anticorpo anti-citocina a ser dosada, conjugado à biotina, diluído em PBS-T. As placas eram reincubadas por 1 hora à temperatura ambiente e novamente lavadas por 6 vezes em PBS-T. Após esta etapa, eram adicionados 100  $\mu$ l/poço de streptoavidina conjugada à peroxidase, diluída 1:100 em PBS-T. As placas de ELISA eram então incubadas por 1 hora e lavadas por 6 vezes com PBS-T, quando era adicionado 100  $\mu$ l/poço de substrato cromógeno estabilizado-TMB. A reação era interrompida (quando desenvolvida a cor correspondente) com 100  $\mu$ l de HCl 2,0 N. Os resultados eram obtidos pela diferença entre as absorbâncias a 450 e 540nm (Abs<sub>450</sub> - Abs<sub>540</sub>)

medida em um leitor automático de ELISA (BIO-RAD 2550 READER EIA). A concentração de citocinas nos sobrenadantes era determinada em pg/ml através da comparação com as absorbâncias obtidas em uma curva padrão da respectiva citocina recombinante realizada simultaneamente.

#### 4.10.2 Bioensaio para a detecção de TNF

##### 4.10.2.1 Manutenção da linhagem de células L-929

Para a detecção de TNF- $\alpha$ , era utilizado o clone L-929 (CCLI, ATCC), derivado de fibroblastos de camundongos C3H. Estas células apresentam elevada sensibilidade a esta citocina, capaz de provocar sua morte em concentrações reduzidas (<20 ng/ml). As células eram cultivadas em RPMI suplementado com 10% SFB, crescendo em monocamadas aderidas à superfície do frasco de cultura. Para o repique das culturas, o meio era desprezado e as células desprendidas pelo tratamento com uma solução de tripsina 0,2% (GIBCO-BRL), a 37°C, por 3 min. As células eram ressuspensas em 10 ml de MEM, transferidas para tubo plástico, mantido em banho-de-gelo para evitar a aderência celular, e centrifugadas a 1.600 rpm, por 10 min, a 4°C. Sempre em banho de gelo, o sobrenadante era removido por aspiração e as células eram ressuspensas em meio fresco e recultivadas. Para manutenção do estoque, as células eram tripsinizadas, lavadas, congeladas e mantidas em nitrogênio líquido.

##### 4.10.2.2 Congelamento e descongelamento das células

Para o congelamento, alíquotas de células L-929 mantidas em cultura eram centrifugadas a 1.400 rpm por 10 min à temperatura ambiente, ressuspensas em 1,0 ml de FCS contendo 10% de DMSO (dimetil sulfoxido, SIGMA), congeladas imediatamente a -70°C e transferidas 24 horas depois para armazenamento em N<sub>2</sub> líquido. Para o descongelamento e recuperação das células estocadas, a suspensão celular armazenada em FCS contendo 10% de DMSO era retirada do N<sub>2</sub> líquido e imediatamente descongelada em banho maria a 37°C. A suspensão celular era então diluída lentamente (gota a gota) com o auxílio de uma pipeta do tipo Pasteur em 9,0 ml de RPMI contendo 10% de FCS. A suspensão celular era lavada uma vez com RPMI para a retirada do excesso de DMSO e cultivada por 24 horas. Após este período, metade do volume do meio de cultura era trocado por meio fresco e as células recolocadas em cultura sofrendo trocas periódicas de RPMI sempre que fosse necessário.

##### 4.10.2.3 Detecção de TNF

Em alguns experimentos a presença de TNF em sobrenadantes de cultura de células foi quantificada por Bioensaio utilizando células L-929 (ATCC) sensíveis à ação citotóxica desta citocina. O ensaio era realizado segundo técnica previamente descrita (Ruff; Giford,

1980; Lattime *et al.*, 1988) com ligeiras modificações.

A linhagem L-929 era previamente cultivada até o crescimento confluyente das células aderidas ao fundo da garrafa. Estas células eram individualizadas por tripsinização e ressuspensas em RPMI contendo 10% de FCS e 1 µg/ml de Actinomicina-D (solução estoque: 2,0 mg/ml em etanol; SIGMA) de modo a obter 6 x 10<sup>5</sup> células por ml. Os ensaios eram realizados em placas de cultura de 96 poços em duplicata. O padrão de TNF-α humano recombinante (solução estoque: 0,1 mg/ml ; solução de uso: 10 ng/ml em PBS; PROMEGA) era aplicado em diluição seriada com a concentração inicial de 1:3 da solução de uso, em um volume de 100 µl por poço. Os sobrenadantes de cultura a serem testados quanto à concentração de TNF eram adicionados em diluições sucessivas (de modo equivalente ao utilizado para a diluição do padrão de TNF-α. recombinante). O controle de viabilidade das células L-929 (sem TNFα e sem sobrenadantes) recebia 100 µl/poço de RPMI contendo 10% de FCS. Aos poços correspondentes ao padrão, amostras e controle de viabilidade celular, eram acrescentados 50 µl da suspensão celular contendo 3 x 10<sup>4</sup> células L-929 completando um volume de 150 µl/poço. Nos poços correspondentes ao branco da reação, eram distribuídos 150 µl de RPMI contendo 10% de FCS e 0,05 µg de actinomicina-D (mesma concentração final dos poços com células). As placas eram então incubadas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após 18 horas de incubação, eram adicionados 20 µl de solução de MTT (5mg/ml) e as placas eram incubadas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> durante 4 horas. A reação era paralisada com 100 µl de uma solução de SDS/HCl [29,9 ml de SDS a 10% (duodecil sulfato de sódio) e 100 µl de HCl]. As placas eram então incubadas nas mesmas condições anteriores por um período adicional de 18 horas para a dissolução completa dos cristais de formazan formados. A absorbância era determinada a 570 nm em leitor de ELISA (BIO-RAD 2550 READER EIA). Os resultados eram expressos em porcentagem de citotoxicidade (% Ctx), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%Ctx = 1 - \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

A quantidade de TNF era determinada por comparação com a curva padrão de TNFα recombinante. Como controle também foram usados anticorpos monoclonais anti-TNFα, neutralizadores de sua ação citotóxica. Uma unidade de TNF é definida como a quantidade de citocina capaz de provocar a morte de 50% das células L-929.

#### **4.11 Tratamento estatístico:**

Testes e análise de variância (ANOVA) foram feitos para dados que apresentavam dispersão Gaussiana. Os dados que não apresentaram dispersão Gaussiana foram submetidos a testes não paramétricos. Para efeito comparativo de diferentes grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e para comparar as diferenças entre dois grupos utilizamos o teste de Mann-Whitney, adotando-se um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). As análises foram realizada com o auxílio do programa estatístico SIGMAST ATTM versão 1.0 produzido pela Jandel Scientific Corporation - USA.

## 5- RESULTADOS

### 5.1- Diferenciação de células da linhagem monocítica/macrofágica e formação de células gigantes *in vitro* na esquistossomose humana.

5.1.1- “Monócitos humanos obtidos do sangue periférico de indivíduos normais ou infectados pelo *S. mansoni* são capazes de diferenciar-se *in vitro* em macrófagos e células gigantes multinucleadas”

Inicialmente, realizamos observações das alterações morfológicas ocorridas em monócitos humanos mantidos em cultura de longa duração. Os monócitos recém- coletados do sangue periférico eram inicialmente pequenos, de aparência circular e com poucos grânulos visíveis no citoplasma (figura 1). À partir do 4º ou 5º dia em cultura desenvolviam-se em macrófagos, que eram células maiores com alguns grânulos visíveis no citoplasma e que apresentavam diversos formatos, tais como: circular, triangular e até mesmo epitelióide (figura 2). Geralmente no 7º dia de cultura já era possível se observar a presença de algumas células gigantes multinucleadas (figura 3).

À partir destas observações morfológicas iniciais, passamos a investigar o processo de diferenciação *in vitro* utilizando os métodos de contagem do número de células gigantes multinucleadas formadas por campo e determinação das taxas de fusão dos monócitos précursores mantidos em cultura. Verificamos que o início da formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* correspondia geralmente ao período entre o 5º e o 8º dia de cultura (figura 4), aumentando progressivamente a partir deste ponto. A taxa de fusão dos monócitos *in vitro* também aumentava com o decorrer do tempo em cultura (figura 5), seguindo um padrão similar ao observado para a formação de células gigantes por campo. Os resultados destes experimentos indicam que as células da linhagem monocítica/macrofágica sofrem um processo de diferenciação *in vitro* com alterações morfológicas equivalentes às etapas do processo de diferenciação que ocorre *in vivo*, inclusive com a formação de células gigantes multinucleadas. O estudo cinético do processo de diferenciação dos monócitos *in vitro* revelou a existência de um padrão similar entre as células de indivíduos normais e esquistossomóticos. Os resultados mostram que, na ausência de estimulação antigênica, os monócitos obtidos de indivíduos normais ou de indivíduos esquistossomóticos apresentam equivalentes taxas de fusão (figura 5) e formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* (figura 4).

Embora as células gigantes multinucleadas têm sido comumente encontradas no granuloma esquistossomótico *in vivo*, diversos aspectos relacionados ao envolvimento dos antígenos do parasita no desenvolvimento deste tipo celular permanecem desconhecidos. No

próximo grupo de experimentos passamos a investigar a participação dos antígenos do *S. mansoni* no processo de diferenciação de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* na esquistossomose humana.

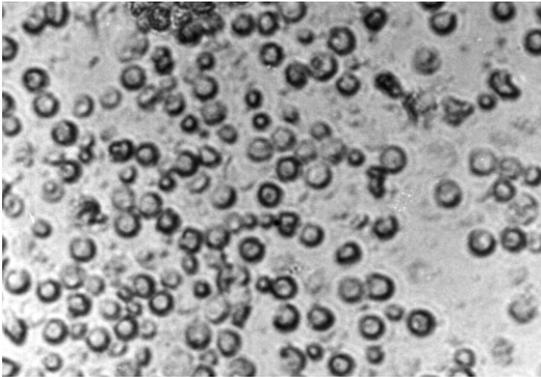


Figura 01: Aspecto morfológico de células humanas da linhagem monocítica/ macrofagica, recém coletadas de sangue periférico, no tempo 0 de cultura.

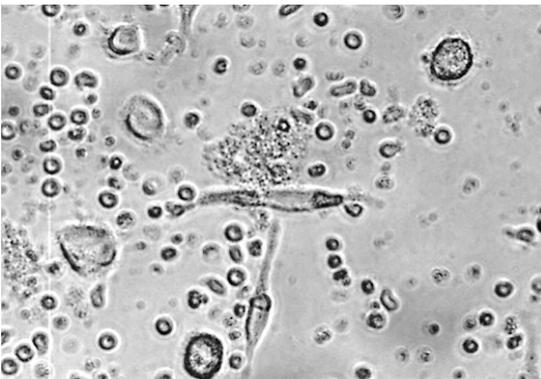


Figura 02: Aspecto morfológico de células humanas da linhagem monocítica/macrofagica, no 5º dia de cultura.

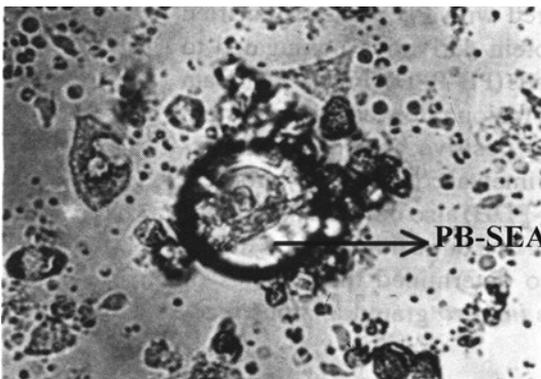


Figura 03: Aspecto morfológico de células humanas da linhagem monocítica/macrofagica, no 8º dia de cultura, mostrando o início da formação de células gigantes multinucleadas ao lado de microesfera de poliacrilamida conjugada aos antígenos solúveis do ovo do *S. mansoni* (PB SEA)

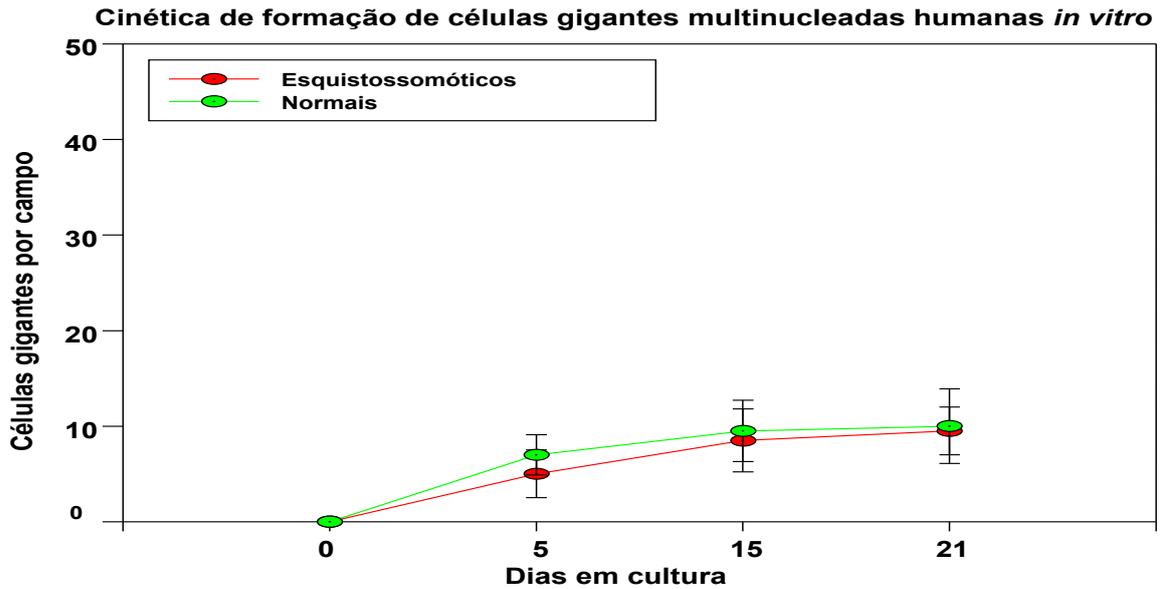


Figura 04: Cinética de formação de células gigantes multinucleadas humanas *in vitro*. A formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* foi avaliada conforme descrito em material e métodos a partir de culturas de monócitos ( $1 \times 10^6$  / cavidade) obtidos de indivíduos esquistossomóticos portadores da forma intestinal crônica e indivíduos normais. Os resultados estão expressos em número de células gigantes formadas por campo e correspondem à média  $\pm$  desvio padrão de 10 experimentos em triplicata.

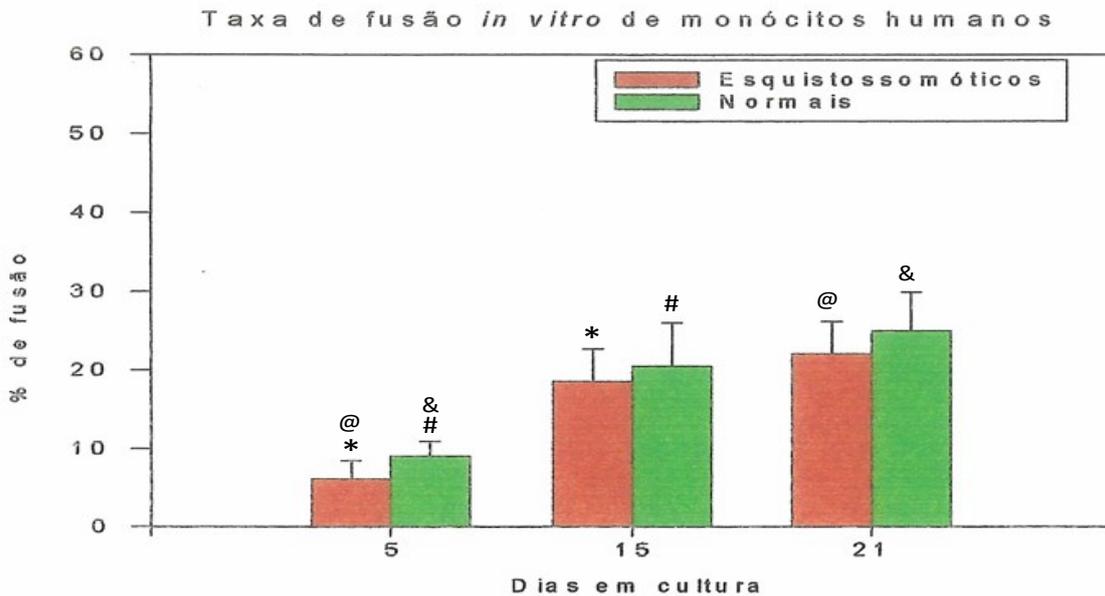


Figura 05: Taxa de fusão *in vitro* de monócitos humanos. Monócitos ( $1 \times 10^6$ /cavidade) obtidos de indivíduos esquistossomóticos portadores da forma intestinal crônica e de indivíduos normais foram mantidos em cultura e corados pelo método de Wright-Giemsa para avaliação da taxa de fusão conforme descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos em porcentagem (%) de fusão e correspondem a média  $\pm$  desvio padrão de 10 experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #, @ &) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

5.1.2 "A estimulação de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos com antígenos do *S. mansoni* conjugados a microesferas de poliacrilamida induz a um aumento na formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*."

Investigamos o efeito da estimulação de células mononucleares de indivíduos normais e esquistossomóticos com antígenos do *S. mansoni* conjugados a microesferas de poliacrilamida sobre o processo de diferenciação *in vitro* de monócitos. Os resultados obtidos mostram que a estimulação de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos com antígenos do parasita induz ao aumento na formação de células gigantes *in vitro* (figura 6) e a elevação das taxas de fusão dos monócitos precursores (figura 7). Por outro lado, a estimulação das células mononucleares de indivíduos normais com antígenos do *S. mansoni* não foi capaz de provocar um aumento significativo na formação de células gigantes *in vitro* (figura 8) ou na taxa de fusão dos monócitos (figura 9). De posse deste resultado, elaboramos a hipótese de que o aumento observado na formação de células gigantes multinucleadas poderia ser mediado pela produção de fatores solúveis por células mononucleares de indivíduos infectados após estimulação com os antígenos do *S. mansoni*. Para a investigação desta hipótese, avaliamos os efeitos dos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos estimuladas com antígenos do *S. mansoni* sobre o processo de diferenciação de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*.

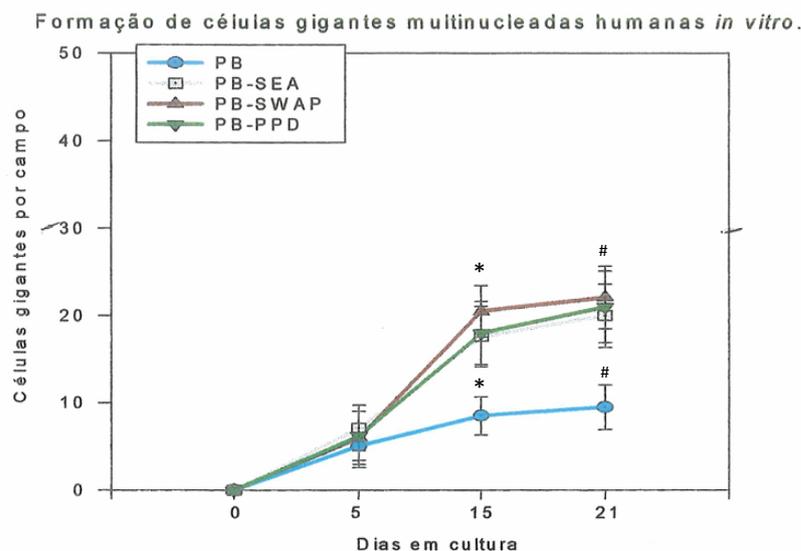


Figura 06: Taxa de fusão *in vitro* de monócitos humanos: Efeito da estimulação com antígenos do *S. mansoni*. Células mononucleares ( $1 \times 10^6$ /cavidade) de indivíduos esquistossomóticos portadores da forma intestinal crônica foram estimuladas com 200 microesferas de poliacrilamida (PB) conjugadas a antígeno solúvel do ovo do *S. mansoni* (PB-SEA), preparação antigênica de vermes adultos (PB-SWAP) ou PPD (PB-PPD) para avaliação da formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*. Os resultados estão expressos em número de células gigantes multinucleadas formadas por campo e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 09 experimentos em triplicata. PB-SEA, PB-SWAP e PB-PPD são estatisticamente diferentes de PB ( $p < 0,05$ ) nos tempos 15º dia (\*) e 21º dia (#).

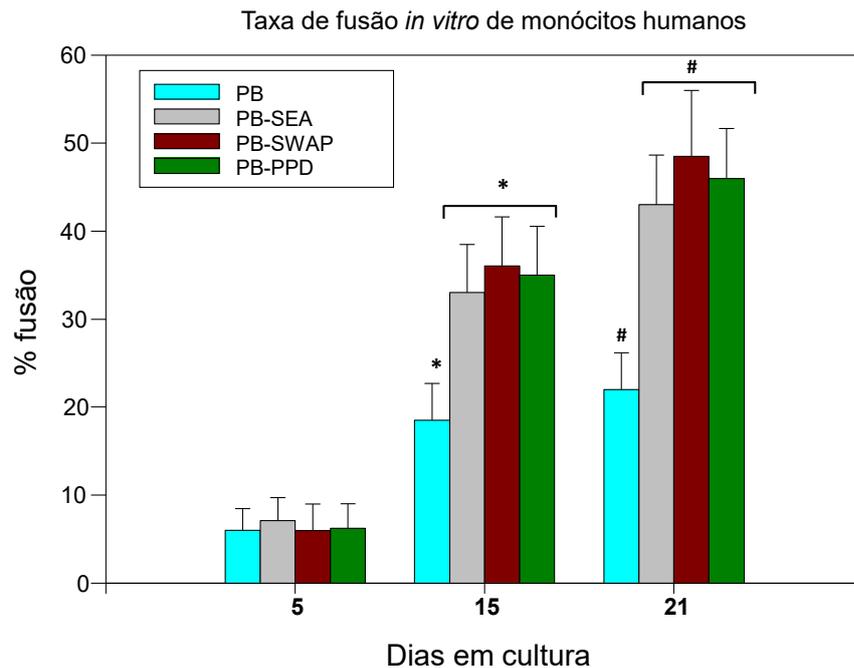


Figura 07: Efeito da estimulação com antígenos do *S. mansoni* sobre a taxa de fusão de monócitos *in vitro*. As células mononucleares ( $1 \times 10^6$ /cavidade) de indivíduos esquistossomóticos portadores da forma intestinal crônica foram estimuladas com 200 microesferas de poliacrilamida (PB) conjugadas a antígeno solúvel do ovo do *S. mansoni* (PB-SEA), preparação antigênica de vermes adultos (PB-SWAP) ou PPD (PB-PPD) para avaliação das taxas de fusão de monócitos. Os resultados estão expressos em porcentagem (%) de fusão e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 09 experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

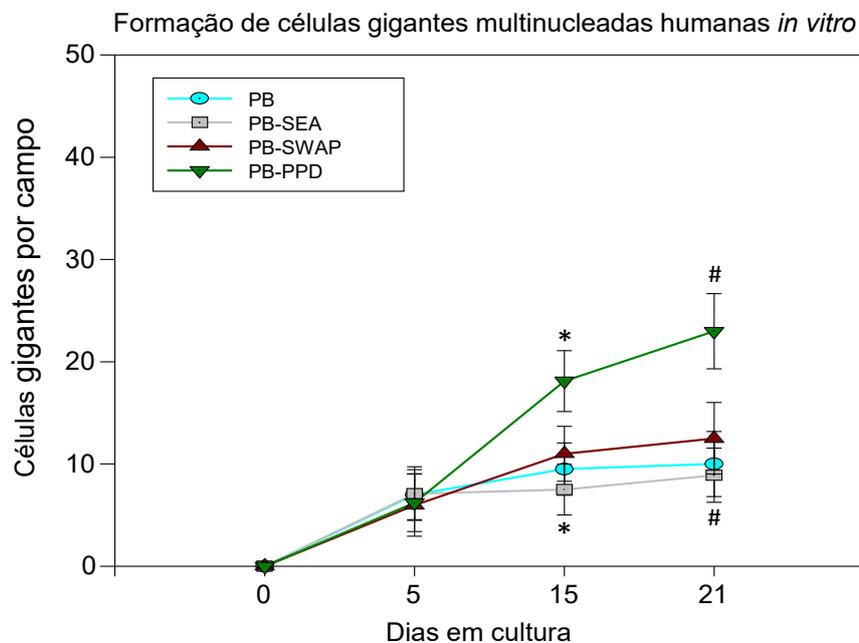
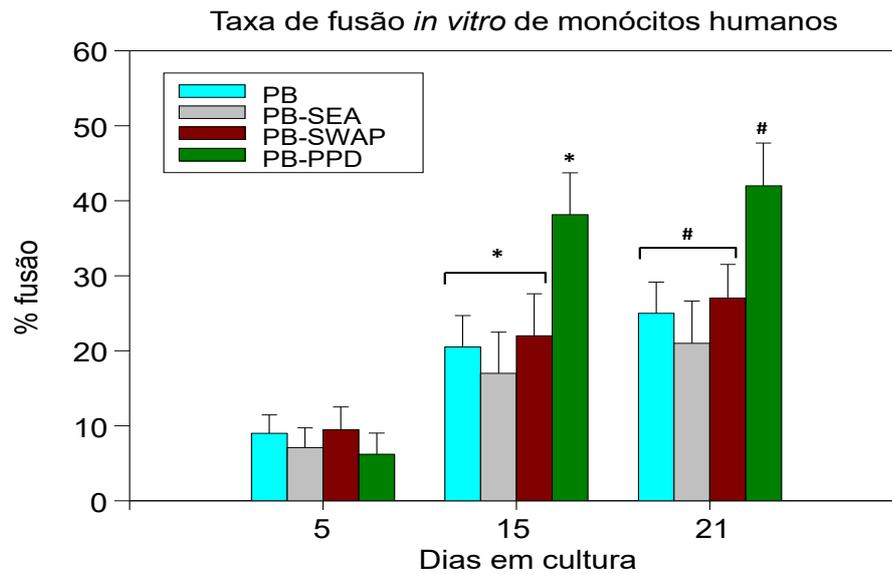
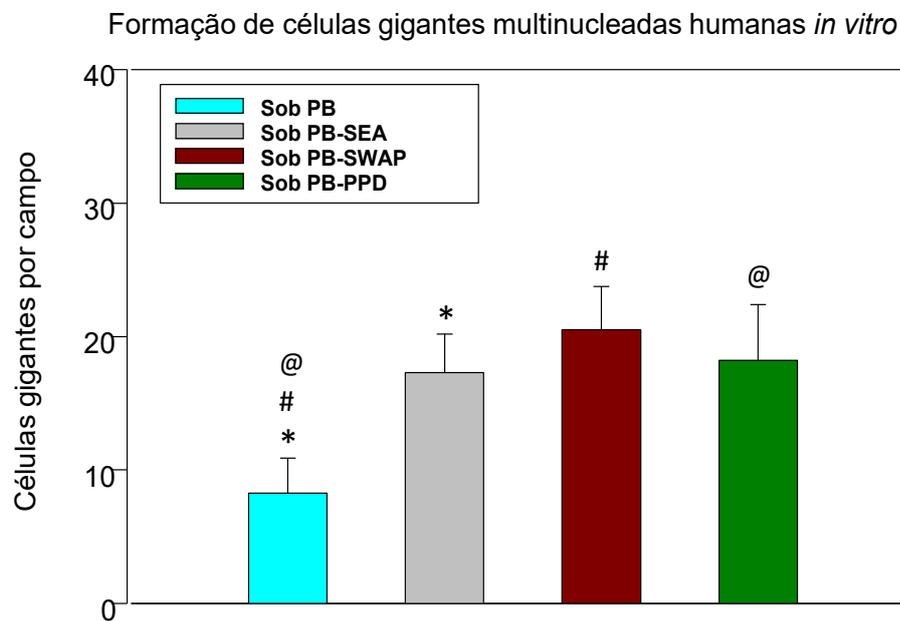


Figura 08: Efeito da estimulação com antígenos do *S. mansoni* sobre formação de células gigantes multinucleadas humanas *in vitro*. Células mononucleares de indivíduos normais foram estimuladas com microesferas de poliacrilamida (PB) conjugadas a antígeno solúvel do ovo do *S. mansoni* (PB-SEA), preparação antigênica de vermes adultos (PB-SWAP) ou PPD (PB-PPD) para a avaliação da formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*. Os resultados estão expressos em número de células gigantes multinucleadas formadas por campo e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 09 experimentos em triplicata. PB-SEA, PB-SWAP e PB são estatisticamente diferentes de PB-PPD ( $p < 0,05$ ) nos tempos 15º dia (\*) e 21º dia (#).



**Figura 09:** Efeito da estimulação de células mononucleares de indivíduos normais com antígenos do *S. mansoni* sobre a taxa de fusão de monócitos *in vitro*. Células mononucleares de indivíduos normais foram estimuladas com microesferas de poliacrilamida (PB) conjugadas a antígeno solúvel do ovo do *S. mansoni* (PB-SEA), preparação antigênica de vermes adultos (PB-SWAP) ou PPD (PB-PPD) para avaliação da taxa de fusão de monócitos conforme descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos em porcentagem (%) de fusão e representam a média +/- desvio padrão de 09 experimentos em triplicata. Símbolos iguais (\*, #) representam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).



**Figura 10:** Efeito de sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos portadores forma intestinal crônica estimuladas com antígenos do *S. mansoni* sobre a formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*. Células aderentes foram estimuladas com sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos intestinais crônicos previamente estimuladas com microesferas de poliacrilamida (PB) conjugadas a antígeno solúvel do ovo do *S. mansoni* (PB-SEA), preparação antigênica de vermes adultos (PB-SWAP) ou PPD (PB-PPD) para avaliação da formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* conforme descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como número de células gigantes por campo e representam a média +/- desvio padrão de 04 experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #, @) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

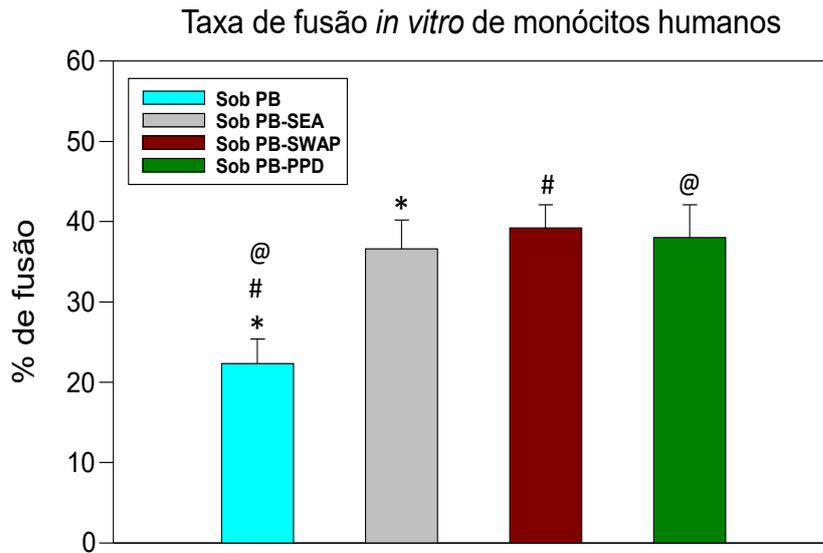


Figura 11: Efeito de sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos portadores da forma intestinal crônica estimuladas com antígenos do *S. mansoni* sobre a taxa de fusão de monócitos *in vitro*. Células aderentes foram estimuladas com sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos intestinais crônicos previamente estimuladas com microesferas de poliacrilamida (PB) conjugadas a antígeno solúvel do ovo do *S. mansoni* (PB-SEA), preparação antigênica de vermes adultos (PB-SWAP) ou PPD (PB-PPD) para avaliação da taxa de fusão de monócitos. Os resultados estão expressos em porcentagem (%) de fusão e representam a média +/- desvio padrão de 04 experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #, @) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

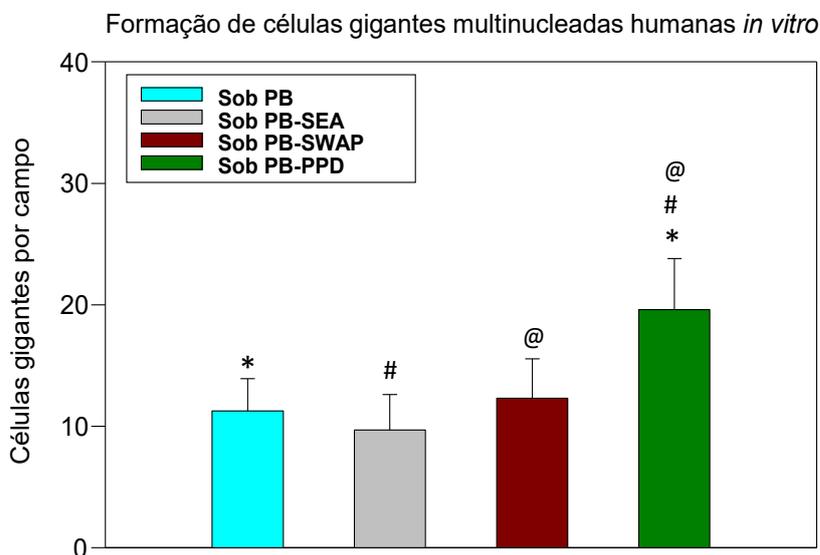
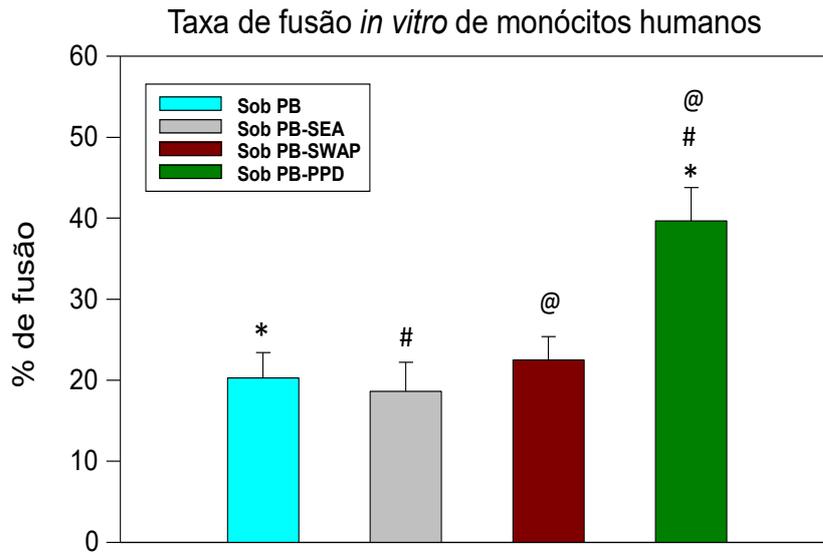


Figura 12: Efeito de sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos normais estimuladas com antígenos do *S. mansoni* sobre a formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*. Células aderentes foram estimuladas com sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos normais previamente estimuladas com microesferas de poliacrilamida (PB) conjugadas a antígeno solúvel do ovo do *S. mansoni* (PB-SEA), preparação antigênica de vermes adultos (PB-SWAP) ou PPD (PB-PPD) para avaliação da formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*. Os resultados estão expressos como número de células gigantes por campo e representam a média +/- desvio padrão de 04 experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #, @) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).



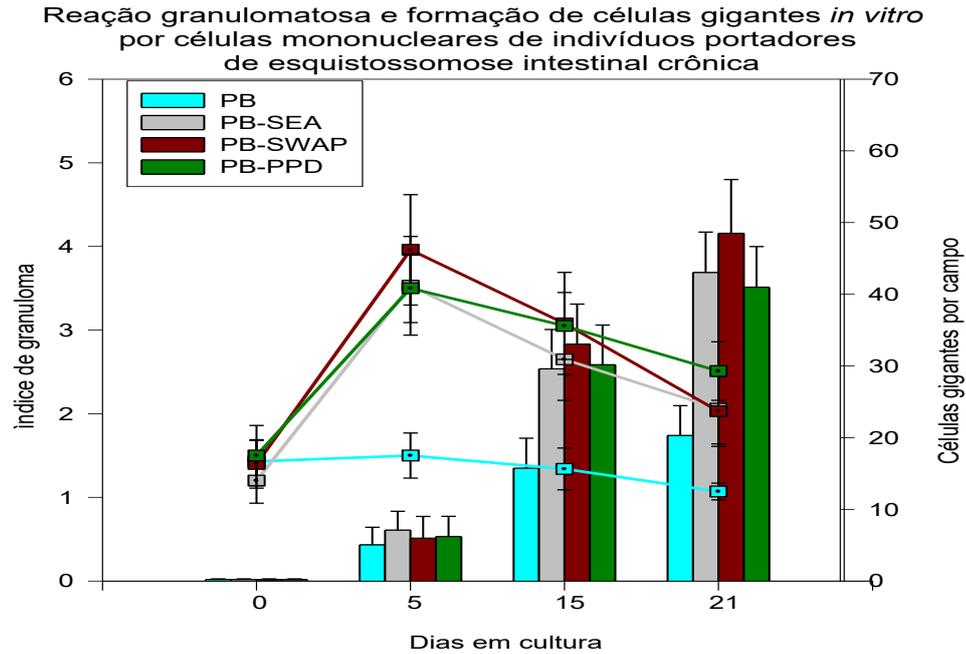
**Figura 13:** Efeito de sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos normais estimuladas com antígenos do *S. mansoni* sobre a taxa de fusão de monócitos *in vitro*. As células aderentes foram estimuladas com sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos normais, previamente foram estimuladas com microesferas de poliacrilamida (PB) conjugadas a antígeno solúvel do ovo do *S. mansoni* (PB-SEA), preparação antigênica de vermes adultos (PB-SWAP) ou PPD (PB-PPD) para avaliação da taxa de fusão dos monócitos. Os resultados estão expressos em porcentagem (%) de fusão e representam a média +/- desvio padrão de 04 experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #, @) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

## 5.2- Imunorregulação da resposta do hospedeiro aos antígenos do *S. mansoni*.

5.2.1- “A intensidade de formação do granuloma *in vitro* por células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos é inversamente proporcional à formação de células gigantes multinucleadas.”

Realizamos um estudo cinético da reação granulomatosa *in vitro* e simultaneamente investigamos o processo de diferenciação de monócitos por um período de 21 dias em cultura. Os resultados obtidos mostram que o pico máximo de reatividade granulomatosa ocorre entre o 6º e o 12º dia de cultura e declina significativamente após este período, enquanto que neste mesmo período aumenta significativamente o número de células gigantes multinucleadas formadas por campo (figura 14). Verificamos a existência de uma correlação entre o aparecimento de um maior número de células gigantes por campo e uma redução dos índices de formação de granuloma *in vitro*. Estes resultados sugerem, inicialmente, que a formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* na esquistossomose humana poderia estar associada ao desenvolvimento de mecanismos imunorreguladores da resposta celular do hospedeiro aos antígenos do parasita.

Durante o desenvolvimento de uma resposta imunológica existem diversos pontos onde é teoricamente possível a ação de mecanismos imunorreguladores. A apresentação de antígenos é uma destas etapas consideradas essenciais à formação do granuloma e ao desenvolvimento de reações de proliferação celular. Dentro deste contexto, passamos a investigar a capacidade de apresentação de antígenos por células da linhagem monocítica/macrofágica em diversos graus de maturação e os seus efeitos sobre a regulação da resposta blastogênica na esquistossomose humana.

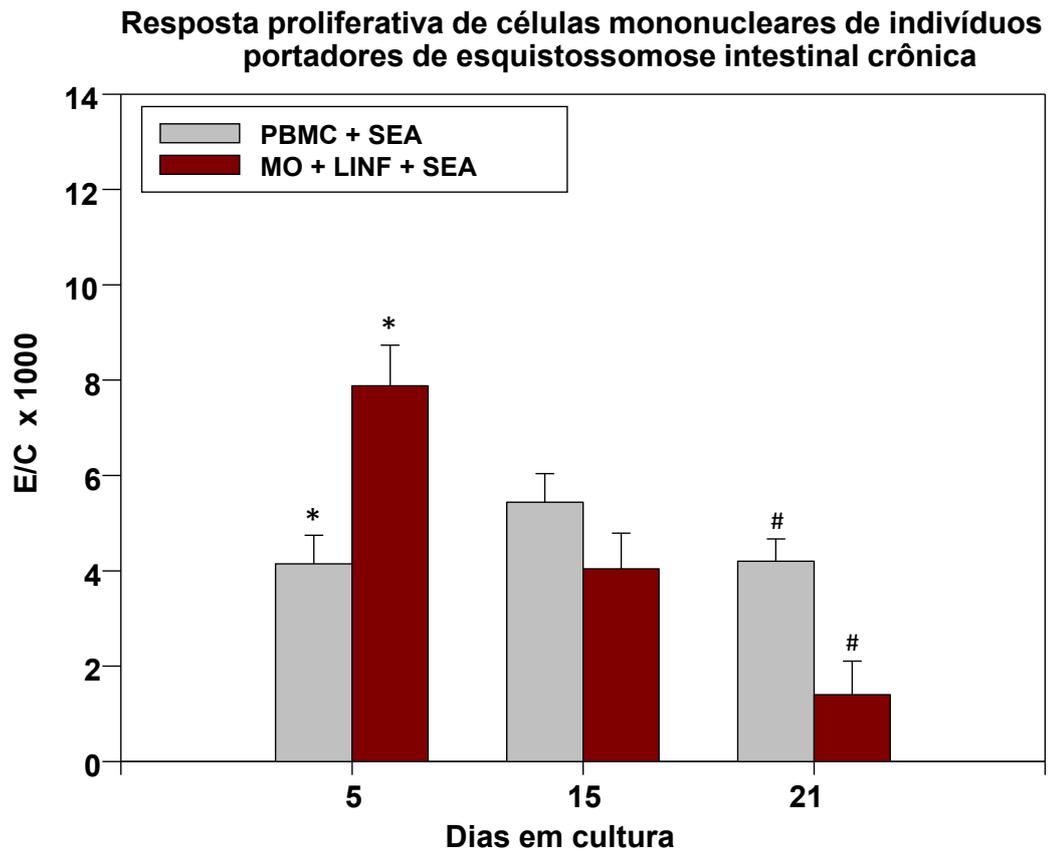


**Figura 14:** Cinética da reação granulomatosa e formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*. As células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos foram estimuladas com microesferas de poliacrilamida (PB) conjugadas a antígeno solúvel do ovo do *S. mansoni* (PB-SEA), preparação antigênica de vermes adultos (PB-SWAP) ou PPD (PB-PPD). Os resultados referentes à formação de granuloma *in vitro* (gráfico de barras) estão expressos em índice de granuloma (I.G.) e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 05 experimentos em triplicata. Os resultados referentes à formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* (gráfico de linhas) estão expressos em número de células gigantes formadas por campo e representam a média  $\pm$  desvio padrão de 05 experimentos em triplicata.

5.2.2- “Células gigantes multinucleadas apresentam uma menor capacidade de apresentação de antígenos do *S. mansoni* quando comparadas aos monócitos e macrófagos precursores.”

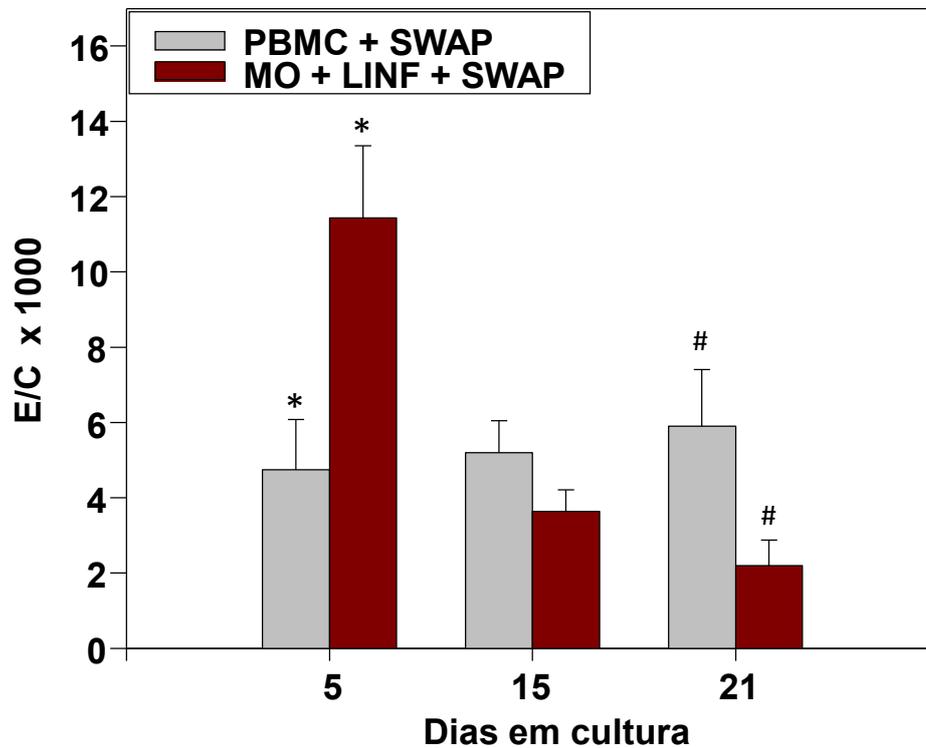
Avaliamos a capacidade de apresentação de antígenos de células da linhagem monocítica/macrofágica durante o processo de diferenciação *in vitro*. Monócitos obtidos do sangue periférico de indivíduos esquistossomóticos eram mantidos em cultura por períodos de tempo determinados (0, 5, 15 ou 21 dias). Ao final do período de tempo indicado, adicionamos linfócitos autólogos recém-coletados dos pacientes esquistossomóticos às células aderentes (macrófagos) que haviam permanecido em cultura, e realizamos o ensaio de proliferação celular (figuras 15 e 16). Os resultados obtidos mostram que macrófagos do 5<sup>o</sup> dia de cultura exibem uma maior capacidade de apresentação de antígenos do que monócitos recém-coletados do sangue periférico ( $p < 0,05$ ). No entanto, após este período, existe uma redução progressiva na capacidade de apresentação de antígenos pela população de células de origem monocítica/macrofágica no 15<sup>o</sup> dia de cultura e uma redução ainda mais acentuada no 21<sup>o</sup> dia ( $p < 0,05$ ). O perfil básico encontrado foi uma elevação da capacidade apresentadora de antígenos pelas células da linhagem monocítica/macrofágica até o 5<sup>o</sup> dia de diferenciação *in vitro* e uma posterior regressão a partir deste ponto (figuras 15 e 16).

Os resultados obtidos mostram que a imunorregulação da resposta de proliferação *in vitro* é dependente do grau de maturação das células da linhagem monocítica/macrofágica envolvidas no processo de apresentação de antígenos. Objetivando identificar os possíveis mecanismos envolvidos neste fenômeno de imunorregulação, passamos a avaliar a expressão de moléculas de superfície associadas à proliferação e ativação celulares (HLA-DR e moléculas de adesão) durante o processo de diferenciação *in vitro* das células da linhagem monocítica/macrofágica.



**Figura 15:** Capacidade de apresentação de antígenos solúveis do ovo do *Schistosoma mansoni* (SEA) por células da linhagem monocítica/macrofágica em diversos estágios de diferenciação. Células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos foram fracionadas em populações de linfócitos não aderentes (LINF) e monócitos/macrófagos aderentes (MO). Os monócitos e macrófagos foram mantidos em cultura por diferentes períodos de tempo (5, 15 e 21 dias em cultura) e co-cultivados por 5 dias na presença de SEA e de linfócitos não aderentes autólogos recém-coletados do sangue periférico para avaliação da resposta de proliferação celular (barras marrons). Células mononucleares totais não fracionadas (PBMC), obtidas do mesmo grupo de indivíduos infectados foram utilizadas como controle da resposta de proliferação celular (barras cinza). Os resultados estão expressos em E/C x 1000 e representam a média (c.p.m.) +/- desvio padrão de 04 experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

### Resposta proliferativa de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica



**Figura 16:** Capacidade de apresentação de antígenos solúveis do verme adulto do *Schistosoma mansoni* (SWAP) por células da linhagem monocítica/macrofágica em diversos estágios de diferenciação. Células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos foram fracionadas em populações de linfócitos não aderentes (LINF) e monócitos/macrófagos aderentes (MO). Os monócitos e macrófagos foram mantidos em cultura por diferentes períodos de tempo (5, 15 e 21 dias em cultura) e co-cultivados por 5 dias na presença de SWAP e de linfócitos não aderentes autólogos recém-coletados do sangue periférico para avaliação da resposta de proliferação celular (barras marron). Células mononucleares totais não fracionadas (PBMC), obtidas do mesmo grupo de indivíduos infectados foram utilizadas como controle da resposta de proliferação celular (barras cinza). Os resultados estão expressos em E/C x 1000 e representam a média (c.p.m.) +/- desvio padrão de 04 experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

### **5.3- Expressão de marcadores de superfície em células da linhagem monocítica/macrofágica durante o processo de diferenciação *in vitro*.**

5.3.1- “Durante o processo de diferenciação *in vitro* de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas existe uma diminuição na expressão de moléculas de HLA-DR de superfície.”

O padrão de expressão das moléculas do MHC de classe II (HLA-DR) durante o processo de diferenciação *in vitro* das células da linhagem monocítica/macrofágica foi avaliado utilizando citometria de fluxo (figura 17). Os resultados obtidos mostram que a população de células presente no 5º dia de cultura (constituída basicamente de macrófagos) apresenta um aumento na expressão das moléculas de HLA-DR de superfície quando comparada à população presente no tempo 0 de cultura (constituída basicamente de monócitos). A população de células presente no 15º dia de cultura (constituída basicamente de macrófagos e células gigantes multinucleadas) apresenta uma redução na expressão destas moléculas, sendo que a população encontrada no 21º dia (rica em células gigantes multinucleadas) apresentou uma redução ainda maior na expressão de HLA-DR de superfície. O perfil básico encontrado foi uma elevação da expressão de HLA-DR até o 5º dia e uma posterior regressão a partir deste ponto. Estes dados indicam que a redução na capacidade de apresentação de antígenos observada durante o processo de diferenciação *in vitro* de monócitos pode estar associado à modulação na expressão das moléculas de HLA-DR de superfície.

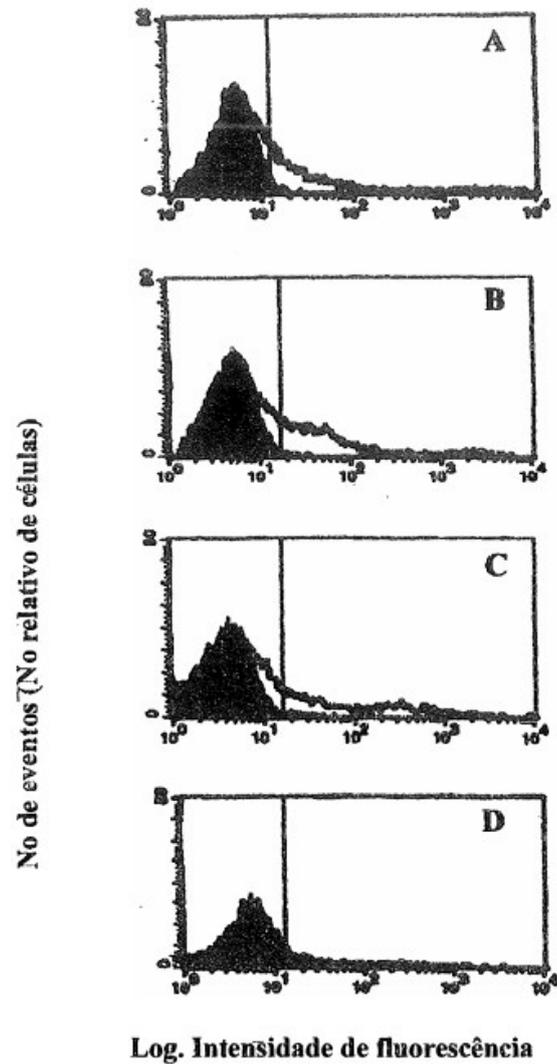


Figura 17: Expressão de moléculas de HLA-DR de superfície em células da linhagem monocítica/macrofágica em diferentes estágios de diferenciação avaliada por citometria de fluxo. Células aderentes obtidas de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica foram mantidas em cultura por 0 (A), 5 (B), 15 (C) e 21 dias (D).  $2 \times 10^5$  células foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-HLA-DR humano conjugado a isotiocianato de fluoresceína (histogramas claros) e analisadas em um citômetro de fluxo (Becton-Dickson FACScan Flowcytometer). Tubos controles (histogramas escuros) correspondem a células incubadas com anticorpos controle IgG também conjugados ao isotiocianato de fluoresceína. A figura mostra um experimento representativo de um total de quatro experimentos realizados.

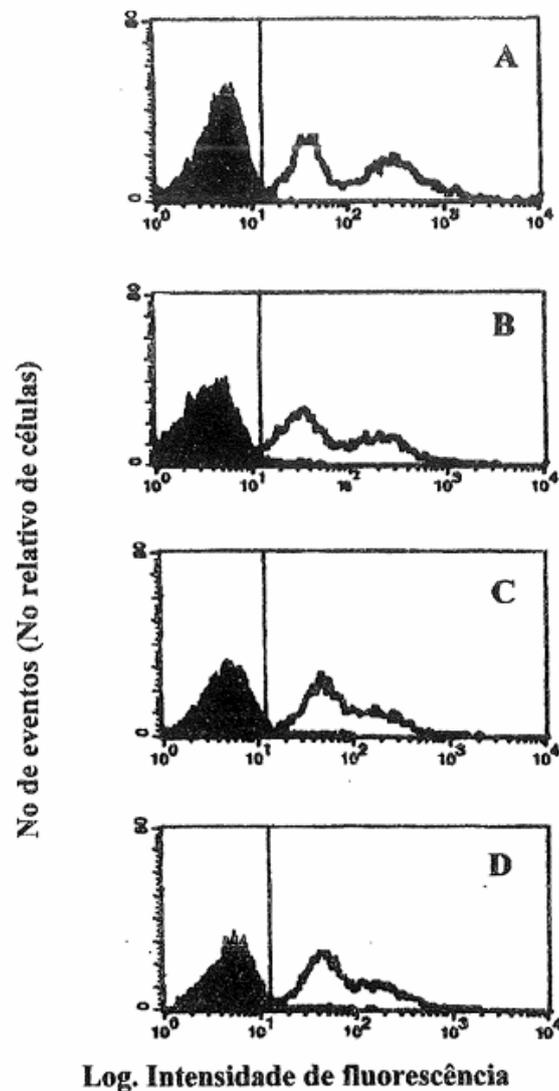
5.3.2- “A expressão da  $\beta$ -integrina (CD29) em células da linhagem monocítica/macrofágica mantém-se constante durante todo o processo de diferenciação de monócitos e formação de células gigantes *in vitro*.”

O padrão de expressão da molécula de adesão CD29 durante o processo de diferenciação de monócitos *in vitro* foi avaliado por citometria de fluxo (figura 18). Os resultados obtidos mostram que macrófagos de 5 dias apresentam expressão equivalente desta molécula se comparados a monócitos recém coletados de sangue periférico. A população celular presente no 15º e 21º dias de cultura também continua a expressar níveis similares de CD29. O perfil encontrado foi uma expressão praticamente constante de CD29 na superfície durante todo o processo de diferenciação *in vitro* das células da linhagem monocítica/macrofágica.

5.3.3- “Durante o processo de diferenciação de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* existe uma diminuição da expressão de ICAM-1”

O padrão de expressão da molécula de adesão ICAM-1 (CD54) durante o processo de diferenciação de monócitos *in vitro* foi avaliado por citometria de fluxo (figura 19). Os resultados obtidos mostram que a população de células presente no 5º dia de cultura apresenta uma maior expressão de ICAM-1 se comparados a monócitos recém coletados de sangue periférico. A população de células encontrada no 15º dia de cultura exibe uma redução na expressão destas moléculas de adesão, sendo que a população celular presente no 21º dia exibe uma redução ainda maior na expressão de ICAM-1 de superfície. O perfil básico encontrado foi uma elevação da expressão de ICAM-1 até o 5º dia e uma posterior regressão a partir deste ponto. Estes dados indicam que a redução na capacidade de apresentação de antígenos mostrada anteriormente durante o processo de diferenciação *in vitro* de monócitos também pode estar associada à modulação da expressão destas moléculas na superfície celular.

Nos experimentos anteriores demonstramos que as células gigantes multinucleadas formadas *in vitro* na esquistossomose humana podem participar da imunorregulação da resposta aos antígenos do *S. mansoni*. Neste bloco de experimentos foi demonstrado que a mudança na configuração fenotípica destas células (mudança na expressão de marcadores de superfície) durante o processo de diferenciação *in vitro*, pode ser um dos mecanismos através do qual os fenômenos de imunorregulação anteriormente descritos ocorrem. No próximo bloco de experimentos passamos a investigar as citocinas produzidas durante o desenvolvimento das respostas de proliferação celular e formação de granuloma *in vitro* na esquistossomose humana, na tentativa de conhecer os prováveis mediadores solúveis associados aos mecanismos de imunorregulação anteriormente descritos neste trabalho.



**Figura 18:** Expressão de moléculas de CD29 de superfície em células da linhagem monocítica/macrofágica em diferentes estágios de diferenciação avaliada por citometria de fluxo. Células aderentes obtidas de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica foram mantidas em cultura por 0 (A), 5 (B), 15 (C) e 21 dias (D).  $2 \times 10^5$  células foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD29 humano conjugado a isotiocianato de fluoresceína (histogramas claros) e analisadas em um citômetro de fluxo (Becton-Dickson FACScan Flowcytometer). Tubos controles (histogramas escuros) correspondem a células incubadas com anticorpos controle IgG também conjugados ao isotiocianato de fluoresceína. A figura mostra um experimento representativo de um total de quatro experimentos realizados.

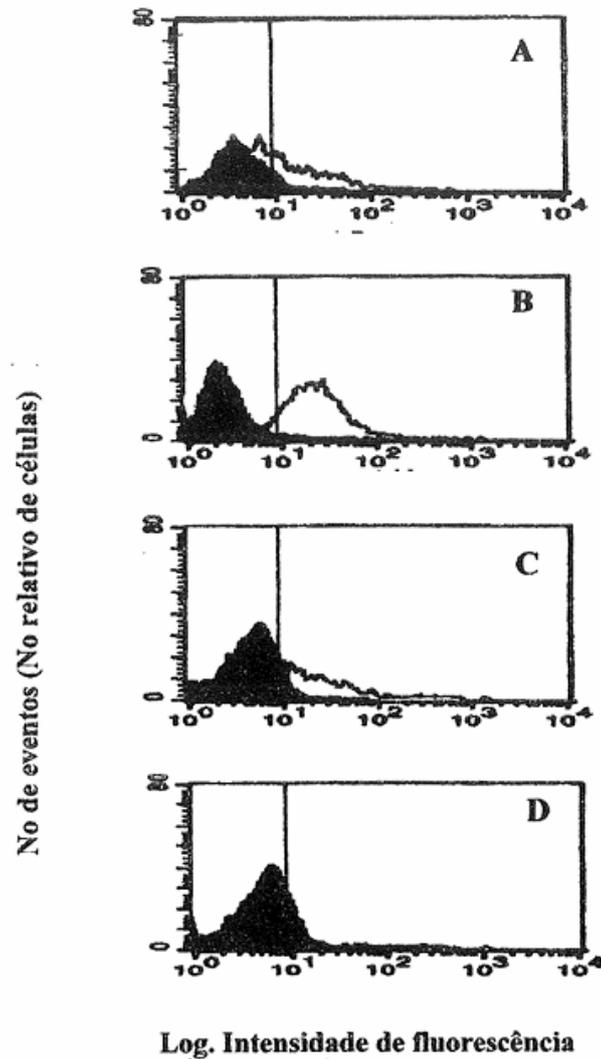


Figura 19: Expressão de moléculas de CD54 de superfície em células da linhagem monocítica/macrofágica em diferentes estágios de diferenciação avaliada por citometria de fluxo. Células aderentes obtidas de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica foram mantidas em cultura por 0 (A), 5 (B), 15 (C) e 21 dias (D).  $2 \times 10^5$  células foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-CD54 humano conjugado a isotiocianato de fluoresceína (histogramas claros) e analisadas em um citômetro de fluxo (Becton-Dickson FACScan Flowcytometer). Tubos controles (histogramas escuros) correspondem a células incubadas com anticorpos controle IgG também conjugados ao isotiocianato de fluoresceína. A figura mostra um experimento representativo de um total de quatro experimentos realizados.

#### 5.4- Identificação de citocinas produzidas *in vitro* por células mononucleares em resposta aos antígenos solúveis do *S. mansoni*

5.4.1- “Células mononucleares de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica estimuladas com PHA produzem citocinas tanto do tipo Th<sub>1</sub> quanto do tipo Th<sub>2</sub>”

Investigamos a produção de citocinas por células mononucleares de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica estimuladas por 48 horas com PHA. Os resultados referentes a produção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  encontram-se na figura 20. Os dados obtidos mostram que a estimulação mitogênica é capaz de induzir a uma produção irrestrita de todas as citocinas investigadas. É interessante notar também que a IL-10 e o TNF- $\alpha$  são produzidos pelas células mesmo na ausência da estimulação mitogênica. Após a identificação do perfil de citocinas secretado pela estimulação com PHA, investigamos a produção *in vitro* de citocinas por células mononucleares estimuladas com antígenos do *S. mansoni*.

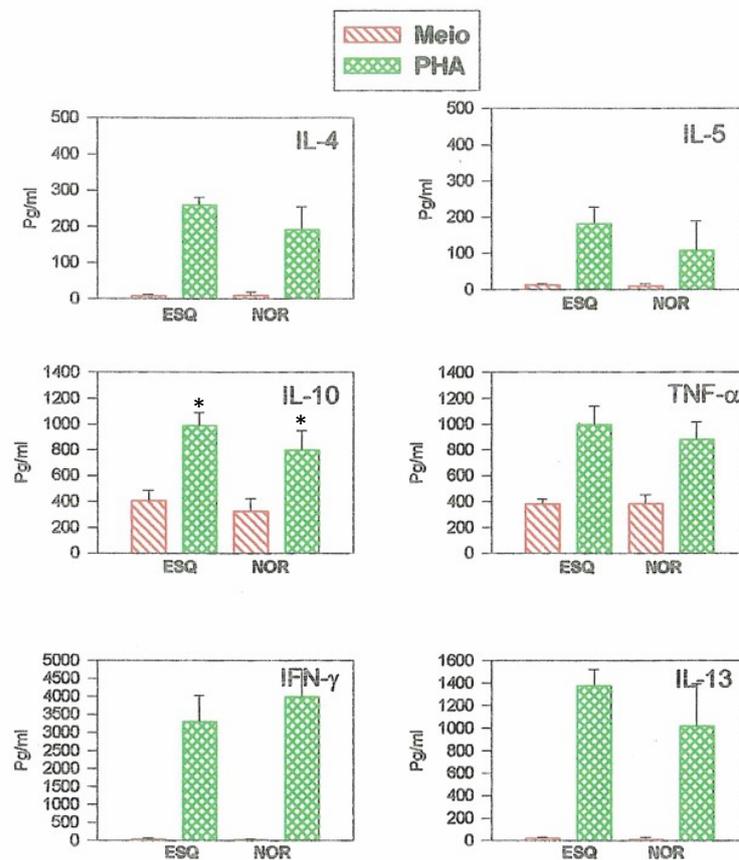


Figura 20: Produção de citocinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) por células mononucleares após estimulação com PHA. As células mononucleares de indivíduos normais (NOR) e portadores de esquistossomose intestinal crônica (ESQ) foram estimuladas por 24 horas com 2  $\mu$ g de PHA por cavidade e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação das citocinas por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de cada citocina por mililitro e representam a média  $\pm$  desvio padrão de oito experimentos em duplicata. As barras com símbolos iguais (\*) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

5.4.2- “Células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica não produzem níveis significativos de IL-4 após estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni*”

Avaliamos a produção *in vitro* de IL-4 por células mononucleares de indivíduos normais e portadores de esquistossomose intestinal crônica após estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni*. Os resultados obtidos mostram que as células mononucleares de indivíduos normais e infectados não foram capazes de induzir a produção *in vitro* de níveis significativos de IL-4 em nenhum dos períodos de tempo avaliados (figura 21).

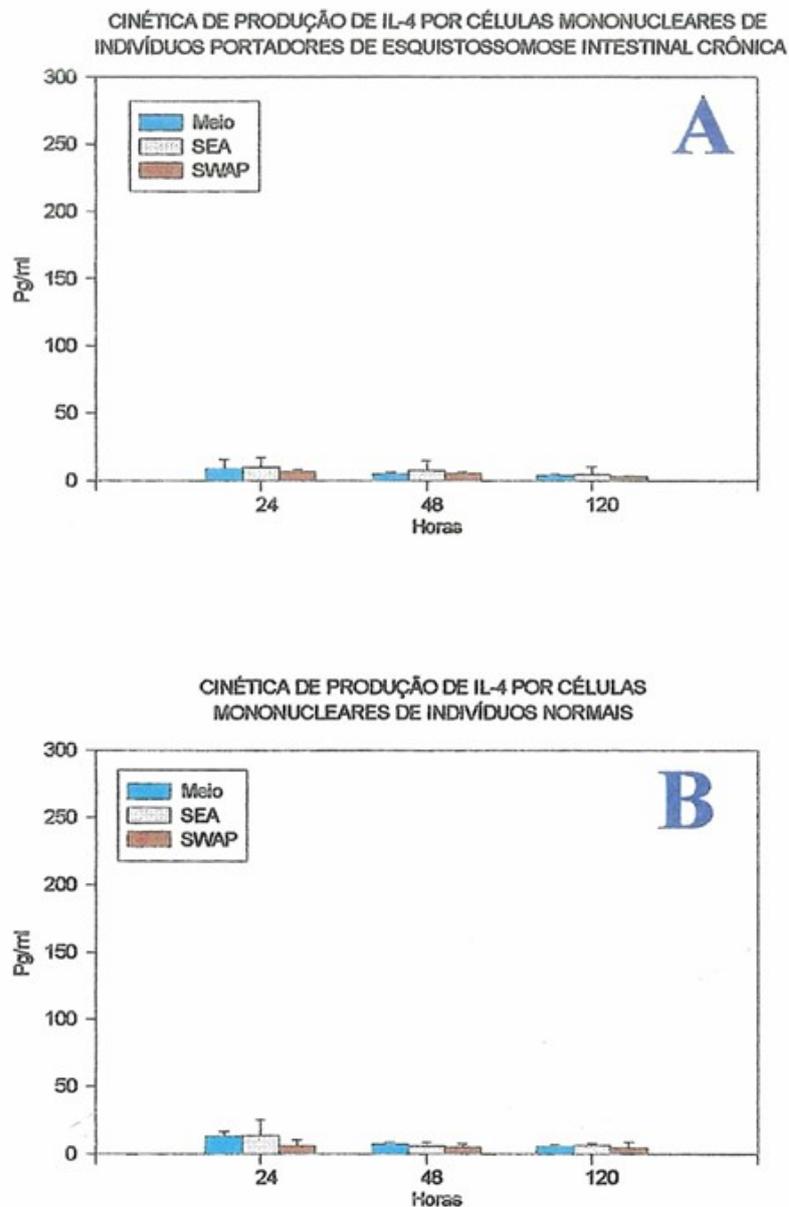


Figura 21: Produção de IL-4 por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com meio, SEA ou SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de IL-4 por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de IL-4 .por mililitro e representam a média +/- desvio padrão de oito experimentos em duplicata

5.4.3- "Células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica estimuladas com antígenos solúveis do *S. mansoni* produzem níveis significativos de IL-5 somente após 120 horas de cultura"

Avaliamos a cinética de produção de IL-5 por células mononucleares de indivíduos normais e portadores de esquistossomose intestinal crônica após a estimulação *in vitro* com antígenos solúveis do *S. mansoni*. Os resultados obtidos (figura 22) mostram que somente no 5º dia de cultura foi possível detectar a presença de níveis significativos de IL-5 após a estimulação com antígenos solúveis do parasita.

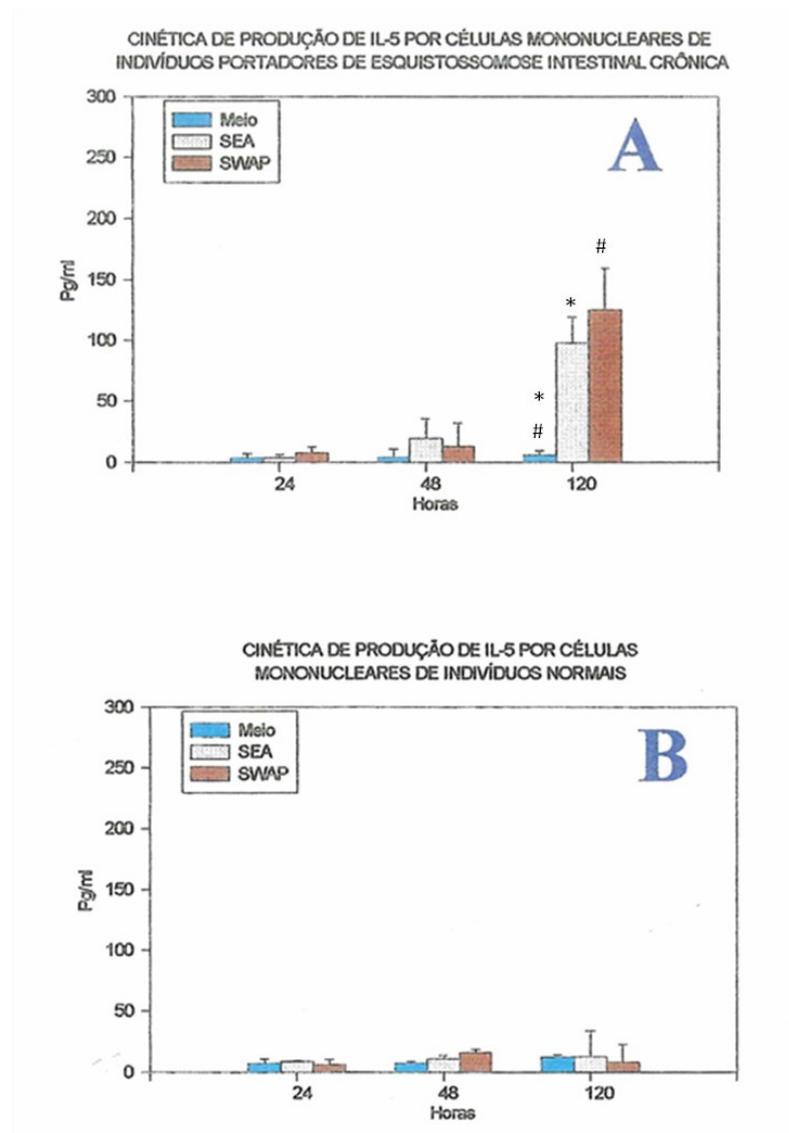


Figura 22: Produção de IL-5 por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com meio, SEA ou SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de IL-5 por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de IL-5 por mililitro e representam a média  $\pm$  desvio padrão de oito experimentos em duplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

5.4.4- “A estimulação *in vitro* de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica com antígenos solúveis do *S. mansoni* induz a produção de altos níveis de IL-10 que decrescem com o passar do tempo em cultura”

Avaliamos a produção de IL-10 por células mononucleares de indivíduos normais e portadores de esquistossomose intestinal crônica estimuladas com antígenos solúveis do *S. mansoni*. Os resultados obtidos mostram que a estimulação com SEA e SWAP induzem aumentos estatisticamente significativos da produção de IL-10 pelas células de indivíduos infectados ( $p < 0,05$ ) mas não por células de indivíduos normais (figura 23). As concentrações de IL-10 estimuladas por antígenos decrescem com o passar do tempo em cultura, sendo que no 5º dia não existem mais diferenças significativas em relação ao controle onde não foram adicionados antígenos do *S. mansoni*.

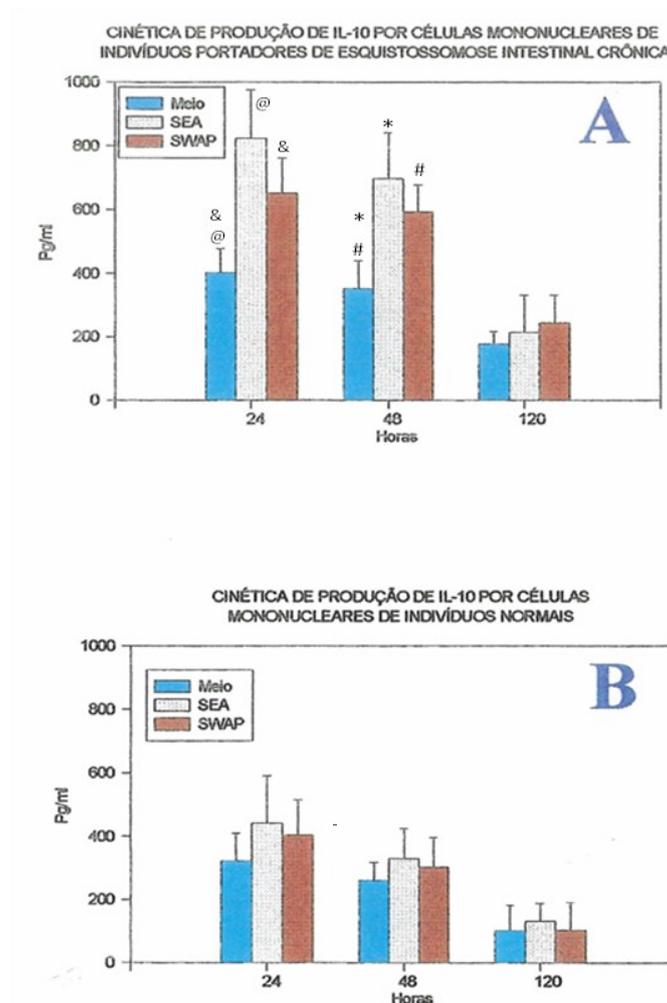


Figura 23: Produção de IL-10 por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com meio, SEA ou SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de IL-10 por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de IL-10 por mililitro e representam a média  $\pm$  desvio padrão de oito experimentos em duplicata. As barras com símbolos iguais (\*#, @, &) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

5.4.5- “Células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica com antígenos solúveis do *S. mansoni* produzem níveis significativos de IL-13 somente após 120 horas de cultura”

A IL-13 foi quantificada nos sobrenadantes de cultura de células de indivíduos normais e portadores de esquistossomose intestinal crônica que foram estimuladas por antígenos solúveis do *S. mansoni*. Os resultados obtidos (figura 24) para células de indivíduos esquistossomóticos mostram um perfil semelhante ao observado na produção de IL-5. A presença de IL-13 somente foi detectada em níveis significativos apenas no 5º dia de cultura ( $p < 0,05$ ).

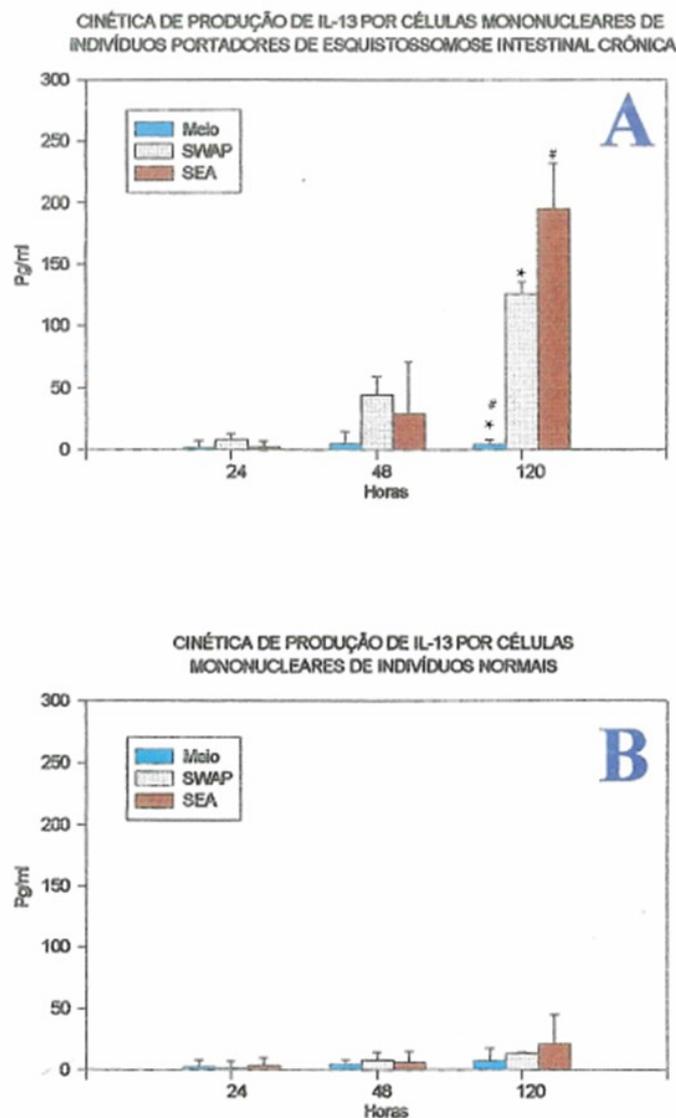


Figura 24: Produção de IL-13 por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com meio, SEA ou SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de IL-13 por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de IL-13 por mililitro e representam a média  $\pm$  desvio padrão de oito experimentos. As barras com símbolos iguais (\*, #) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ )

5.4.6- “A produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica após estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni* é detectada somente no 5º dia de cultura”

Avaliamos a produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares de indivíduos normais e portadores de esquistossomose intestinal crônica após estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni*. Os resultados obtidos (figura 25) para as células de indivíduos esquistossomóticos, mostram um perfil semelhante à produção de IL-5 e IL-13 onde a produção de IFN- $\gamma$  somente é detectada em níveis significativos no 5º dia de cultura.

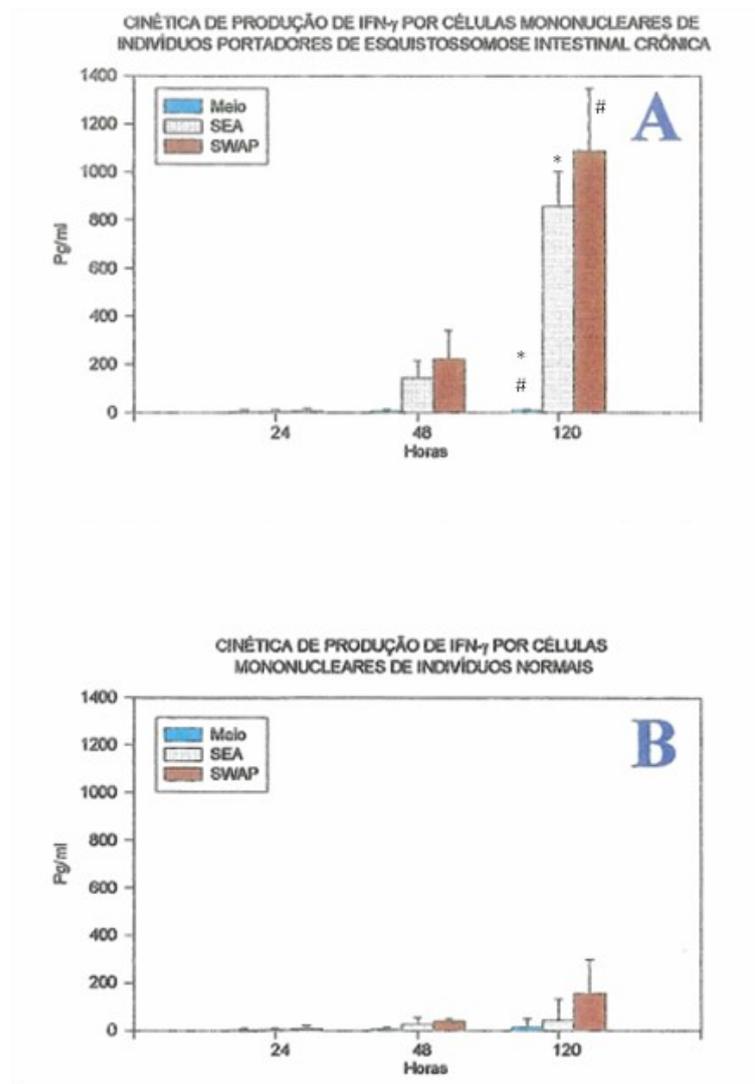


Figura 25: Produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com meio, SEA ou SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de IFN- $\gamma$  por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de IFN- $\gamma$  por mililitro e representam a média  $\pm$  desvio padrão de oito experimentos em duplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ )

5.4.7- “A estimulação *in vitro* de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica com antígenos solúveis do *S. mansoni* induz à produção de TNF $\alpha$ .”

Avaliamos a produção de TNF $\alpha$  por células mononucleares de indivíduos infectados após a estimulação com antígenos do parasita. Os resultados obtidos mostram que existe um aumento na produção de TNF $\alpha$  ( $p < 0,05$ ) por células mononucleares de indivíduos infectados após estimulação com antígenos solúveis do parasita (figura 26). As células mononucleares de indivíduos normais não elevam significativamente à sua produção de TNF $\alpha$ . após à estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni*.

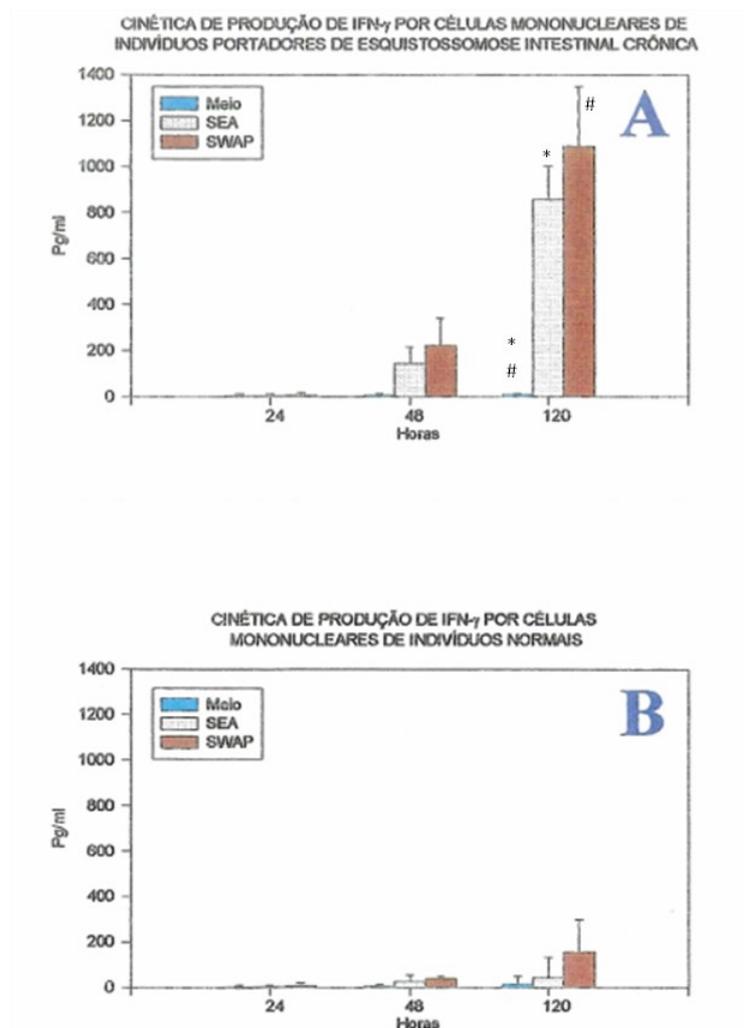


Figura 26: Produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleares após estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com meio, SEA ou SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de TNF- $\alpha$  por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de TNF- $\alpha$  por mililitro e representam a média  $\pm$  desvio padrão de oito experimentos em duplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ )

Os resultados obtidos pela estimulação com antígenos solúveis do *Schistosoma mansoni* mostram a existência de um padrão bastante complexo de produção de citocinas na esquistossomose humana, tanto pelo tipo de citocinas quanto pela sequência em que são produzidas. Os resultados do primeiro bloco deste trabalho mostraram que o desenvolvimento de reações granulomatosas *in vitro* é capaz de afetar o processo de diferenciação de monócitos e macrófagos e elevar a formação de células gigantes multinucleadas. O próximo grupo de experimentos investigou as citocinas produzidas nestas reações granulomatosas *in vitro*.

### **5.5- Identificação de citocinas produzidas por células mononucleares durante a formação de granuloma *in vitro* em resposta aos antígenos imobilizados do *S. mansoni*.**

5.5.1- “O desenvolvimento de reações granulomatosas *in vitro* possuem um perfil distinto de produção de citocinas quando comparado ao modelo da resposta blastogênica com estimulação por antígenos solúveis”

As citocinas produzidas pelas células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos estimuladas pelos antígenos do *S. mansoni* durante os ensaios de formação de granuloma *in vitro* foram avaliadas (figuras 27 a 32). Os resultados obtidos mostram um perfil distinto de produção de citocinas para cada modelo experimental investigado (blastogênese ou formação de granuloma *in vitro*).

5.5.2- “Células mononucleares de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica não produzem IL-4 durante a reação de formação de granuloma *in vitro*”

Avaliamos a produção de IL-4 por células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica após estimulação com PB, PB-SEA e PB- SWAP. Os resultados obtidos mostram que não foi detectada a produção de níveis significativos de IL-4 pelas células mononucleares de indivíduos normais e infectados durante o desenvolvimento das reações de formação de granuloma *in vitro* (figura 27).

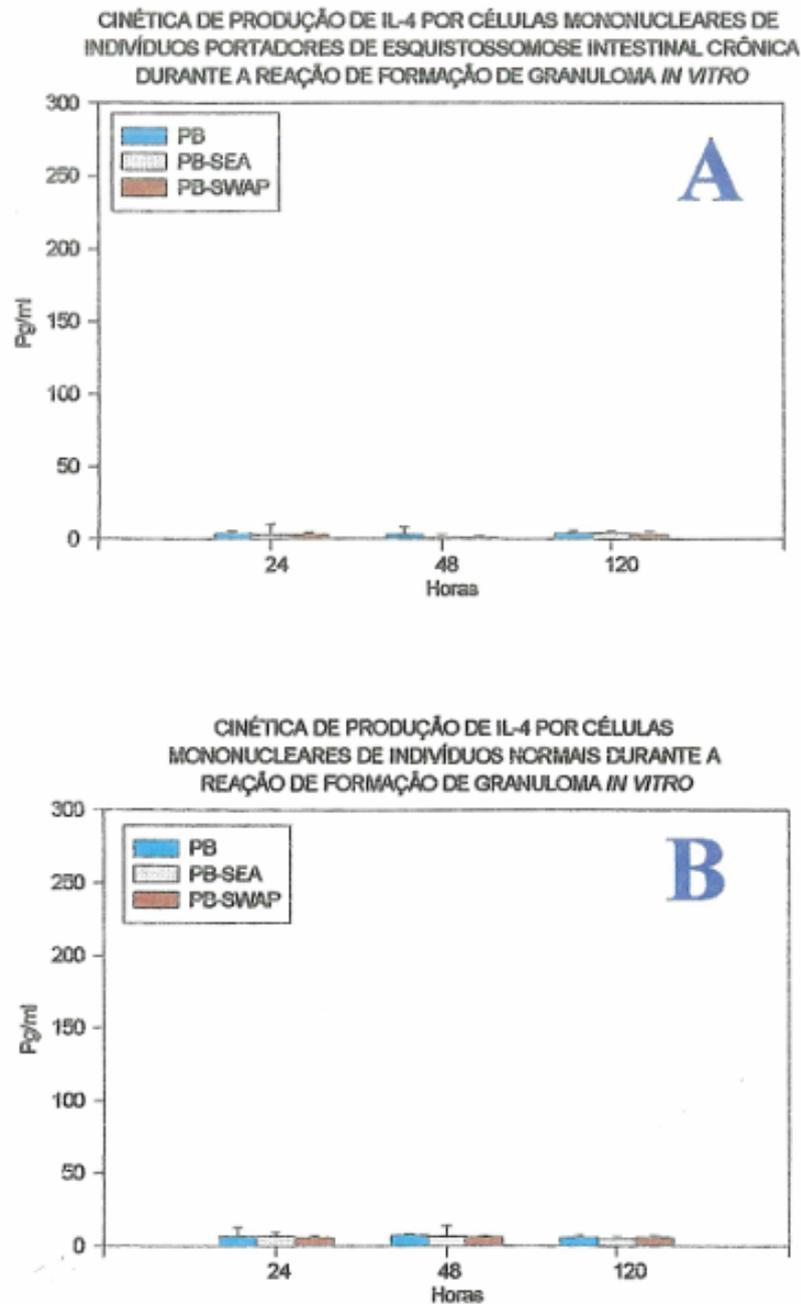


Figura 27: Produção de IL-4 por células mononucleares durante a formação de granuloma *in vitro*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com PB, PB-SEA ou PB-SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de IL-4 por ELISA. Foi utilizada curva padrão obtida com quantidades conhecidas de IL-4 recombinante para o cálculo das concentrações de IL-4 presentes nos sobrenadantes de cultura. Os resultados estão expressos em picogramas de IL-4 por mililitro e representam a média  $\pm$  desvio padrão de oito experimentos em duplicata.

5.5.3- "O desenvolvimento da reação granulomatosa *in vitro* não leva a produção de IL-5 pelas células mononucleares estimuladas com PB-SEA e PB-SWAP."

Ao contrário do anteriormente observado para a estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni*, não foi detectada a produção de níveis significativos de IL-5 pelas células mononucleares durante o desenvolvimento das reações de formação de granuloma *in vitro* após a estimulação com PB-SEA e PB-SWAP (figura 28).

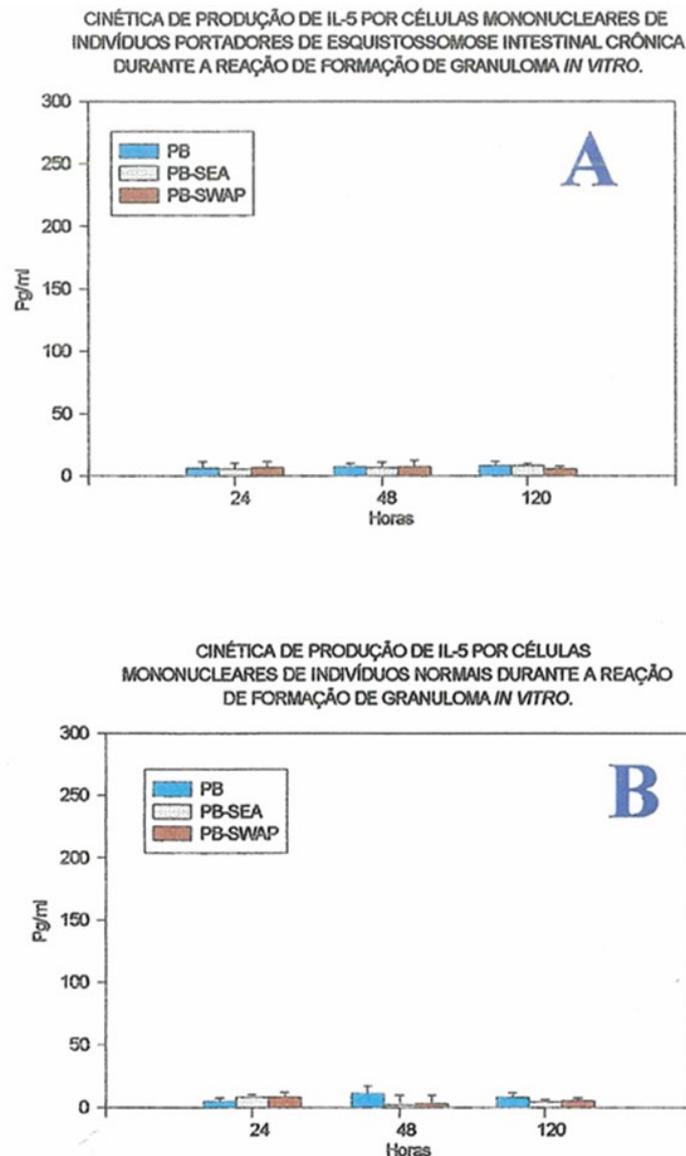


Figura 28: Produção de IL-5 por células mononucleares durante a reação de formação de granuloma *in vitro*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com PB, PB-SEA ou PB-SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de IL-5 por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de IL-5 por mililitro e representam a média  $\pm$  desvio padrão de oito experimentos em duplicata.

5.5.4- “Os níveis de produção de IL-10 durante desenvolvimento da reação granulomatosa *in vitro* são significativamente inferiores aos níveis detectados pela estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni* em ensaios blastogênicos”.

Avaliamos a produção de IL-10 por células mononucleares de indivíduos normais e portadores de esquistossomose intestinal crônica após estimulação com PB, PB-SEA e PB-SWAP. As células mononucleares de indivíduos normais e infectados não elevam a produção de IL-10 durante as reações de formação de granuloma *in vitro* (figura 29). Os resultados mostram, na realidade, uma redução da produção de IL-10 por células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica após estimulação com PB-SEA e PB-SWAP.

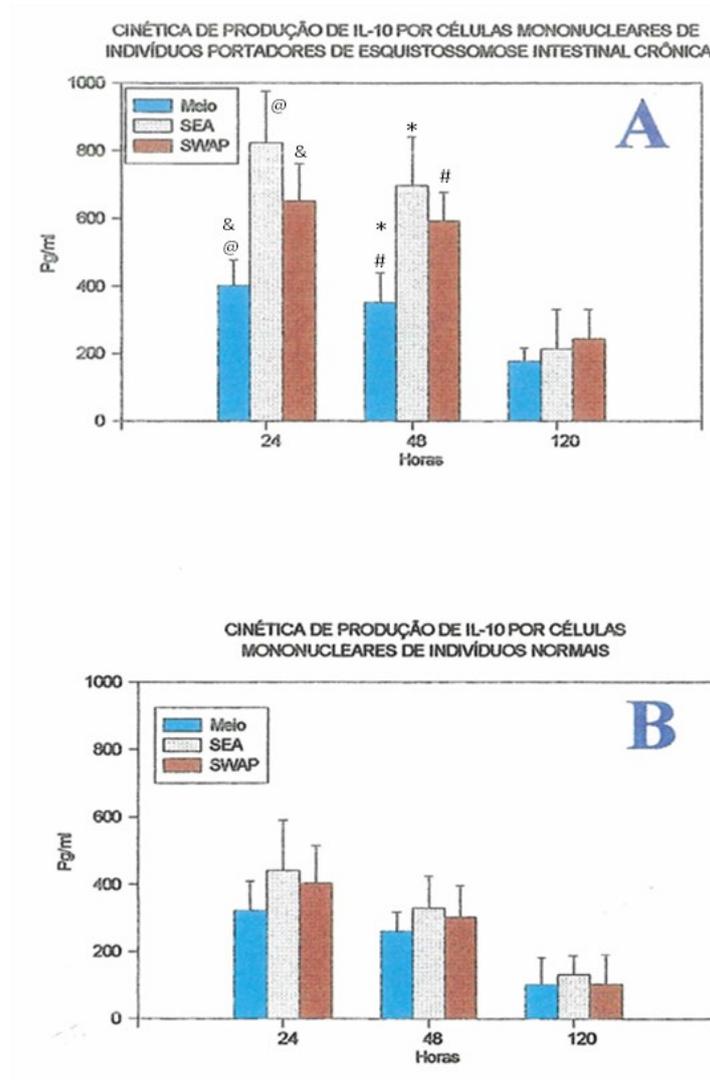


Figura 29: Produção de IL-10 por células mononucleares durante a reação de formação de granuloma *in vitro*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com PB, PB-SEA ou PB-SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de IL-10 por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de IL-10 por mililitro e representam a média  $\pm$  desvio padrão de oito experimentos em duplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #, @, &) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

5.5.5- "O desenvolvimento da reação granulomatosa *in vitro* não leva à produção de IL-13 pelas células mononucleares após estimulação com PB-SEA ou PB- SWAP."

A IL-13 foi quantificada nos sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos normais e portadores de esquistossomose intestinal crônica, durante as reações de formação de granuloma *in vitro* estimuladas por PB, PB-SEA ou PB- SWAP. Não foi detectado a produção estatisticamente significativa de IL-13 em nenhum dos períodos de tempo investigados (figura 30).

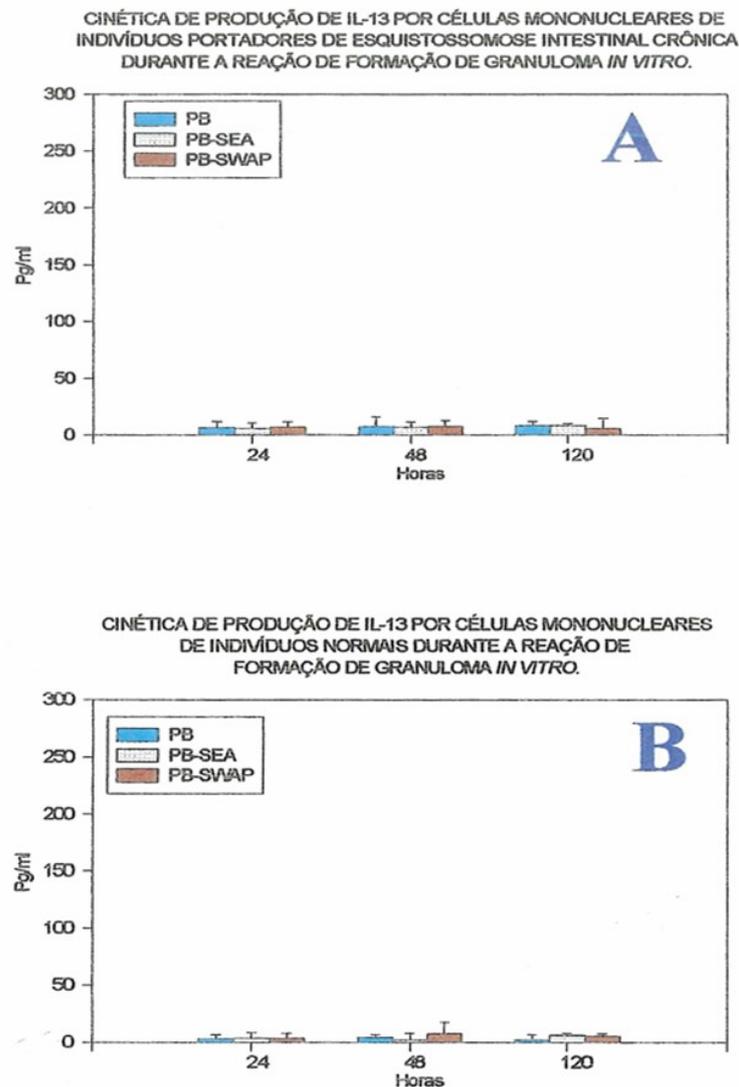


Figura 30: Produção de IL-13 por células mononucleares durante a reação de formação de granuloma *in vitro*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com PB, PB-SEA ou PB-SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de IL-13 por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de IL-13 por mililitro e representam a média  $\pm$  desvio padrão de oito experimentos em duplicata

5.5.6- “O processo de formação de granuloma *in vitro* estimulado por PB-SEA ou PB-SWAP induz à produção de IFN- $\gamma$ .

Avaliamos a produção de IFN- $\gamma$  durante o processo de formação de granuloma *in vitro* por células mononucleares de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*. Os resultados obtidos mostram que não existe uma produção de IFN- $\gamma$  durante os períodos iniciais do processo de formação de granuloma *in vitro*. Todavia, no 5º dia da reação granulomatosa *in vitro*, passamos a detectar a produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares de indivíduos infectados estimuladas por antígenos do parasita conjugados à microesferas de poliacrilamida (figura 31).

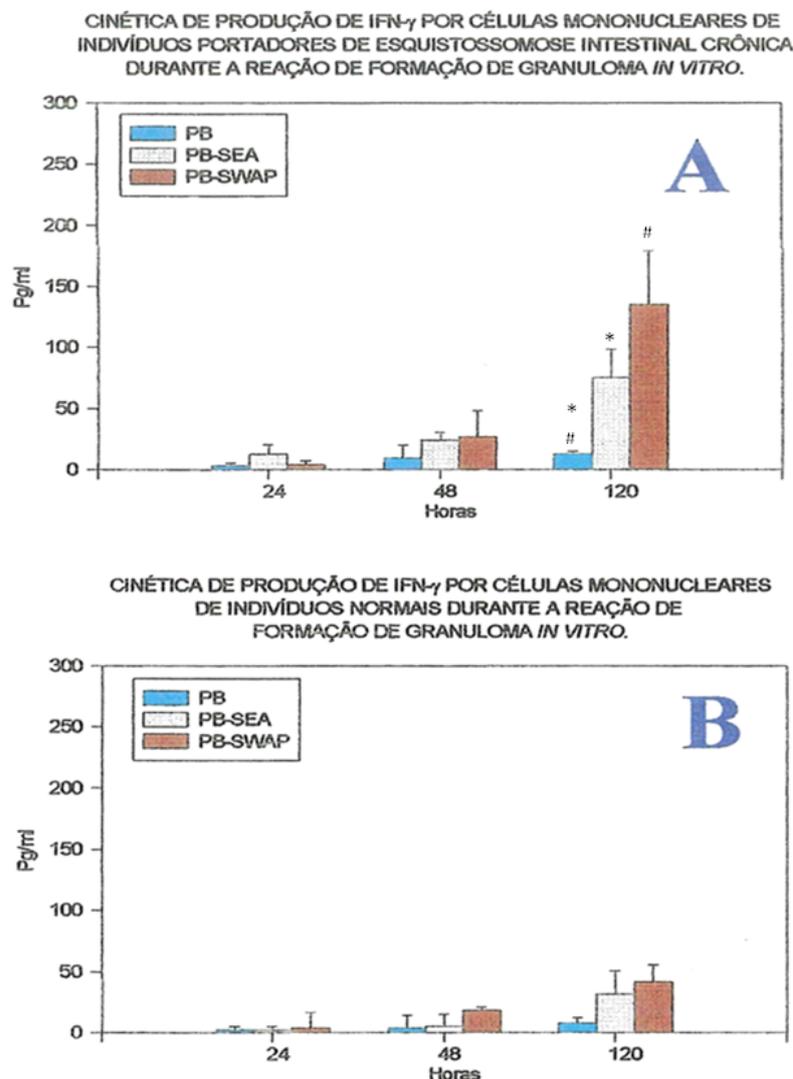


Figura 31: Produção de IFN- $\gamma$  por células mononucleares durante a reação de formação de granuloma *in vitro*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com PB, PB-SEA ou PB-SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de IFN- $\gamma$  por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de IFN- $\gamma$  por mililitro e representam a média  $\pm$  desvio padrão de oito experimentos em duplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

5.5.7- “O processo de formação de granuloma *in vitro* ao redor de microesferas conjugadas aos antígenos do *S. mansoni* envolve a produção de TNF- $\alpha$ .”

A produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleares após estimulação com PB, PB-SEA ou PB-SWAP foi avaliada (figura 32). Os resultados mostram uma elevada produção de TNF- $\alpha$  pelas células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica após estimulação com PB-SEA ou PB-SWAP, sugerindo um papel importante para esta citocina no processo de formação das reações granulomatosas na esquistossomose humana.

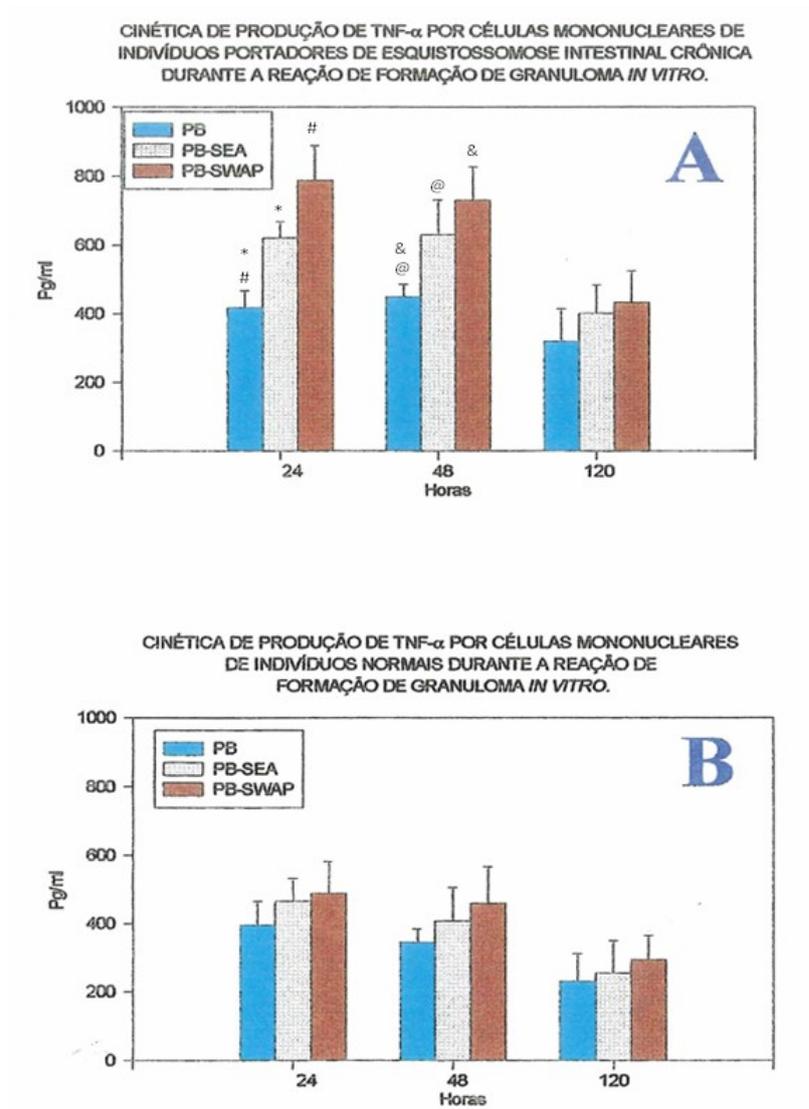


Figura 32: Produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleares durante a reação de formação de granuloma *in vitro*. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (A) ou de indivíduos normais (B) foram estimuladas com PB, PB-SEA ou PB-SWAP e os sobrenadantes de cultura coletados para quantificação de TNF- $\alpha$  por ELISA. Os resultados estão expressos em picogramas de TNF- $\alpha$  por mililitro e representam a média $\pm$  desvio padrão de oito experimentos em duplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #, @, &) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ )

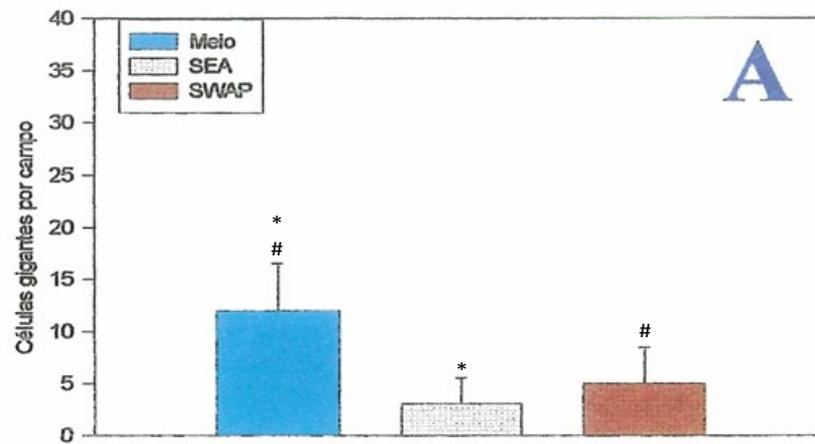
Existem poucos estudos realizados na esquistossomose mansoni humana envolvendo a investigação da produção de citocinas. Os resultados obtidos revelam um padrão complexo de produção de citocinas na esquistossomose humana e trazem uma maior compreensão dos mecanismos associados a imunorregulação da resposta aos antígenos do *S. mansoni* que foram descritos anteriormente neste trabalho. Os resultados obtidos também revelam um perfil diferenciado de produção de citocinas para cada modelo experimental investigado (blastogênese ou formação de granuloma *in vitro*). No próximo bloco, investigamos quais seriam os efeitos desta reatividade diferencial sobre várias funções de monócitos e macrófagos, tais como: atividade metabólica, diferenciação celular, produção de monocinas e capacidade de formação de granuloma *in vitro*.

#### **5.6- Consequências do desenvolvimento da resposta aos antígenos do *S. mansoni* sobre as funções de monócitos e macrófagos *in vitro*.**

5.6.1- “A estimulação de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica com antígenos solúveis do *S. mansoni* inibe a formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*.”

Ao contrário dos efeitos observados anteriormente quando as células mononucleares de indivíduos infectados foram estimuladas com PB-SEA e PB-SWAP, a estimulação destas células com antígenos solúveis do *S. mansoni* inibe a formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* (figura 33).

EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE INTESTINAL CRÔNICA COM SEA OU SWAP SOLÚVEIS SOBRE A FORMAÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS *IN VITRO*



EFEITO DA ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE INTESTINAL CRÔNICA COM PB, PB-SEA OU PB-SWAP SOBRE A FORMAÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS *IN VITRO*.

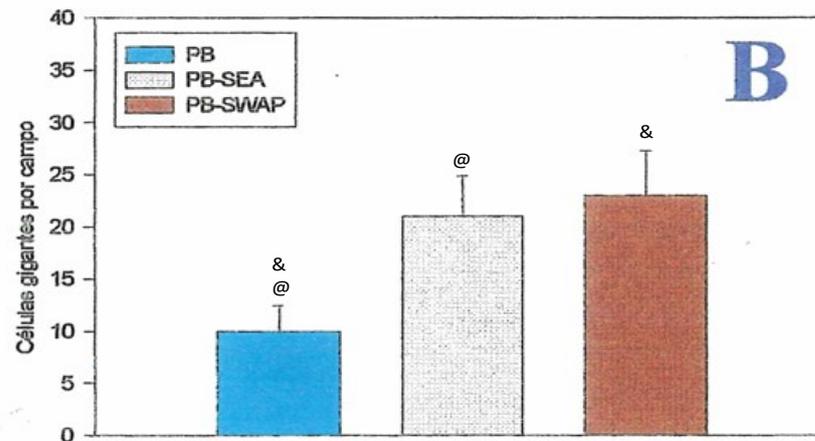
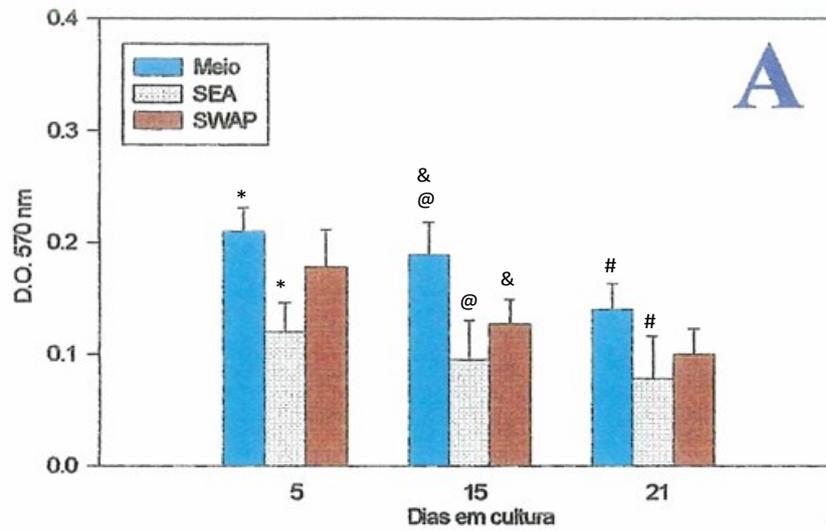


Figura 33: Formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* após a estimulação de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica com antígenos solúveis do *S. mansoni* ou com antígenos imobilizados em microesferas de poliacrilamida. As células mononucleares ( $1 \times 10^6$ ) foram estimuladas com antígenos solúveis do *S. mansoni* (A) ou imobilizados em microesferas de poliacrilamida (B) e o número de células gigantes formadas por campo foi avaliado após 21 dias de cultura conforme descrito anteriormente em material e métodos. Os resultados estão expressos em número de células gigantes por campo e representam a médias  $\pm$  dp de 05 experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #, @, &) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

5.6.2- “A estimulação com PB-SEA e PB-SWAP aumenta, enquanto que a estimulação com SEA e SWAP solúveis reduz, a metabolização de MTT por células mononucleares de indivíduos portadores esquistossomose intestinal crônica.”

Investigamos a metabolização de MTT utilizando estimulação com antígenos solúveis (modelo da blastogênese) ou antígenos conjugados a microesferas de poliacrilamida (modelo de formação do granuloma *in vitro*). No modelo de formação de granuloma *in vitro*, a metabolização de MTT no 5<sup>o</sup> dia de cultura ainda não revela diferenças estatisticamente significativas entre as células estimuladas com PB-SEA e PB-SWAP quando comparadas ao controle PB. Entretanto, somente a partir do 15<sup>o</sup> dia de cultura em diante, passam a existir diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) quanto a esta atividade metabólica entre as células estimuladas antigenicamente e os controles (figura 34). Ao contrário do observado para os antígenos imobilizados, a estimulação com SEA e SWAP solúveis inibe a metabolização de MTT por células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica (figura 34).

CINÉTICA DE METABOLIZAÇÃO DE MTT POR CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE INTESTINAL CRÔNICA ESTIMULADAS COM SEA OU SWAP SOLÚVEIS.



CINÉTICA DE METABOLIZAÇÃO DE MTT POR CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE INTESTINAL CRÔNICA ESTIMULADAS COM PB-SEA OU PB-SWAP.

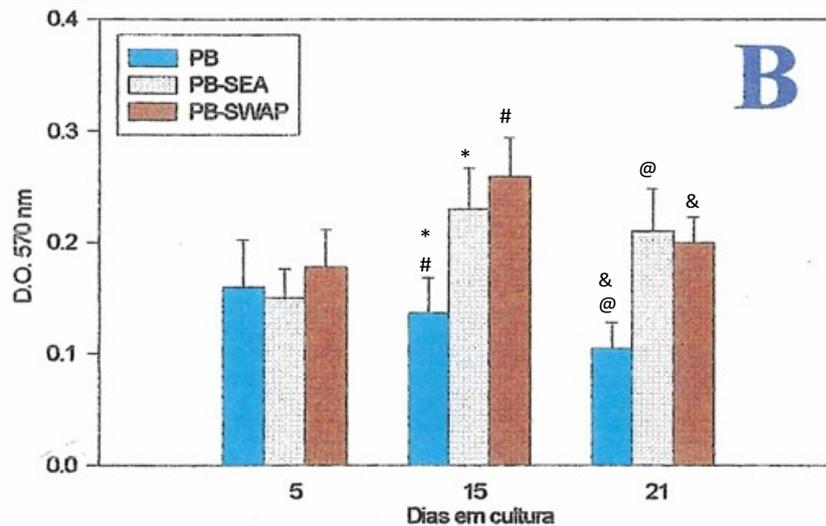


Figura 34: Metabolização de MTT por células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica após estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni* ou com antígenos imobilizados em microesferas de poliacrilamida. Células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) foram estimuladas com antígenos solúveis do *S. mansoni* (A) ou com antígenos imobilizados em microesferas de poliacrilamida (B) para a avaliação da metabolização de MTT conforme descrito anteriormente em material e métodos. Os resultados estão expressos em D.O. (570 nm) e representam a média  $\pm$  dp de 05 experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #, @, &) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

5.6.3- “Células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos entram em proliferação após a estimulação com antígenos solúveis do *S mansoni*, mas não apresentam resposta proliferativa frente a estimulação com antígenos do parasita conjugados à microesferas de poliacrilamida.”

Os efeitos de antígenos solúveis sobre células mononucleares são geralmente avaliados em ensaios blastogênicos. Por outro lado, a reatividade diferencial anteriormente observada nos levou a investigar quais seriam os tipos de resposta (entrada ou não em proliferação celular) após a estimulação com antígenos do parasita imobilizados em microesferas de poliacrilamida. Como controle paralelo dos experimentos foram realizados ensaios blastogênicos utilizando antígenos solúveis do parasita e células mononucleares dos mesmos indivíduos infectados. Os resultados obtidos mostraram que a estimulação de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos com PB-SEA ou PB-SWAP não induz a resposta de proliferação celular (figura 35), indicando que os dois modelos *in vitro* avaliam fenômenos distintos.

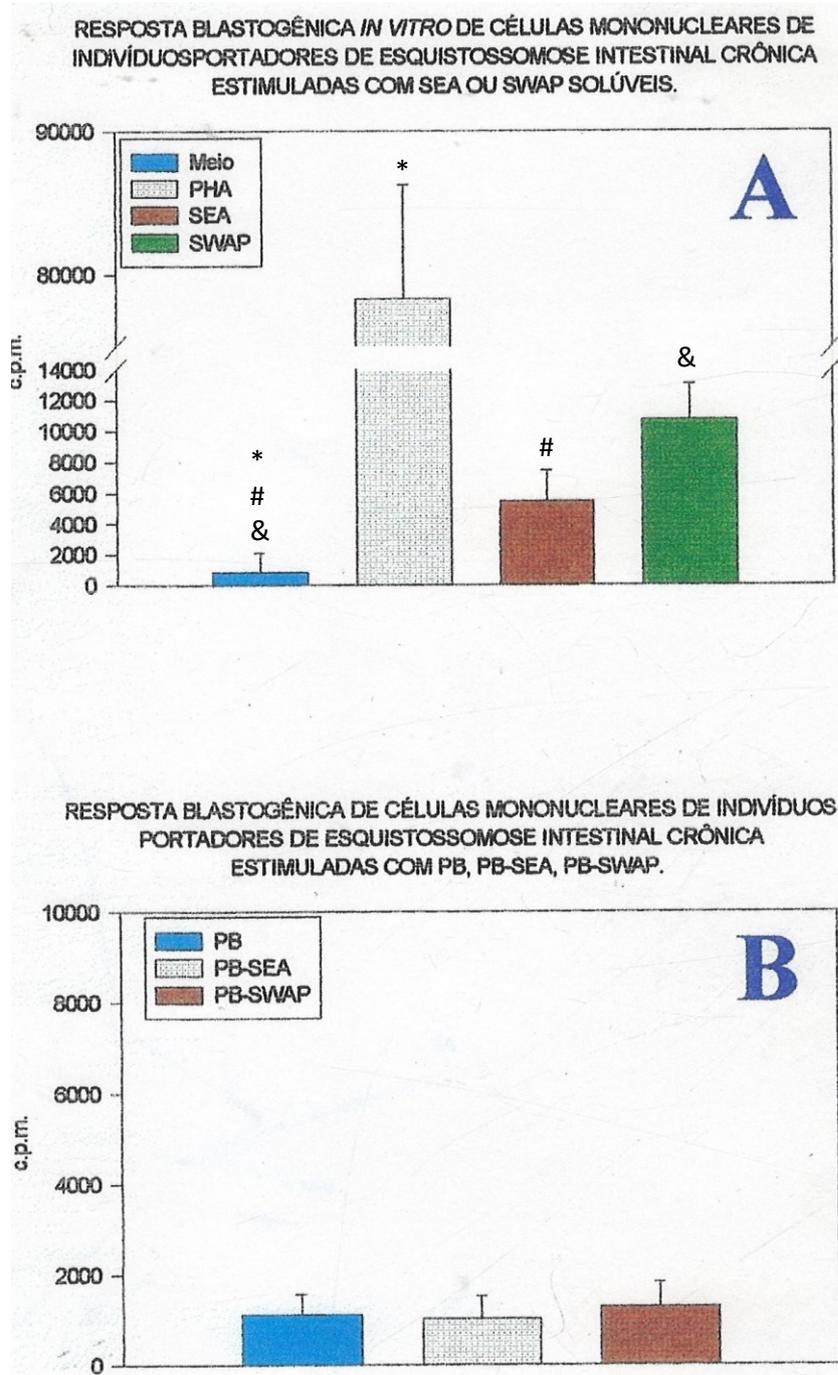
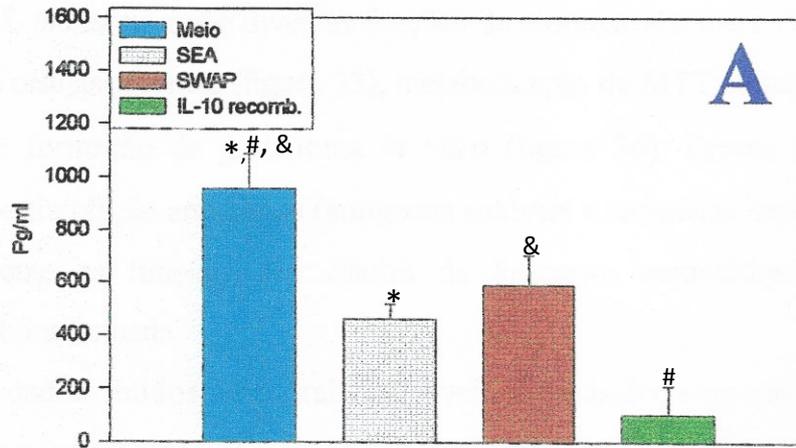


Figura 35: Resposta blastogênica de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica estimulada com antígenos solúveis do *S. mansoni* ou com antígenos imobilizados em microesferas de poliácridamida. As células mononucleares ( $2 \times 10^5$ ) de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica foram estimuladas com meio, PHA, SEA ou SWAP em (A) e PB, PB-SEA ou PB-SWAP em (B). Após o período de 5 dias foi avaliada a incorporação de timidina tritiada conforme descrito anteriormente em material e métodos. Os resultados estão expressos em c.p.m. (contagens de cintilação líquida por minuto) e representam a média  $\pm$  d.p. de 05 experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #, &) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

5.6.4- “A estimulação prévia de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos com antígenos solúveis do *S. mansoni* regula a produção de TNF $\alpha$  por monócitos e reduz o índice de formação de granuloma *in vitro*.”

Células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos foram pré-estimuladas *in vitro* por 24 horas com antígenos solúveis do *S. mansoni*. A produção de TNF $\alpha$  por monócitos isolados desta população de células mononucleares foi avaliada por bioensaio utilizando células L-929 conforme descrito anteriormente em material e métodos. Observamos que a estimulação de células mononucleares ( $1 \times 10^6$ /cavidade) de indivíduos esquistossomóticos com os antígenos solúveis do parasita é capaz de modular a produção de TNF- $\alpha$  por monócitos aderentes estimulados com LPS (figura 36). Avaliamos também o efeito do pré-tratamento de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos por 24 horas com 20 U/ml de IL-10 recombinante sobre a produção de TNF- $\alpha$  por monócitos estimulados com 1  $\mu$ g/ml de LPS. Os resultados obtidos mostram que, tanto a pré-estimulação de células mononucleares de indivíduos infectados com antígenos solúveis do parasita quanto o tratamento com IL-10 recombinante, são capazes de inibir a produção de TNF- $\alpha$  por monócitos (figura 36). Paralelamente, investigamos a capacidade de formação de granuloma *in vitro* por células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos que foram pré-tratadas *in vitro* com IL-10 recombinante ou pré-estimuladas com antígenos solúveis do *S. mansoni* por 24 horas. Os resultados obtidos mostram que tanto a pré-estimulação com antígenos solúveis do parasita quanto o tratamento com IL-10 recombinante são capazes de modular a formação de granuloma *in vitro* (figura 36).

EFEITO DA PRÉ-ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE INTESTINAL CRÔNICA SOBRE A PRODUÇÃO DE TNF- $\alpha$  POR CÉLULAS DA LINHAGEM MONOCÍTICA/MACROFÁGICA



EFEITO DA PRÉ-ESTIMULAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE INDIVÍDUOS PORTADORES DE ESQUISTOSSOMOSE INTESTINAL CRÔNICA COM ANTÍGENOS SOLÚVEIS DO *S. mansoni* SOBRE A REAÇÃO DE FORMAÇÃO DE GRANULOMA *IN VITRO*.

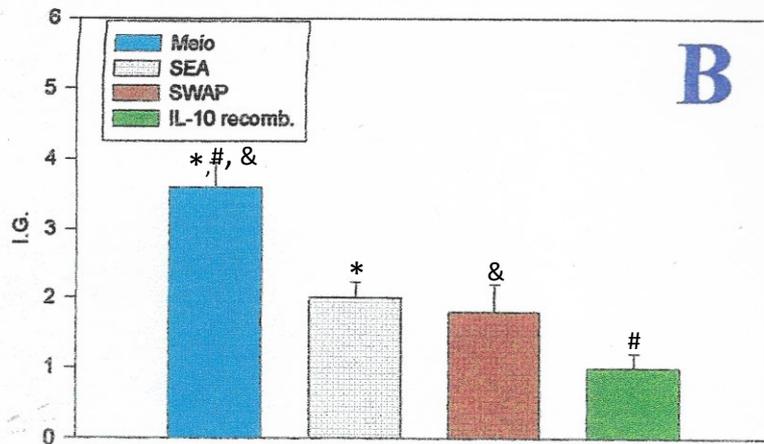


Figura 36: Pré-estimulação de células mononucleares de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica com antígenos solúveis do *S. mansoni* ou com IL-10 recombinante: Efeitos sobre a produção de TNF- $\alpha$  por células da linhagem monocítica/macrofágica estimuladas com LPS e sobre a formação de granuloma *in vitro*. As células mononucleares ( $1 \times 10^6$  de indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica) foram tratadas com meio, SEA, SWAP ou 20 U/ml de IL-10 recombinante por 24 horas. Após este período foi avaliada a produção de TNF- $\alpha$  pelas células aderentes estimuladas por LPS ( $1 \mu\text{g/ml}$ ) em (A) e a formação de granuloma *in vitro* a PB-SEA em (B). Os resultados estão expressos em picogramas de TNF- $\alpha$  por mililitro em A e índice de granuloma *in vitro* em B e representam a média  $\pm$  desvio padrão de quatro experimentos em triplicata. As barras com símbolos iguais (\*, #, &) apresentam diferenças estatisticamente significativas entre si ( $p < 0,05$ ).

Os resultados obtidos neste bloco mostram que a estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni* inibe diversas funções de monócitos e macrófagos, tais como: formação de células gigantes (figura 33), metabolização de MTT (figura 34), produção de TNF- $\alpha$  e formação de granuloma *in vitro* (figura 36). Portanto, a natureza da estimulação antigênica (antígenos solúveis x antígenos imobilizados) afeta diferencialmente as funções das células da linhagem monocítica/macrofágica na esquistossomose humana.

Todos os dados obtidos neste trabalho revelam a existência de um padrão bastante complexo de produção de citocinas após estimulação com os antígenos do *S. mansoni* e mostram a participação de células da linhagem monocítica/macrofágica e dos processos de diferenciação celular nos mecanismos de imunorregulação presentes na esquistossomose humana.

## 6- DISCUSSÃO

A infecção pelo *S. mansoni* desencadeia uma resposta imune complexa no hospedeiro vertebrado, cuja patologia é predominantemente associada às reações granulomatosas que se formam ao redor dos ovos do parasita alojados no fígado e no intestino (Boros; Warren, 1970; Colley, 1981b). A intensidade destas reações inflamatórias, assim como as lesões resultantes, parecem ser controladas por mecanismos imunorreguladores desenvolvidos em infecções parasitárias crônicas (Stenger *et al.*, 1967; Phillips; Colley, 1978; Warren, 1982). O estudo dos fatores que controlam o estabelecimento e a manutenção destes mecanismos imunorreguladores na esquistossomose constitui-se em um aspecto essencial a uma melhor compreensão desta parasitose.

No presente trabalho investigamos o processo de diferenciação das células da linhagem monocítica/macrofágica e a produção de citocinas na esquistossomose humana. O envolvimento destes aspectos nos mecanismos de imunorregulação serão enfatizados nesta discussão.

### 6.1. Diferenciação de células da linhagem monocítica/macrofágica na esquistossomose

Em nosso sistema experimental, investigamos as mudanças morfológicas sofridas *in vitro* pelas células da linhagem monocítica/macrofágica. Estas células foram mantidas em cultura de longa duração e ao final do período investigado (21 dias) encontravam-se vivas, em boas condições fisiológicas e metabolizavam MTT ativamente. Os monócitos recém-coletados eram redondos ou de aparência circular (figura 1), mas se desenvolviam após 4 ou 5 dias em células maiores e com diversos formatos (figura 2). A partir do 7º dia de cultura passamos a observar a formação de células gigantes multinucleadas (figura 3). A diferenciação destas células em nosso sistema experimental *in vitro* apresentou características similares às observadas em culturas realizadas em outros laboratórios (Johnson *et al.*, 1977; Zuckerman *et al.*, 1979). Na medula óssea, o mais primitivo dos fagócitos mononucleares encontrados é o monoblasto (Goud *et al.*, 1975). Esta célula se divide para dar origem aos pró-monócitos que por sua vez se diferenciam em monócitos. Os monócitos imaturos são liberados na circulação sanguínea e após um curto espaço de tempo deixam a circulação para entrar nos tecidos e se transformarem em macrófagos (van der Meer *et al.*, 1982; van Furth; Sluitter, 1983). Estes monócitos e macrófagos podem, através de um processo de fusão celular, se transformar em células gigantes multinucleadas (Gillman & Wright, 1966; Mariano; Spector, 1974;

Chambers, 1978). Segundo Zuckerman *et al.* (1979) e Schlesinger *et al.* (1984) o sistema *in vitro* de diferenciação das células da linhagem monocítica/macrofágica parece recapitular os principais passos do processo de diferenciação que ocorrem *in vivo*, inclusive com a formação de células gigantes multinucleadas. Verificamos em nosso sistema *in vitro* que, na ausência de estimulação por antígenos ou mitógenos, os monócitos de indivíduos normais ou esquistossomóticos apresentaram equivalentes taxas de fusão (figura 5) e formação de células gigantes multinucleadas (figura 4).

Células gigantes multinucleadas têm sido comumente detectadas em associação com diversas respostas inflamatórias crônicas (Chambers, 1978), inclusive no granuloma esquistossomótico (Chensue *et al.*, 1992; Silva-Teixeira *et al.*, 1993). Todavia, diversos aspectos relacionados à participação dos antígenos do parasita no desenvolvimento deste tipo celular ainda são desconhecidos na esquistossomose humana. Dentro deste contexto, realizamos experimentos visando avaliar o efeito da estimulação com antígenos do *S. mansoni* sobre o processo de diferenciação de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*. Os resultados obtidos mostraram que a estimulação com os antígenos do *S. mansoni* conjugados a microesferas de poliacrilamida leva a um aumento da formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* (figura 6) e da taxa de fusão de monócitos precursores (figura 7). Verificamos também que a estimulação com PB-PPD, tanto em indivíduos considerados normais para a esquistossomose quanto nos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, foi capaz de induzir a um aumento no número de células gigantes formadas e elevar a taxa de fusão dos monócitos mantidos em cultura (figuras 6 a 9). Sabe-se que grande parcela da população brasileira é vacinada com o BCG e apresenta reação positiva ao PPD em diversos ensaios *in vitro*. Este fato poderia explicar os efeitos estimulatórios do PPD observados em nossos experimentos. Por outro lado, a estimulação de células de indivíduos normais com antígenos do *S. mansoni* não foi capaz de provocar um aumento significativo na formação de células gigantes *in vitro* (figura 8) ou na taxa de fusão dos monócitos (figura 9). Os dados obtidos sugerem que linfócitos T específicos para os -antígenos do parasita, presentes na população de células mononucleares dos indivíduos esquistossomóticos, poderiam estar envolvidos no desenvolvimento e na regulação do processo de diferenciação de monócitos *in vitro*. A produção de fatores solúveis por estas células T reativas aos antígenos do *S. mansoni* pode ser um dos mecanismos associados à formação de células gigantes multinucleadas na esquistossomose humana. Passamos então a investigar o efeito de sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos estimuladas com antígenos do parasita

sobre o processo de diferenciação de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*. Os nossos experimentos mostraram que os sobrenadantes de cultura de células de indivíduos infectados estimuladas com antígenos do *S. mansoni* possuem atividade estimuladora da fusão de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas (figuras 10 e 11). Por outro lado, os sobrenadantes originados de células de indivíduos infectados não estimuladas com antígenos do parasita, assim como os sobrenadantes obtidos de células de indivíduos nonnais (estimuladas ou não com antígenos do *S. mansoni*) não apresentaram atividade estimuladora do processo de diferenciação celular e formação de células gigantes *in vitro* (figuras 12 e 13).

Existem, atualmente, alguns estudos publicados envolvendo a identificação de fatores solúveis com atividade estimuladora da formação de células gigantes multinucleadas. Postlethwaith *et al.* (1982) identificaram uma proteína termolábil de 60.000 daltons, produzida por linfócitos T, capaz de induzir a formação de células gigantes *in vitro* a partir da fusão de monócitos do sangue periférico. Esta proteína foi denominada GCF ("giant cell factor"). Posteriormente, foi descoberto em diversos modelos experimentais, que a formação de células gigantes multinucleadas também pode ser acelerada pela adição de vitamina D<sub>3</sub> (Abe, 1981), IL-4 (McInnes; Rennick, 1988), ésteres de forbol (Hassan *et al.*, 1989), IFN $\gamma$  (Weiberg *et al.*, 1989) e TNF- $\alpha$  (Takashima *et al.*, 1993). Acosta *et al.* (1992) mostraram que células obtidas de granulomas de fígado de camundongos infectados pelo *S. mansoni*, mantidas *in vitro*, produziam um fator solúvel capaz de induzir a formação de células gigantes. Os nossos resultados mostraram que o processo de diferenciação de células da linhagem monocítica/macrofágica na esquistossomose humana envolve a participação de fatores solúveis secretados pelas células mononucleares dos indivíduos infectados após estimulação com antígenos do parasita. Posteriormente, verificamos que os sobrenadantes que possuíam atividade estimuladora da formação de células gigantes *in vitro* (figuras 10 e 11) apresentavam concentrações elevadas de TNF- $\alpha$  e níveis reduzidos de IL-10 (figuras 29 e 32).

Provavelmente, estas células gigantes multinucleadas que são comumente encontradas em associação com diversas respostas crônicas nos tecidos devem ser formadas por mecanismos imunológicos envolvendo a presença de mediadores solúveis produzidos localmente. Na figura 37 propomos um modelo que mostra, de forma esquemática, o envolvimento dos antígenos do *S. mansoni* no processo de formação de células gigantes na esquistossomose humana. Entretanto, uma vez formadas, qual seria a participação destas

células gigantes multinucleadas nos mecanismos de imunorregulação presentes nesta parasitose?

## **6.2-Imunorrregulação da resposta aos antígenos do *S. mansoni***

Diversos mecanismos imunorreguladores já foram descritos na esquistossomose, tais como: a soro-supressão, interações idiotípicas, imunocomplexos, participação de linfócitos T supressores, fatores genéticos e alterações bioquímicas (Bina *et al.*, 1978; Colley *et al.*, 1978; Rocklin *et al.*, 1980; Lima *et al.*, 1986; Chaves *et al.*, 1990; Goes *et al.*, 1991; Goes *et al.*, 1994; Hirsch *et al.*, 1996). Todavia, existem aspectos dos fenômenos de imunorregulação que ainda encontram-se pouco investigados ou mesmo desconhecidos na esquistossomose humana. Dentro deste contexto, podemos destacar o efeito do processo de diferenciação das células da linhagem monocítica/macrofágica sobre a geração e manutenção da resposta imune aos antígenos do parasita.

Os monócitos humanos obtidos de sangue periférico não são células maduras e o processo de diferenciação é acompanhado por diversas mudanças funcionais e bioquímicas características (Adams, 1976). Macrófagos humanos derivados de diferentes compartimentos ou em estados de diferenciação variados, exibem respostas antagônicas a imunomoduladores (Strieter *et al.*, 1989; Hurme *et al.*, 1992; Toosi *et al.*, 1996). A prostaglandina e a dexametasona inibem a produção de TNF- $\alpha$  estimulada por LPS em monócitos do sangue periférico, mas não em macrófagos alveolares (Strieter *et al.*, 1989). Toosi *et al.* (1996) mostraram que macrófagos alveolares humanos produzem menos TGF- $\beta$  do que monócitos obtidos do sangue periférico. Portanto, a importância fisiológica do processo de diferenciação das células da linhagem monocítica/macrofágica na esquistossomose humana poderia estar associada ao desenvolvimento de diferentes tipos de respostas funcionais que seriam, em última instância, dependentes do estado de maturação em que estas células se encontram. Na realidade, em nosso próximo grupo de experimentos, observamos que existe um aumento da capacidade de apresentação de antígenos por monócitos/macrófagos até o 5º dia em cultura. Entretanto, após o 5º dia do processo de diferenciação das células da linhagem monocítica/macrofágica, ocorre uma queda na capacidade de apresentação de antígenos do *S. mansoni* (figura 15) e uma redução no índice de formação de granuloma *in vitro* (figura 14).

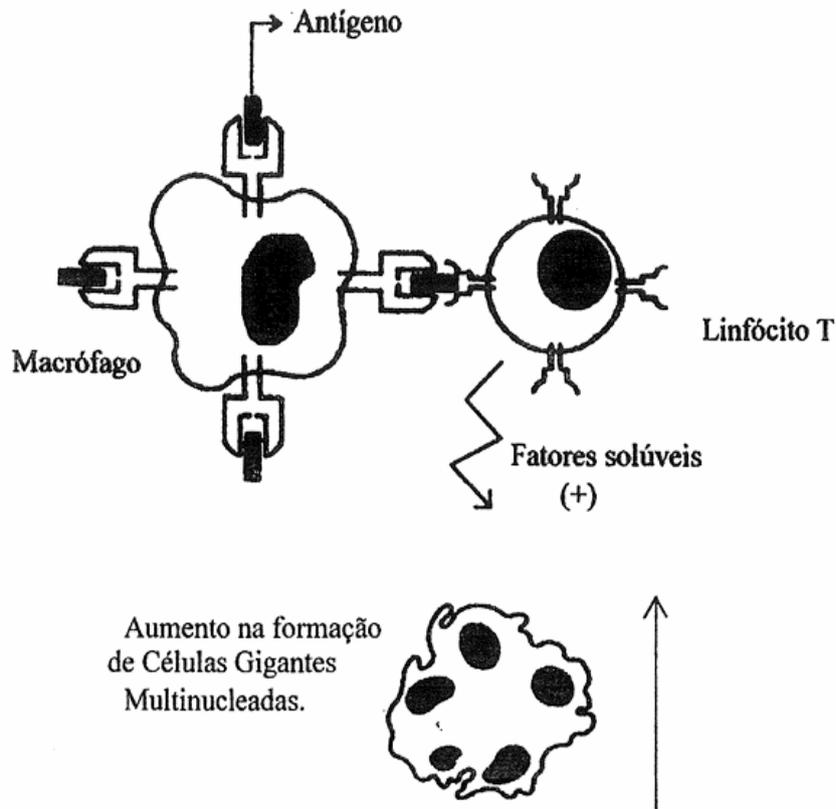


Figura 37: Modelo teórico proposto para a ação dos antígenos do *S. mansoni* sobre o processo de formação de células gigantes na esquistossomose humana. Neste modelo a estimulação de linfócitos T de indivíduos esquistossomóticos com antígenos do parasitalevaria a produção de fatores solúveis com atividade estimuladora da formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*.

Elaboramos um modelo teórico (figura 38) na tentativa de explicar estes fenômenos de imunorregulação da resposta dirigida aos antígenos do *S. mansoni*. Neste modelo propomos a existência de duas fases distintas no processo de diferenciação das células da linhagem monocítica/macrofágica. Na primeira fase ou fase I (correspondente à diferenciação de monócitos até macrófagos) existiria um aumento na capacidade apresentadora de antígenos e, portanto, na formação de granuloma e desenvolvimento de respostas de proliferação celular. Na segunda fase ou fase II (correspondente à diferenciação de macrófagos até células gigantes) ocorreriam os processos de modulação da formação do granuloma e redução da capacidade apresentadora de antígenos. O desenvolvimento da fase II funcionaria como um “feedback” negativo para as respostas biológicas controladas pela fase I. Logicamente, outros fatores como a presença de diferentes citocinas, também poderiam controlar a intensidade das respostas desenvolvidas em cada fase assim como a velocidade de passagem de uma fase para a outra. Os resultados dos nossos experimentos (figuras 14-16) indicam que a imunorregulação das respostas de proliferação celular e formação do granuloma *in vitro* é dependente do grau de

maturação das células da linhagem monocítica/macrofágica envolvidas nos processos de apresentação dos antígenos do *S. mansoni*

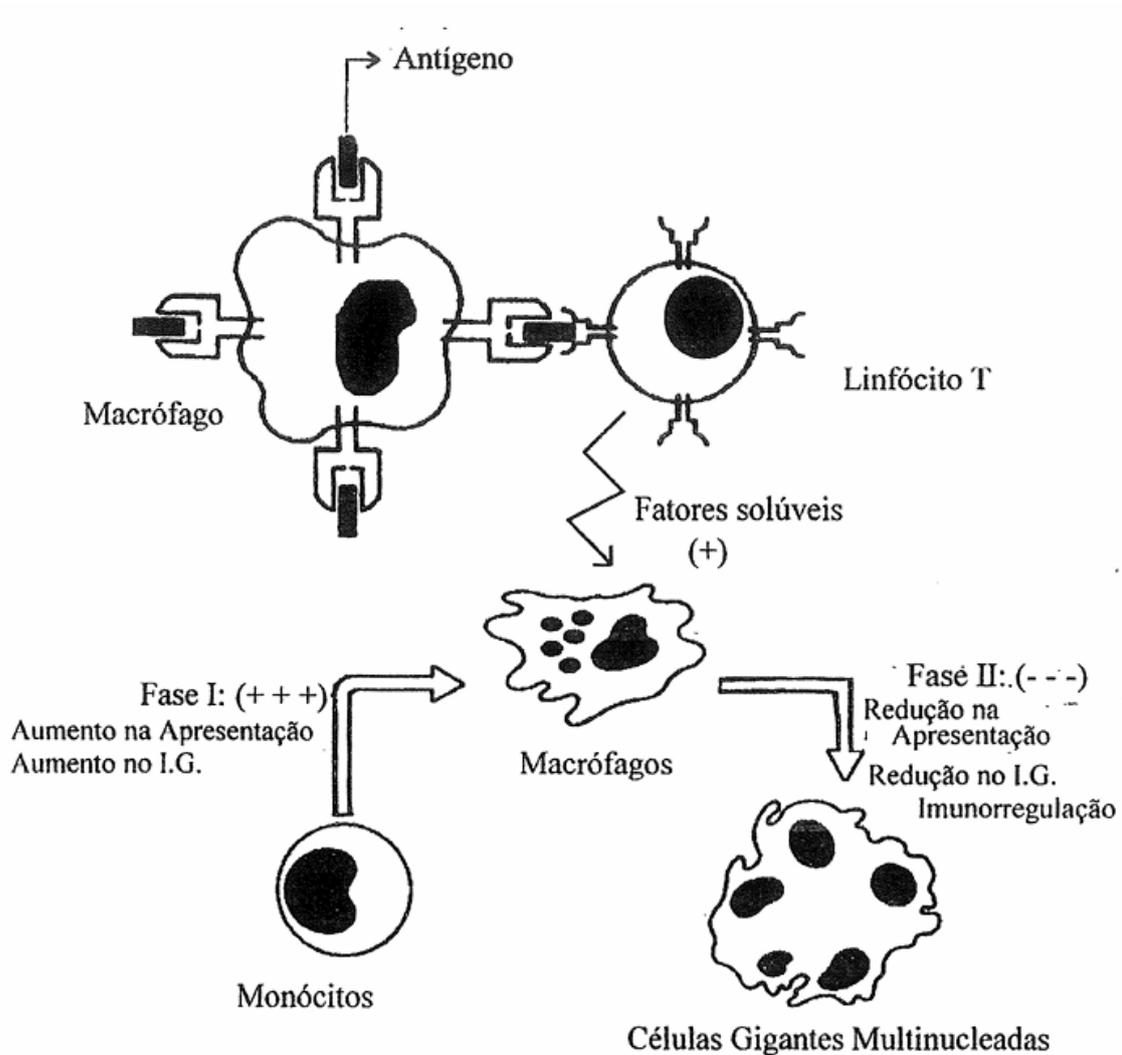


Figura 38: Modelo teórico proposto para a participação do processo de diferenciação de monócitos e formação de células gigantes multinucleadas nos mecanismos de imunorregulação da resposta aos antígenos do *S. mansoni*. Neste modelo, na fase I (correspondente à diferenciação de monócitos até macrófagos) existiria um aumento na capacidade apresentadora de antígenos e formação de granuloma. Na segunda fase, ou fase II (correspondente à diferenciação de macrófagos até células gigantes), ocorreriam os processos de modulação da formação do granuloma e redução da capacidade apresentadora de antígenos. O desenvolvimento da fase II funcionaria como um "feedback" negativo para as respostas biológicas controladas pela fase I.

A seguir veremos que a investigação da expressão de moléculas de superfície durante o processo de diferenciação das células da linhagem monocítica/macrofágica reforçou a hipótese das duas fases (figura 38) e veio esclarecer o modo de ação dos mecanismos imunorreguladores anteriormente descritos neste trabalho.

### **6.3- Expressão de moléculas de superfície durante o processo de diferenciação de células da linhagem monocítica/macrofágica.**

Para a investigação mais detalhada dos mecanismos responsáveis pela imunorregulação da resposta verificada nos experimentos anteriores, levantamos a hipótese de que as células da linhagem monocítica/macrofágica, alterariam a sua própria expressão de determinadas moléculas de superfície durante o processo de diferenciação, e seriam capazes, desta forma, de modular a resposta de células T à estimulação antigênica persistente. Para investigar esta hipótese nós avaliamos a expressão de moléculas de HLA-DR e das moléculas de adesão CD29 e CD54 na superfície das células da linhagem monocítica/macrofágica durante o processo de diferenciação. Estas moléculas estão envolvidas em processos de ativação celular, apresentação de antígenos, interações célula-célula e possuem importantes propriedades co-estimuladoras (Renkonen, 1989; Hemler, 1990; Hynes, 1992; Fais *et al.*, 1994).

O CD29 é uma molécula de 130 kD (também conhecida como integrina B1) que é amplamente expressa na superfície de leucócitos e de outras células não pertencentes ao sistema imunológico. As moléculas de CD29 quando associadas não-covalentemente às cadeias  $\alpha$  das moléculas de CD49e formam os "antígenos de ativação bastante tardia" ou "very late activation antigens" (VLA). As moléculas de CD29 estão também envolvidas em processos de fusão de monócitos e macrófagos (Tabata *et al.*, 1994), "homing" de células T, adesão de leucócitos às proteínas da matrix extracelular, processos de adesão célula-célula, co-estimulação de células T (Hemler, 1990; Hynes, 1992).

O CD54, também conhecido como "molécula de adesão intercelular-1" ou "intercellular adhesion molecule-1" (ICAM-1), é uma glicoproteína de cadeia única também envolvida em processos de adesão celular (Renkonen, 1989), fusão de monócitos e macrófagos (Fais *et al.*, 1994), resposta blastogênica de células T (Lukacs *et al.*, 1994) e produção de citocinas (Lukacs *et al.*, 1993). Os ligantes celulares para o CD54 são as moléculas LFA-1 (CD11a/CD18) e as moléculas Mac-1 (CD11b/CD18), ambas expressas em células imunes e inflamatórias (Renkonen, 1989; Lukacs *et al.*, 1994). A expressão de CD54 pode ser induzida por mediadores

tais como citocinas e ésteres de forbol (Pober *et al.*, 1986; Pober *et al.*, 1987) e a participação das moléculas de CD54 no desenvolvimento da resposta proliferativa de células T e formação de granuloma em camundongos infectados pelo *S. mansoni* foi recentemente demonstrado (Lukacs *et al.*, 1993 Lukacs *et al.*, 1994).

Os nossos resultados mostram uma diminuição da expressão de HLA-DR e também das moléculas de adesão (CD54) durante o processo de diferenciação e formação de células gigantes multinucleadas enquanto que a expressão de CD29 permanece constante (figuras 17-19). Provavelmente a expressão de CD29 se mantém constante porque esta molécula deve ser essencial para a manutenção do processo de fusão celular. Por outro lado, a expressão de HLA-DR e CD54 devem ter um papel mais significativo no processo de apresentação de antígenos, mas não essencial aos processos de fusão observados mais tardiamente em cultura. O fato de que a capacidade de apresentação de antígenos decresce durante o processo de diferenciação *in vitro* (figura 15 e 16), enquanto que o processo de fusão celular e formação de células gigantes continua a ocorrer (figura 06 e 07) reforçam esta hipótese.

Fais *et al.* (1994), utilizando técnicas de imunohistoquímica, mostraram que as moléculas de CD54 de superfície de macrófagos passam a ser detectadas no centro das células gigantes multinucleadas recém-formadas. A expressão de HLA-DR também passa a ser predominantemente citoplasmática e tende a desaparecer quando da formação de células gigantes multinucleadas. Utilizando citometria de fluxo, mostramos que existe uma queda na expressão de CD54 e HLA-DR de superfície durante o processo de diferenciação de macrófagos e formação de células gigantes multinucleadas. Provavelmente, a perda aparente destas moléculas de superfície poderia estar relacionada a alterações nos processos regulatórios das relações núcleo-citoplasma devido ao aumento no número de núcleos no interior destas células. Todavia a resposta a esta questão ainda não é completamente desconhecida. O padrão de expressão de HLA-DR e moléculas de adesão durante o processo de diferenciação e formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* pode estar relacionado aos passos envolvidos nos processos de iniciação, manutenção e modulação das reações granulomatosas. Estes resultados asseguram um importante papel regulador para os monócitos, macrófagos e células gigantes, que, através de sua capacidade de mudança na expressão de marcadores fenotípicos durante o processo de diferenciação *in vivo*, poderiam controlar localmente a intensidade das respostas imunopatológicas desenvolvidas na esquistossomose humana. Provavelmente, a regulação destas respostas dirigidas aos antígenos do *S. mansoni*, assim como a diferenciação de diversos

tipos celulares, também dependem do perfil de citocinas presentes no microambiente.

#### **6.4- Produção de citocinas na esquistossomose humana**

Inicialmente, investigamos a produção de citocinas por células mononucleares de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica estimuladas com PHA. Os resultados obtidos demonstram que a estimulação das células mononucleares com PHA é capaz de induzir a produção de todas as citocinas investigadas neste trabalho. É interessante notar que a IL-10 e o TNF- $\alpha$  são produzidos pelas células mononucleares, mesmo na ausência de estimulação com PHA. Provavelmente, outros tipos celulares, além dos linfócitos, poderiam contribuir para o perfil de produção de citocinas observado na esquistossomose humana. A produção de citocinas por células acessórias também é capaz de alterar o balanço Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> e direcionar o tipo de resposta a ser desenvolvida no hospedeiro (Romagnani, 1995). Este fato coloca as células da linhagem monocítica/macrofágica como candidatos potenciais a esta produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  observada na ausência de antígenos e mitógenos.

Após a identificação do perfil de citocinas secretado devido à estimulação com PHA, passamos a investigar a produção *in vitro* de citocinas por células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos após a estimulação com os antígenos do parasita (SEA e SWAP). Investigamos inicialmente a produção de IL-4 por células mononucleares de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica após estimulação com antígenos do *S. mansoni*.

A IL-4 é uma glicoproteína de aproximadamente 20 kD secretada principalmente por linfócitos T ativados e mastócitos (Paul; Ohara, 1987). Inicialmente a IL-4 foi descrita como uma citocina capaz de estimular o crescimento e a diferenciação de células B (Paul; Ohara, 1987). Na esquistossomose experimental, vários estudos têm avaliado a produção de IL-4 em camundongos infectados pelo *S. mansoni* (Cheever *et al.*, 1994; Henderson *et al.*, 1992; Vella *et al.*, 1992). Nestes experimentos a IL-4 parece estar associada ao desenvolvimento das respostas do tipo Th<sub>2</sub>, além de contribuir para o desenvolvimento da fibrose hepática em camundongos infectados (Cheever *et al.*, 1994). Esta resposta Th<sub>2</sub> dirigida aos ovos do parasita caracteriza-se pela produção de altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, com uma população que utiliza a IL-4 como fator de crescimento autócrino (Vella *et al.*, 1992). Henderson *et al.* (1992) identificaram uma grande produção de RNA mensageiro para IL-4 em granulomas de fígado de camundongos infectados pelo *S. mansoni*. Existem poucos estudos descrevendo a produção de IL-4 na esquistossomose mansoni humana e a maioria dos trabalhos avaliam a produção de IL-4 estimulada somente por mitógenos ou ésteres de forbol

(Zwingenberger *et al.*, 1991; Araújo *et al.*, 1996).

Ao contrário do observado para a infecção esquistossomótica em camundongos, os nossos resultados mostram que a estimulação com antígenos do *S. mansoni* não induz à produção de IL-4 pelas células mononucleares dos indivíduos infectados em nenhum dos tempos avaliados (figura 21). Também não constatamos a produção de IL-4 durante a reação de formação de granuloma *in vitro* (figura 27). A produção desta citocina foi detectada somente após estimulação mitogênica com PHA (figura 20). Vários aspectos podem ser levantados na tentativa de compreender os resultados obtidos. Uma vez que a IL-4 poderia contribuir para o desenvolvimento da fibrose hepática (Cheever *et al.*, 1994), diversos mecanismos reguladores da produção desta citocina podem ter se desenvolvido nos indivíduos com esquistossomose intestinal crônica de modo a limitar este tipo de resposta e prevenir um excesso de dano tecidual. Outras hipóteses também podem ser formuladas, tais como o consumo rápido desta citocina *in vitro* ou mesmo a inibição da produção de IL-4 por outras citocinas produzidas simultaneamente pelas células mononucleares estimuladas com os antígenos do *S. mansoni*. Os resultados referentes a produção de IL-5 na esquistossomose humana mostram um perfil bastante diferente do observado na esquistossomose murina experimental (Cheever *et al.*, 1991) e em trabalhos anteriores na esquistossomose humana onde foram encontrados níveis mais elevados de produção desta citocina (Roberts *et al.*, 1993). A IL-5 é uma glicoproteína de 40-50 kD produzida por linfócitos CD4+ e por mastócitos (Takatsu *et al.*, 1994). Assim como a IL-4, a IL-5 também estimula o crescimento e a diferenciação de células B. Além disto, a IL-5 também promove o crescimento e a diferenciação de eosinófilos (Takatsu *et al.*, 1994).

Na esquistossomose murina, a resposta Th<sub>2</sub> desenvolvida após estimulação com os ovos do parasita caracteriza-se pela produção de altos níveis de IL-5 (Pearce *et al.*, 1991). Além disto, a neutralização da produção de IL-5 com anticorpos monoclonais é capaz de reduzir o tamanho dos granulomas hepáticos recém-formados, assim como o número de eosinófilos nestas lesões, mas não é capaz de reduzir a fibrose hepática em camundongos infectados pelo *S. mansoni* (Cheever *et al.*, 1991). A proliferação e diferenciação de eosinófilos em granulomas esquistossomóticos também parece ser controlada pela IL-5 (el-Cheikh *et al.*, 1991). Os nossos resultados mostram que a produção de IL-5 pelas células mononucleares dos indivíduos infectados após a estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni* só é detectada no 5º dia de cultura (figura 22). Por outro lado, não constatamos a produção desta

citocina após estimulação com PB-SEA e PB-SWAP (figura 28). Diante dos resultados obtidos, algumas hipóteses podem ser levantadas. A produção de IL-5 poderia estar inibida nos períodos iniciais de cultura por outras citocinas produzidas simultaneamente pelas células mononucleares estimuladas com os antígenos do *S. mansoni*. À medida que as concentrações destas citocinas inibitórias fossem decaindo, passaríamos a detectar a produção de níveis significativos de IL-5. O mesmo raciocínio poderia ser aplicado de modo inverso, ou seja, o aparecimento de citocinas estimuladoras da produção de IL-5 poderia ocorrer por volta do 5º dia de cultura o que levaria à produção de níveis detectáveis de IL-5 neste período. A investigação de outras citocinas produzidas na esquistossomose mansoni humana é importante para o esclarecimento destas questões. Castro *et al.* (1995) mostraram evidências de que a IL-5 pode ser produzida *in vivo* por outros tipos celulares além dos linfócitos T. Estes dados nos levam a uma hipótese adicional sobre a IL-5 detectada no 5º dia de cultura em nossos experimentos. Poderíamos especular que o perfil de citocinas presente neste microambiente (no 5º dia de cultura) contribuiria para desenvolvimento e ativação de outros tipos celulares (células não T) que seriam as responsáveis pela produção de IL-5. No entanto, a comprovação destas hipóteses requer a utilização de técnicas de fracionamento, e estudos das subpopulações celulares obtidas.

A produção de IL-10 na esquistossomose humana também foi investigada em nossos experimentos. A IL-10 é um homodímero de 39 kD produzido por linfócitos T CD4+, macrófagos, células B ativadas, células epiteliais e timócitos murinos fetais (Howard; O'Garra, 1992). Esta citocina foi inicialmente identificada em camundongos como um fator produzido por células Th2, capaz de inibir a síntese de IFN- $\gamma$  por células Th1 (Howard; O'Garra, 1992). A IL-10 também é capaz de agir sobre monócitos e macrófagos, inibindo a expressão de moléculas de classe II induzida por IFN- $\gamma$ , além de bloquear a produção de IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ., GM-CSF e G-CSF (Fiorentino *et al.*, 1991; Oswald *et al.*, 1992; Taga; Tosato, 1992). Por outro lado, a IL-10 apresenta efeitos opostos sobre os linfócitos B, sendo um fator autócrino para o crescimento de células B CD5+, e também capaz de elevar a expressão de moléculas de MHC classe II em linfócitos B em repouso (Howard; O'Garra, 1992). Além disto, também foram descritos efeitos inibitórios da IL-10 sobre granulócitos humanos (Chaves *et al.*, 1996).

Na esquistossomose murina experimental foi detectada a produção de altos níveis de IL-10 devido ao desenvolvimento de uma resposta Th2 anti- antígenos do ovo do *S. mansoni* (Vella *et al.*, 1992). Na esquistossomose humana, estudos iniciais mostram que o bloqueio

destas citocinas com anticorpos monoclonais eleva a formação de granuloma *in vitro* (Pemberton *et al.*, 1994). Além disto, a adição de IL-10 recombinante é capaz de suprimir as respostas proliferativas de pacientes infectados e as reações de formação de granuloma *in vitro* (Pemberton *et al.*, 1994). Estes resultados sugerem que a produção desta citocina na esquistossomose humana poderia levar à imunorregulação das respostas imunes desenvolvidas contra os antígenos do *S. mansoni*. Em nossos experimentos avaliamos a concentração desta citocina em sobrenadantes de cultura de células mononucleares de indivíduos com esquistossomose intestinal crônica. Os resultados mostraram a produção de níveis significativos de IL-10 por células mononucleares de indivíduos infectados após a estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni* (figura 23). Os dados revelam uma produção mais intensa nas primeiras 24 horas de cultura e um decréscimo na concentração de IL-10 no 5º dia de cultura. Provavelmente, a produção de IL-10 observada nos períodos iniciais de cultura (*ex vivo*) representa, de forma mais aproximada, os eventos envolvidos na produção *in vivo* desta citocina em indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica, após a estimulação com os antígenos solúveis do parasita. Os nossos resultados reforçam os dados obtidos por Pemberton *et al.* (1994) que estudaram os efeitos desta citocina utilizando bloqueio com anticorpos monoclonais anti-IL-10, e confirmam a participação desta citocina em mecanismos imunorreguladores presentes na esquistossomose humana. Além disto, os resultados mostram que a produção de IL-10 não está associada ao processo de formação de granuloma *in vitro* (figura 29). Na realidade, verificamos que existe uma inibição da produção de IL-10 durante o desenvolvimento das reações de formação de granuloma *in vitro* estimuladas por PB-SEA e PB-SWAP. Acreditamos que esta diminuição da produção de IL-10 após estimulação com PB-SEA e PB-SWAP seja um efeito indireto, mediado pela produção de TNF- $\alpha$  durante o desenvolvimento das reações granulomatosas *in vitro* (figura 32). A análise dos nossos resultados associados aos dados obtidos por outros grupos de pesquisadores (Pemberton *et al.*, Araújo *et al.*, 1996; King *et al.*, 1996) sugerem que esta citocina, uma vez produzida, levaria a uma diminuição das respostas proliferativas e a uma redução na intensidade das reações granulomatosas (figura 36).

Conforme foi dito no decorrer deste trabalho, existem poucos estudos realizados na esquistossomose mansoni humana envolvendo a investigação da produção de citocinas. Até o presente momento, o padrão de produção de IL-13 em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* é pouco conhecido. A IL-13 é uma proteína com peso molecular de aproximadamente 10 kD,

que é produzida basicamente por linfócitos Th<sub>2</sub> CD<sub>4</sub><sup>+</sup> (Minty *et al.*, 1993). Estudos iniciais mostram que a IL-13 induz a síntese de IgG<sub>4</sub> e IgE e é capaz de elevar a expressão de moléculas do MHC de classe II e de CD23 na superfície de monócitos e de linfócitos B. Alguns dos efeitos da IL-13 são independentes, porém sinérgicos a ação da IL-4 (Minty *et al.*, 1993). Os nossos resultados mostram que a produção de IL-13 pelas células mononucleares dos indivíduos infectados após a estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni* só é detectada no 5º dia de cultura (figura 24). Por outro lado, não constatamos a produção desta citocina após estimulação com PB-SEA e PB-SWAP (figura 30) indicando que a produção de IL-13 não deve ser essencial ao processo de formação de granuloma *in vitro*.

A inexistência de dados a respeito do papel da IL-13 na esquistossomose humana, que sejam do nosso conhecimento, limita a discussão extrínseca dos resultados. Todavia, algumas hipóteses podem ser levantadas. A produção de IL-13 estimulada por antígenos solúveis do *S. mansoni* poderia estar inibida nos períodos iniciais de cultura por outras citocinas produzidas simultaneamente pelas células mononucleares. A medida que as concentrações das citocinas inibitórias fossem decaindo, passaríamos a detectar a produção de níveis significativos de IL-13. Por outro lado, o aparecimento de citocinas estimuladoras da produção de IL-13 também poderia ocorrer, o que levaria a um aumento na produção desta citocina. A análise dos resultados obtidos mostra que o perfil de produção de IL-13 (figura 24) é muito similar ao perfil detectado para a produção de IL-5 (figura 22). Poderíamos especular que o perfil de citocinas presente neste microambiente no 5º dia de cultura estaria contribuindo para desenvolvimento e ativação de outros tipos celulares responsáveis pela produção de IL-5 e IL-13.

Após a investigação da produção de IL-13, avaliamos a produção de IFN- $\gamma$  na esquistossomose humana. O IFN- $\gamma$  é uma glicoproteína de 21 a 24 kD produzida por praticamente todas as células CD8<sup>+</sup> e por linfócitos T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1 (Bertagnolli, 1993). Células NK também são uma fonte, embora menor, de IFN- $\gamma$  (Bertagnolli, 1993). Esta citocina é também um potente ativador de fagócitos mononucleares capaz de elevar o "burst" oxidativo e a expressão de moléculas do MHC de classe II nestas células (Bertagnolli, 1993). Na esquistossomose murina existe um declínio da produção inicial de IFN- $\gamma$  que correlaciona-se com aumento na produção de IL-10 e o desenvolvimento das respostas do tipo Th<sub>2</sub> dirigidas contra os antígenos do ovo do parasita (Vella *et al.*, 1992). Estudos investigando a produção de IFN- $\gamma$  na esquistossomose humana (Willians *et al.*, 1994) não detectaram a produção de níveis significativos desta citocina por células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos após

a estimulação com antígenos do *S. mansoni*. Nós também não detectamos a presença de IFN- $\gamma$  após 24 e 48 horas de estimulação com os antígenos do *S. mansoni*. Entretanto, fomos capazes de detectar a produção de altos níveis de IFN- $\gamma$  após a estimulação com antígenos solúveis do *S. mansoni* no 5º dia de cultura (figura 25). A avaliação do padrão de produção de IFN $\gamma$  em indivíduos portadores de esquistossomose intestinal crônica revelou aspectos bastante interessantes. A alta produção de IFN- $\gamma$  no 5º dia de cultura (figura 25) correlaciona-se com um declínio na concentração de IL-10 neste mesmo período (figura 23). Provavelmente a produção de IFN- $\gamma$  é inibida pelas altas concentrações de IL-10 presentes nos períodos iniciais de cultura após estimulação com os antígenos do *S. mansoni*. Por outro lado, ainda não podemos estabelecer com precisão, quais seriam as prováveis interações existentes entre a produção de IL-5 e IL-13 e a produção de IFN- $\gamma$  no 5º dia de cultura. Também constatamos a produção desta citocina no 5º dia de formação de granuloma *in vitro* (figura 31). Os resultados obtidos mostram a produção de IFN- $\gamma$  em níveis estatisticamente elevados se comparados ao controle no 5º dia de formação de granuloma *in vitro* (figura 31) e sugerem o envolvimento desta citocina nos mecanismos de formação de granuloma *in vitro*. Além disto, estes dados abrem perspectivas para a investigação de uma série de novas questões. Seria o mesmo tipo celular capaz de produzir IL-5, IL-13 e IFN- $\gamma$  na esquistossomose humana ? Seriam células não T ? Seriam linfócitos Th<sub>0</sub> ? Teríamos mais de um tipo celular envolvido neste processo ? Seriam interações entre células não T e linfócitos Th<sub>0</sub> ? Diversas questões envolvendo o balanço da resposta Th<sub>1</sub>/Th<sub>2</sub> na esquistossomose humana ainda permanecem sem resposta. A lista de perguntas apresentada está longe de esgotar todas as lacunas do conhecimento atualmente existentes sobre a produção de citocinas e a regulação das respostas nesta parasitose.

A investigação da produção de TNF- $\alpha$  por células mononucleares de indivíduos esquistossomóticos acrescentou novos graus de complexidade à produção de citocinas na esquistossomose humana. Sabe-se que o TNF- $\alpha$  é uma proteína transmembrânica não-glicosilada de 25 kD quando presente na superfície de fagócitos mononucleares ativadas. A clivagem proteolítica da porção carboxi-termina extracelular libera um fragmento de 17 kD. O TNF- $\alpha$  solúvel presente na circulação é composto de três unidades de 17 kD sendo na realidade um homotrímero de 51 kD. O trimero é a forma que se liga aos receptores presentes nas membranas dos diversos tipos celulares (Bertagnolli, 1993).

Na esquistossomose experimental, macrófagos isolados do fígado de camundongos

infectados em fase aguda de infecção secretam mais TNF- $\alpha$  do que macrófagos isolados de camundongos em fase crônica (Joseph; Boros, 1993). A administração repetida de anticorpos policlonais anti-TNF $\alpha$  é capaz de suprimir significativamente o tamanho dos granulomas desenvolvidos em camundongos infectados na fase aguda da infecção. A administração de TNF $\alpha$  recombinante a camundongos na fase crônica da infecção aumenta o tamanho dos granulomas desenvolvidos no fígado e nos pulmões (Joseph; Boros, 1993). O TNF $\alpha$  também é capaz de restaurar a formação de granulomas em camundongos SCID infectados pelo *S. mansoni* (Amiri *et al.*, 1992) sugerindo um papel muito importante desta citocina nos processos de formação do granuloma.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a estimulação com antígenos solúveis do parasita induz a produção de TNF $\alpha$ . Esta produção é mais elevada nas primeiras 24-48 horas de cultura e declina após este período (figura 26). Lucaks *et al.* (1994b) afirmam que o mecanismo de formação do granuloma na esquistossomose deve ser mediado pela produção de TNF- $\alpha$  e pode estar associado a indução do aumento da expressão de ICAM-1 por esta citocina. Os nossos resultados indicam que, na esquistossomose humana, o TNF $\alpha$  também parece exercer um papel essencial nos processos de formação das reações granulomatosas (figura 32 e 36). Os resultados também sugerem que o TNF $\alpha$  tenha um papel essencial no processo de desenvolvimento de células gigantes multinucleadas nas reações granulomatosas, uma vez que os sobrenadantes de cultura obtidos destas reações apresentam atividade estimulatória para a formação de células gigantes *in vitro* (figuras 10 e 11).

#### **6.5- Consequências do desenvolvimento da resposta aos antígenos do *S. mansoni* sobre as funções de monócitos e macrófagos *in vitro*.**

Os dados deste trabalho mostraram a existência de um perfil diferenciado de produção de citocinas para cada modelo experimental investigado (blastogênese ou formação de granuloma *in vitro*). Este fato nos levou a realização de experimentos adicionais visando compreender quais seriam as consequências destas respostas desenvolvidas após a estimulação com os antígenos do *S. mansoni* sobre as funções das células da linhagem monocítica/macrofágica (figuras 33-36). De uma maneira geral, a estimulação com SEA ou SWAP solúveis apresentou consequências inibitórias sobre várias funções celulares. Verificamos que a estimulação com antígenos solúveis do parasita inibe a formação de células gigantes multinucleadas *in vitro* (figura 33), ao contrário do observado anteriormente para

antígenos imobilizados (figura 06). Provavelmente, o perfil de citocinas secretado após a estimulação com os antígenos solúveis do *S. mansoni* (figuras 21 a 26) origina um microambiente desfavorável a formação de células gigantes multinucleadas *in vitro*. Por outro lado, o perfil de citocinas secretado durante as reações granulomatosas *in vitro* (figuras 27 a 32) favorece a formação de células gigantes multinucleadas. Dentre as citocinas produzidas no modelo de formação de granuloma *in vitro*, tanto o IFN- $\gamma$  quanto o TNF- $\alpha$  já foram descritos como capazes de acelerar o processo de formação de células gigantes multinucleadas (Weiberg *et al.*, 1989; Takashima *et al.*, 1993). Uma vez que vários fatores solúveis já foram descritos na literatura como capazes de induzir à formação de células gigantes multinucleadas, acreditamos que a ação combinada de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e de outras citocinas não investigadas neste trabalho, poderia resultar no aumento observado na formação de células gigantes durante o desenvolvimento das reações de formação de granuloma. Outro efeito observado da estimulação com SEA ou SWAP solúveis sobre as funções de monócitos/macrófagos foi a inibição da atividade metabólica celular (avaliada pela redução de MTT). A estimulação com antígenos conjugados a microesferas de poliacrilamida apresentou efeitos opostos, elevando esta mesma atividade metabólica (figura 33).

Os dados obtidos mostram uma reatividade diferencial associada à natureza da estimulação antigênica. Estes fatos poderiam estar relacionados a aspectos, tais como:

- 1) Envolvimento de diferentes células apresentadoras de antígenos em cada caso,
- 2) Padrões diferentes de diferenciação das células produtoras de citocinas dependente da natureza da estimulação antigênica,
- 3) Produção de diferentes fatores solúveis e citocinas em cada caso, conforme foi descrito neste trabalho (figuras 21-32).

Acreditamos que a elevada produção de IL-10 após a estimulação com SEA ou SWAP solúveis (figura 23) e o aumento na produção de TNF- $\alpha$  após a estimulação com PB-SEA e PB-SWAP (figura 32) estejam envolvidos nestes mecanismos de regulação da atividade metabólica e da formação de células gigantes multinucleadas (figuras 33 e 34).

Os efeitos de antígenos solúveis sobre células mononucleares são geralmente avaliados em ensaios blastogênicos. Por outro lado, a reatividade diferencial nos levou a investigar quais seriam os níveis de proliferação celular frente a estimulação com antígenos imobilizados (PB-SEA ou PB-SWAP). Ao contrário do observado anteriormente, a estimulação com antígenos imobilizados não estimula a proliferação celular *in vitro* (figura 35). A análise do perfil de citocinas produzidas quando existe proliferação celular (modelo de estimulação com antígenos

solúveis), mostra que a IL-5 e a IL-13 são produzidas exclusivamente neste modelo. Durante o desenvolvimento da reação de formação de granuloma *in vitro*, estas citocinas não foram detectadas e também não foi constatada a estimulação da proliferação celular neste caso. Estes dados sugerem que estas citocinas (IL-5 e IL-13) poderiam, de alguma forma, estar envolvidas nos processos de proliferação celular estimulada por antígenos do *S. mansoni*. Os resultados mostrados neste trabalho revelam que estes dois modelos experimentais (ensaio blastogênico e formação de granuloma *in vitro*) avaliam fenômenos biológicos bem distintos.

Com relação a formação de granuloma *in vitro*, os nossos resultados indicam que este fenômeno parece ser dependente da produção de TNF- $\alpha$  por monócitos e macrófagos, enquanto que a IL-10 produzida após estimulação com os antígenos solúveis do *S. mansoni* apresenta um efeito oposto, sendo capaz de inibir a produção TNF- $\alpha$  por células da linhagem monocítica/macrofágica e levar a inibição da formação de granuloma *in vitro* na esquistossomose humana (figura 36). Na figura 39 apresentamos um modelo teórico proposto para a ação da IL-10 e do TNF- $\alpha$  sobre as funções de monócitos e macrófagos e os efeitos resultantes sobre a formação do granuloma na esquistossomose humana. A produção de altos níveis de IL-10 após a interação entre linfócitos T e células apresentadoras de antígenos levaria a uma redução na capacidade de produção de TNF- $\alpha$  por monócitos/macrófagos e a consequente modulação da formação do granuloma *in vitro* na esquistossomose humana.

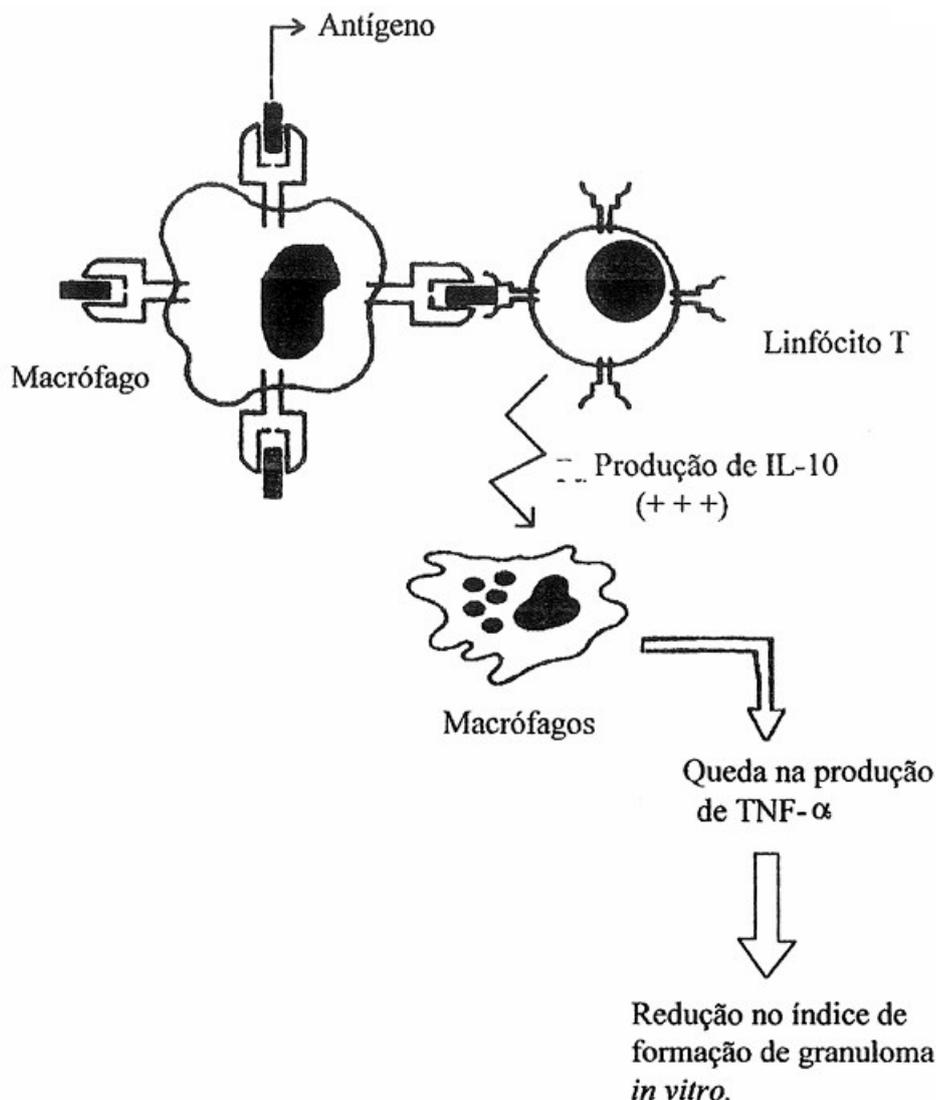


Figura 39: Modelo teórico proposto para a ação da IL-10 e do TNF- $\alpha$  sobre as funções de monócitos e macrófagos e os efeitos resultantes sobre a formação do granuloma na esquistossomose humana. A produção de altos níveis de IL-10 após a interação entre linfócitos T e células apresentadoras de antígenos levaria a uma redução na capacidade de produção de TNF- $\alpha$  por monócitos/macrófagos e à consequente modulação da formação do granuloma *in vitro* na esquistossomose humana.

A análise em conjunto de todos os resultados obtidos neste trabalho mostra a existência de um padrão bastante complexo de produção de citocinas, tanto pelos tipos quanto pela sequência em que são produzidas. Os resultados envolvendo as células da linhagem monocítica/macrofágica mostram a participação destas células, e do processo de diferenciação, em mecanismos de imunorregulação presentes na esquistossomose humana. Estes dados acrescentam novos graus de complexidade aos eventos envolvidos nas respostas imunológicas dirigidas aos antígenos do *S. mansoni* e devem ser importantes para a compreensão dos mecanismos envolvidos na formação e regulação das reações granulomatosas responsáveis pela imunopatologia na esquistossomose.

## 7- CONCLUSÕES:

Os resultados obtidos neste trabalho mostram a participação das células da linhagem monocítica/macrofágica, e do processo de diferenciação celular, nos mecanismos de regulação das respostas estimuladas pelos antígenos do *S. mansoni*. Além disto constatamos a existência de um padrão bastante complexo de produção de citocinas na esquistossomose humana, tanto pelos tipos de citocinas secretadas quanto pela sequência em que são produzidas. Os dados reforçam a idéia de que a formação e o desenvolvimento do granuloma envolve uma produção "orquestrada" de citocinas, possivelmente resultante da participação sequencial de diferentes populações celulares e em diferentes estados de diferenciação.

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ABDEL-SALAM, E.; ISHAAC, S.; MAHMOUD, A.A.F. Histocompatibility-linked susceptibility for hepatosplenomegaly in human schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 123, p. 1829-1831, 1979.

ABDEL-SALAM, E.; HIGASHI, G.I.; KAMAL, K.A.; ISHAAC, S. Cell mediated immune assay in children with *Schistosoma haematobium* infection and the effects of niridazole therapy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 75, p. 207-211, 1981.

ABDEL-SALAM, E.; ABDEL-KHALIK, A.; ABDEL-MEGUID, A.; BARAKAT, W.; MAHMOUD, A.A.F. Association of HLA class I antigens (A1, B5, B8 and CW2) with disease manifestations and infection in human schistosomiasis mansoni in Egypt. *Tissue Antigens*, Copenhagen, v. 27, p. 142-147, 1986.

ABE, E.; SHINA, Y.; MIYAURA, K.; TANAKA, H.; HAYASHI, T.; KANEGASAKI, S.; SAITO, M.; NISHII, Y.; DE LUCCA, H.F.; SUDA, T. Activation and fusion induced by 1-alpha,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> and their relation in alveolar macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, Washington, v. 81, p. 7112-7115, 1981.

ACOSTA, A. R.; GIRÓN, M. E.; AGUILAR, I. Secretion of macrophage fusion factor (MFF) by *Schistosoma* egg granulomas maintained *in vitro*. *Scandinavian Journal of Immunology*, Oxford, v. 35, p. 633-636, 1992.

ADAMS, D.O. The structure of mononuclear phagocytes differentiating *in vivo*. I. Sequential fine and histologic studies of the effect of *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG). *American Journal of Pathology*, Baltimore, v. 76, p. 17-48, 1974.

ADAMS, D.O. The granulomatous inflammatory response. *American Journal of Pathology*, Baltimore, v. 84, p. 164-191, 1976.

AKPON, C.A.; ABDEL-WAHAB, M.F.; WARREN, K.S. Comparison of formation of granulomata around eggs of *Schistosoma mansoni* in the mouse, guinea pig, rat, and hamster. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 19, p. 996-999, 1970.

ALISON, A.C.; ANDRADE, Z.A.; BRUNNER, K.T.; BUTTERWORTH, A.E.; CAPRON, A.; COHEN, S.; COLLEY, D.G.; COOMBS, R.R.A.; DAVID, J.R.; DAVIS, A.; HOFFMAN, D.B.; HOPWOOD, B.C.C.; HOUVA, V.; JORDAN, P.; LAMBERT, P.H.; MAHMOUD, A.A.F.; SHER, A.; SMITHERS, S.R.; STURROK, R.F.; TORRIGIANI, G.; WARREN, K.S.; WEBBE, G.; WEIGLE, G. Immunology of schistosomiasis. *Bulletin of the World Health Organization*, Geneva, v. 51, p. 553-595, 1974.

AMIRI, P.; LOCKSLEY, R.M.; PARSLAW, T.G.; SADICK, M.; RECTOR, E.; RITTER, D.; MCKERROW, J.H. Tumor necrosis factor restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*, Londres, v. 356, p. 604-606, 1992.

ANDERSEN, R.; OSTERHOLZ, J.; BROSS, K.J.; SCHULZ, A.; LUCKENBACK, G.A.; LOHR, G.W. Cytotoxic effector function at different stages of human monocyte-macrophage maturation. *Cancer Research*, Philadelphia, v. 43, p. 5931-5935, 1983.

ANDRADE, Z.A.; VAN MARK, E.A.E. Schistosomal glomerular disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 79, p. 499-506, 1984.

- ANDRADE, Z.A.; WARREN, K.S. Mild prolonged schistosomiasis in mice: alteration in host response with time and the development of portal fibrosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Londres, v. 58, p. 53-56, 1964.
- ANWAR, A.; SMITHERS, S.R.; KAY, A.B. Killing of schistosome of *Schistosoma mansoni* coated with antibody and/or complement by human leukocytes *in vitro*: Requirement for complement in preferential killing by eosinophils. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 122, p. 628-631, 1979.
- ARAÚJO, M.I.; DE JESUS, A.R.; BACELLAR, O.; SABIN, E.; PEARCE, E.; CARVALHO, E.M. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *European Journal of Immunology*, Weinheim, v. 26, p. 1399-1403, 1996.
- BARRAL-NETO, M.; HOFSTETER, J.; SANTOS, J.G.; CHEEVER, A.W.; OTTESEN, E.A. *Schistosoma mansoni* infection in man: Cellular immune response and modulating mechanisms. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 47, p. 65-71, 1982.
- BECKER, S.; WARREN, K.S.; HASKILL, S. Colony-stimulating factor induced monocyte survival and differentiation into macrophages in serum-free cultures. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 139, p. 3703-3710, 1987.
- BENTLEY, A.G.; PHILLIPS, M.S.; KANER, R.J.; THEODORIDES, V.J.; LINETTE, G.P.; DOUGHTY, B.L. *In vitro* delayed hypersensitivity granuloma formation: development of an antigen-coated bead model. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 134, p. 4163-4168, 1985.
- BERTAGNOLLI, M.M. *Cytokines and T lymphocytes. Therapeutic manipulation of the immune system*. Austin: R.G. Landes Company/CRC Press, 1993.
- BILHARZ, T. Further observations concerning *Distotomum haematobium* in the portal vein of man and its relationship to certain pathological formations. *Zeitschrift für Wissenschaftliche Zoologie*, Leipzig, v. 4, p. 72, 1853.
- BINA, J.C.; TAVARZ-NETO, J.; PRATA, A.; AZEVEDO, E.S. Greater resistance of development of severe schistosomiasis in Brazilian negroes. *Human Biology*, Detroit, v. 50, p. 41-49, 1978.
- BLANCHARD, D.K.; DJEU, J.Y. Differential modulation of surface antigens on human macrophages by IFN- $\gamma$  and GM-CSF. Effects on susceptibility to Lactobacillus lysis. *J. Leukocyte Biology*, New York, v. 50, p. 28-32, 1991.
- BLOCH, E.H. *In vivo* microscopy of Schistosomiasis. IV. The dynamics of the host-parasite response to *Schistosoma mansoni* in the hypodermal tissues as observed in transparent chambers in two susceptible hosts during primary and challenge infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 33, p. 899-910, 1984.
- BLUM, A.M. *et al.* Granuloma T lymphocytes in murine Schistosomiasis mansoni have somatostatin receptors and respond to somatostatin with decreased IFN- $\gamma$  secretion. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 149, p. 3621-3626, 1992.
- BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J. Exp. Med.*, New York, v. 174, p. 1549-1554, 1991.
- BOROS, D.L. *et al.* Delayed hypersensitivity, as manifested by granuloma formation, dermal reactivity, macrophage migration inhibition, and lymphocyte transformation, induced and elicited in guinea pigs with soluble antigens of *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 110, p. 1118-1123, 1973.

BOROS, D. L.; PELLE, R. P.; WARREN, K. S. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 114, p. 1437-1441, 1975.

BOROS, D.L.; LUKACS, N.W. The role of egg antigens, cytokines in granuloma formation in murine Schistosomiasis mansoni. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 87, p. 75-78, 1992.

BOROS, D.L.; WARREN, K.S. Delayed hypersensitivity type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Exp. Med.*, New York, v. 132, p. 448-507, 1970.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, New York, v. 72, p. 248-254, 1976.

BUCHANAN, R.D.; FINE, D.P.; COLLEY, D.G. *Schistosoma mansoni* infection in mice depleted of thymus-dependent lymphocytes. II. Pathology and altered pathogenesis. *Am. J. Pathol.*, Baltimore, v. 71, p. 207, 1973.

BUTTERWORTH, A. E.; STURROCK, R. F.; HOUBA, V.; REESS, P. H. Antibody-dependent cell mediated damage to schistosomula *in vitro*. *Nature*, Londres, v. 252, p. 503-508, 1974.

BUTTERWORTH, A.E. *et al.* Antibody-dependent mediated damage to Cr51 labelled *Schistosoma mansoni*, damage by purified eosinophils. *J. Exp. Med.*, New York, v. 145, p. 136-140, 1977a.

BUTTERWORTH, A.E. *et al.* Antibody-dependent eosinophil-mediated damage to Cr51 labeled schistosomula of *Schistosoma mansoni*: mediation by IgG and inhibition by antigen-antibody complex. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 118, p. 2230-2233, 1977b.

BUTTERWORTH, A.E. *et al.* Eosinophils as mediator of antibody dependent damage to schistosomula. *Nature*, London, v. 256, p. 727-731, 1975.

BYRAM, J.E.; VON LICHTENBERG, F. Altered schistosome granuloma formation in nude mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 26, p. 944-946, 1977.

CAPRON, M. *et al.* Rat mast cell-eosinophil interaction in antibody dependent eosinophil cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* schistosomula. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 121, p. 2518-2522, 1978.

CAPRON, M.; TORPIER, G.; CAPRON, A. *In vitro* killing of *Schistosoma mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: Role of cytophilic antibodies. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 123, p. 2220-2223, 1979.

CARTER, C.E.; COLLEY, D.G. An electrophoretic analysis of *Schistosoma mansoni* soluble egg antigenic preparation. *J. Parasitol.*, Lawrence, v. 64, p. 385-390, 1978.

CASTRO, A.G. *et al.* In vivo evidence for a non-T cell origin of interleukin-5. *Scand. J. Immunol.*, Oslo, v. 41, p. 288-292, 1995.

CHAMBERS, T.J. Multinucleated giant cell. *J. Pathol.*, London, v. 126, p. 125-148, 1978.

CHAVES, M.M. *et al.* Correlation between the lack of mononuclear cytotoxicity against schistosomula *in vitro* and inositolphosphate turnover in patients with schistosomiasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 23, p. 577-581, 1990.

CHAVES, M. M.; SILVESTRINI, A. A.; SILVA-TEIXEIRA, D. N.; NOGUEIRA MACHADO, J. A. Effect *in vitro* of gamma interferon and interleukin 10 on generation of oxidizing species by human granulocytes. *Inflammation Research*, Basel, v. 45, p. 313-315, 1996.

CHEEVER, A.W. Pipe-stem fibrosis of the liver. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, London, v. 66, p. 946-951, 1972.

CHEEVER, A. W. *et al.* Analysis of egg granuloma formation in *Schistosoma japonicum*-infected mice treated with antibodies to interleukin-5 and gamma interferon. *Infection and Immunity*, Washington, v. 59, p. 4071-4704, 1991.

CHEEVER, A.W. *et al.* Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansoni* infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 148, p. 3244-3248, 1992.

CHEEVER, A. W. *et al.* Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 153, p. 753-759, 1994.

CHENSUE, S.W.; BOROS, D.L. Populations dynamics of T and B lymphocytes in the lymphoid organs, circulation and granuloma of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Baltimore, v. 28, p. 291-295, 1979.

CHENSUE, S.W.; BOROS, D.L.; DAVID, C.S. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. II. T suppressor cell-derived, I-C subregion-encoded soluble suppressor factor mediates regulation of lymphokine production. *J. Exp. Med.*, New York, v. 157, p. 219-225, 1983.

CHENSUE, S. W. *et al.* Role of oxygen reactive species in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 122, p. 184-190, 1984.

CHENSUE, S. W. *et al.* Modulation of murine schistosomiasis by exogenously administered prostaglandins. *American Journal of Pathology*, Baltimore, v. 125, p. 28-34, 1986.

CHENSUE, S. W. *et al.* Monokine production by hypersensitivity (*Schistosoma mansoni* egg) and foreign body (Sephadex bead) type granuloma macrophages: evidence for sequential production of IL-1 and tumor necrosis factor. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 142, p. 1281-1285, 1989.

CHENSUE, S. W. *et al.* Role of IL-4 and IFN- $\gamma$  in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation: orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 148, p. 900-906, 1992.

CHENSUE, S. W. *et al.* In vivo regulation of macrophage IL-12 production during type 1 and type 2 cytokine-mediated granuloma formation. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 155, p. 3546-3551, 1995a.

CHENSUE, S. W. *et al.* Cytokine function during mycobacterial and schistosomal antigen-induced pulmonary granuloma formation: local and regional participation of IFN-gamma, IL-10 and TNF. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 154, p. 5969-5976, 1995b.

COELHO, C. O. M. O parasito - *Schistosoma mansoni*. In: CUNHA, A. S. (org.). *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1970. Cap. 1, p. 1-12.

COHN, Z. A. The structure and function of monocytes and macrophages. *Advances in Immunology*, New York, v. 9, p. 163-171, 1968.

COLLEY, D. G. The immunopathology of schistosomiasis. In: THOMPSON, R. A. (ed.). *Recent Advances in Clinical Immunology*. Londres: Churchill Livingstone, 1977a. v. 1, p. 101-123

COLLEY, D. G. The immunopathology of schistosomiasis. *Clinical Immunology*, Nova York, v. 1, p. 101-134, 1977b.

COLLEY, D. G. *et al.* Immune responses during human schistosomiasis. III. Regulatory effect of patient sera on human lymphocyte blastogenic responses to schistosomal antigen preparations. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 26, p. 917-925, 1977c.

COLLEY, D.G., LEWIS, F.A., GOODGAME, R.W. Immune responses during human schistosomiasis. IV. Induction of suppressor cell activity by schistosome antigen preparations and concanavalin-A. *J. Immunol.* v. 120, p. 1225-1232, 1978.

COLLEY, D.G. T-lymphocytes that contribute to the immunoregulation of granuloma formation in chronic murine schistosomiasis. *J. Immunol.* v. 126, p. 1465-1470, 1981a

COLLEY, D. G. Immune responses and immunoregulation in experimental and clinical schistosomiasis. In: MANSFIELD, J. M. (ed.). *Parasitic Diseases: The Immunology*. Nova York: Marcel Dekker, Inc., 1981b. v. 1, p. 1-83.

COLLEY, D. G. *et al.* Immune responses during human schistosomiasis. XII. Differential responsiveness in patients with hepatosplenic disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Northbrook, v. 35, p. 793-802, 1986.

COOK, G. A. *et al.* Lymphokine expression in granulomas of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Cellular Immunology*, New York, v. 152, p. 49-58, 1993.

COOK, G. A. *et al.* Molecular evidence that granuloma T lymphocytes in murine schistosomiasis mansoni express an authentic substance P (NK-1) receptor. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 152, p. 1830-1835, 1994.

CORREA-OLIVEIRA, R. *et al.* The human immune response to defined immunogens of *Schistosoma mansoni*: elevated antibody levels to paramyosin in stool-negative individuals from two endemic areas in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Londres, v. 83, p. 1205-1209, 1989.

COTTREL, B.; PYE, C.; BUTTERWORTH, A. Cytotoxic effects *in vitro* of human monocytes and macrophages on schistomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology*, Oxford, v. 11, p. 91-96, 1989.

COTTREL, B. J.; HUMBER, D.; STURROCK, R. F. An immunosuppressive factor in the serum of patients with schistosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Londres, v. 75, p. 415-416, 1980.

CUNHA, F. Q.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Interleukin-10 (IL-10) inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon-gamma in murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Nova York, v. 182, p. 1155-1160, 1992.

DAMIAN, R. T. Immunity in Schistosomiasis: A Holistic View. *Contemporary Topics in Immunobiology*, New York, v. 12, p. 359-421, 1984.

DEAN, D. A.; WISTAR, R.; MURREL, K. D. Combined *in vitro* effects of rat antibody and neutrophilic leukocytes on schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 23, p. 420-428, 1974.

DEAN, D. A.; WISTER, R.; CHEN, P. Immune response of guinea pig to *Schistosoma mansoni*. I- *In vitro* effects of antibody and neutrophils, eosinophils and macrophages on schistosomula. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 68, p. 70-73, 1975.

DEL PRETE, G. *et al.* Human IL-10 is produced by both type 1 (Th1) and type 2 (Th2) helper T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 150, p. 353-360, 1993.

DOENHOF, M. *et al.* *Schistosoma mansoni* infection in T-cell deprived mice and ameliorating effect of administrating homologous chronic infection serum. I. Pathogenesis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Baltimore, v. 28, p. 260-266, 1979.

DOMINGOS, E. O.; WARREN, K. S. Pathology and pathophysiology of the small intestine in murine schistosomiasis mansoni, including a review of the literature. *Gastroenterology*, Filadélfia, v. 56, p. 231-243, 1969.

DOUGHTY, B. L.; PHILLIPS, S. M. Delayed hypersensitivity granuloma formation and modulation around *Schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. II. Regulatory T cell subsets. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 128, p. 37-42, 1982a

DOUGHTY, B. L.; PHILLIPS, S. M. Delayed hypersensitivity granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. I. Definition of the model. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 128, p. 30-35, 1982b.

DOUGHTY, B. L.; ZODDA, D. M.; EL KHOLY, A.; PHILLIPS, S. M. Delayed type hypersensitivity granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. IV. Granuloma formation in human schistosomiasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Deerfield, v. 33, p. 1173-1177, 1984a.

DOUGHTY, B. L.; OTTESEN, E. A.; NASH, T. E.; PHILLIPS, S. M. Delayed hypersensitivity granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs *in vitro*. III. Granuloma formation and modulation in human schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 133, p. 993-997, 1984b.

DOUGHTY, B. L. *et al.* Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigen in human schistosomiasis. I. Granuloma formation and modulation around polyacrylamide antigen-conjugated beads. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 82, p. 47-54, 1987.

DOUGHTY, B. L. *et al.* Anti-idiotypic T cells in human schistosomiasis. *Immunological Investigations*, New York, v. 18, p. 373-388, 1989.

DUNN, M. A.; KAMEL, R.; KAMEL, I. A. Liver collagen synthesis in schistosomiasis mansoni. *Gastroenterology*, Filadélfia, v. 76, p. 978-982, 1979.

EL-CHEIKH, M. C.; BOROJEVIC, R. Extramedullary proliferation of eosinophil granulocytes in chronic schistosomiasis is mediated by a factor secreted by inflammatory macrophages. *Infection and Immunity*, Washington, v. 8, p. 816-821, 1990.

EL-CHEIKH, M. C.; DUTRA, H. S.; BOROJEVIC, R. Eosinophil granulocyte proliferation and differentiation in schistosomal granulomas are controlled by two cytokines. *Laboratory Investigation*, New York, v. 64, p. 93-97, 1991.

ELLNER, J. J.; OLDS, G. R.; KAMEL, R.; OSMAN, G. S.; EL-KHOLY, A.; MAHMOUD, A. A. F. Suppressor splenic T lymphocytes in human hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 125, p. 308-402, 1980.

ELLNER, J. J.; OLDS, G. R.; OSMAN, G. S.; EL-KHOLY, A.; MAHMOUD, A. A. F. Dichotomies in the reactivity to worm antigen in human schistosomiasis. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 126, p. 309-402, 1981.

EPPEL, B. A.; NEWELL, A. M.; BROWN, E. J. Adenosine receptors expressed during differentiation of monocytes to macrophages *in vitro*. I. Implications for the regulation of phagocytosis. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 143, p. 4141-4145, 1989.

EVELAND, L. K.; FRIED, B.; CHOEN, L. M. *Schistosoma mansoni* adult worm chemo alteration, with and without barriers. *Experimental Parasitology*, New York, v. 54, p. 271-276, 1982.

FAIS, S.; BURGIO, V. L.; SILVESTRI, M.; CAPOBIANCHI, M. R.; PACCHIAROTTI, A.; PALLONE, F. Multinucleated giant cell generation induced by interferon-gamma. Changes in the expression and distribution of the intercellular adhesion molecule-1 during macrophage fusion and multinucleated giant cell formation. *Laboratory Investigation*, New York, v. 71, p. 737-744, 1994.

FINKELMAN, F. D.; URBAN Jr, J. F. Cytokines: Making the right choice. *Parasitology Today*, Oxford, v. 8, p. 311-313, 1992.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 137, p. 3815-3822, 1991.

FISHER, A. C. A study of the schistosomiasis of the Stanleyville district of the Belgian Congo. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 28, p. 277-281, 1934.

FLORES-VILLANUEVA, P. O.; CHIKUNGUWO, S. M.; STADECKER, M. J. Role of IL-10 on antigen-presenting cell function for Schistosomal egg-specific monoclonal T helper cell responses *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 151, p. 3192-3198, 1993.

FLORES-VILLANUEVA, P. O.; HANS, R.; STADECKER, M. J. Regulation of T helper cell responses in experimental murine schistosomiasis by IL-10: Effect on expression of B-7 and B7-2 costimulatory molecules by macrophages. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 153, p. 5190-5199, 1994.

FLORES-VILLANUEVA, P. O.; ZHENG, X. X.; STROM, T. B.; STADECKER, M. J. Recombinant IL-10/FC treatment down-regulates egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 156, p. 3315-3320, 1996.

GAAFAR, T.; ISMAIL, S.; HELMY, M.; AFIFI, A.; GUIRGUIS, N.; EL-RIDI, R. Identification of *Schistosoma haematobium* soluble egg antigens that elicit human granuloma formation *in vitro*. *Parasitology Research*, Heidelberg, v. 79, p. 103-108, 1993.

- GAZZINELLI, G.; KATZ, N.; ROCHA, R.; COLLEY, D. G. Immune response during schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 130, p. 2891-2895, 1983.
- GAZZINELLI, G.; LAMBERTUCCI, J. R.; KATZ, N.; ROCHA, R. S.; LIMA, M. S.; COLLEY, D. G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XI. Immunological status of patients with acute infections and after treatment. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 135, p. 121-124, 1985.
- GAZZINELLI, G.; MONTESANO, M. A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; LIMA, M. S.; KATZ, N.; ROCHA, R. S.; COLLEY, D. G. Immune response in different clinical groups of schistosomiasis patients. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 82, p. 95-100, 1987.
- GAZZINELLI, R. T. *et al.* IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 148, p. 1792-1796, 1992.
- GEISLER, K. *et al.* Effects of recombinant human colony stimulatory factor (CSF) (granulocyte-macrophage CSF, granulocyte-CSF-1 e CSF1) on human monocyte/macrophage differentiation. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 143, p. 140-147, 1989.
- GILMAN, T.; WRIGHT, L. J. Probable *in vivo* origin of multinucleated giant cell from circulating mononuclear cells. *Nature*, Londres, v. 209, p. 263-265, 1966.
- GOES, A. M. *et al.* Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigens in human schistosomiasis. III. In vitro granuloma modulation induced by immune complexes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Deerfield, v. 44, p. 434-443, 1991.
- GOES, A. M. *et al.* Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* egg antigen in human schistosomiasis. IV. A role for prostaglandins *in vitro* granuloma modulation induced by immune complexes. *Parasite Immunology*, Hoboken, v. 16, p. 11-18, 1994.
- GORDON, R. M.; GRIFFITHS, R. B. Observations on the means by which cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin together with an account of certain morphological changes observed in the newly penetrated larvae. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, Londres, v. 45, p. 227-243, 1951.
- GOUD, T. J. L. M. *et al.* Identification and characterization of the monoblast in mononuclear phagocyte colonies grown *in vitro*. *Journal of Experimental Medicine*, Nova York, v. 142, p. 1180-1189, 1975.
- GREGORY, S. H. *et al.* In vivo molecular analysis of lymphokines involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 148, p. 2261-2269, 1992.
- HAMILTON, J. A. Colony stimulating factors, cytokines and monocyte-macrophages: some controversies. *Immunology Today*, Amsterdã, v. 14, p. 18-20, 1993.
- HANG, L. M.; WARREN, K. S.; BOROS, D. L. *Schistosoma mansoni*: antigenic secretions and the etiology of egg granulomas in mice. *Experimental Parasitology*, Nova York, v. 35, p. 288-298, 1974.
- HASSAN, N. F. *et al.* Induction of multinucleated giant cell formation from human blood derived monocytes by phorbol myristate acetate in *in vitro* culture. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 143, p. 2179-2184, 1989.

HEMLER, M. E. VLA proteins in the integrin family: structure, functions, and their role on leukocytes. *Annual Review of Immunology*, Palo Alto, v. 8, p. 365-400, 1990.

HENDERSON, G. S. *et al.* In vivo molecular analysis of lymphokines involved in the murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 147, p. 992-997, 1991.

HENDERSON, G. S. *et al.* In vivo molecular analysis of lymphokine involved in murine immune response during *Schistosoma mansoni* infection. II Quantification of IL-4 mRNA, and IL-2 mRNA levels in the granulomatous livers, mesenteric lymph nodes, and spleens during the course of modulation. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 148, p. 2261-2269, 1992.

HIATI, R. A. *et al.* Factors in the pathogenesis of acute *schistosomiasis mansoni*. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 139, p. 659-666, 1979.

HILL, J. O. CD4<sup>+</sup> T cells cause multinucleated giant cells to form around *Cryptococcus neoformans* and confine the yeast within the primary site of infection in the respiratory tract. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 175, p. 1685-1690, 1992.

HIRSCH, C. Caracterização parcial de frações antigênicas do verme adulto do *Schistosoma mansoni*. 1992. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1992.

HIRSCH, C.; GOES, A. M. Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation *in vitro*. *Parasitology*, Cambridge, v. 112, p. 529-535, 1996.

HOWARD, M.; O'GARRA, A. Biological properties of interleukin 10. *Immunology Today*, Oxford, v. 13, p. 198-200, 1992.

HURME, M.; VIEHERLUOTO, J.; NORDSTROM, T. The effect of calcium mobilization on LPS-induced IL-1B production depends on the differentiation stage of the monocytes/macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology*, Copenhagen, v. 36, p. 507-511, 1992.

HYNES, R. O. Integrins: versatility modulation and signaling in cell adhesion. *Cell*, Cambridge, v. 69, p. 11-25, 1992.

JAMES, S. L.; COOK, K. W.; LAZDINS, J. K. Activation of human monocyte-derived macrophages to kill schistosomula of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 145, p. 2686-2891, 1990.

JANSON, R. W.; JOSLIN, F. G.; AREND, W. P. The effects of differentiating agents on IL-1-beta production in cultured human monocytes. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 145, p. 2161-2166, 1990.

JOHNSON, W. D.; MEI, B. J.; COHN, Z. A. The separation, long-term cultivation and maturation of the human monocyte. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 146, p. 1613-1628, 1977.

JORDAN, P.; WEBBE, G. *Schistosomiasis: Epidemiology, treatment and control*. London: William Heinemann Medical Books Ltd., 1982.

JOSEPH, A. L.; BOROS, D. L. Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 151, p. 5461-5471, 1993.

KAMAL, K. A.; HIGASHI, G. I. Suppression of mitogen-induced lymphocyte transformation by plasma from patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni: role of immune complexes. *Parasite Immunology*, Oxford, v. 4, p. 283-289, 1982.

KATSURADA, F. *Schistosoma japonicum*, a new parasite of man, by which an endemic disease in various areas of Japan is caused. *Annotationes Zoologicae Japonenses*, Tokyo, v. 5, p. 146, 1904.

KAZURA, J. W.; MAHMOUD, A. A. F.; KARB, K. S.; WARREN, K. S. The lymphokine eosinophil stimulation promoter on human schistosomiasis mansoni. *Journal of Infectious Diseases*, Chicago, v. 132, p. 702-706, 1975.

KAZURA, J. W.; FANMING, M. N.; BLUMMER, T. L.; MAHMOUD, A. A. F. Role of cell-generated hydrogen peroxide in granulocyte-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Journal of Clinical Investigation*, New York, v. 67, p. 93-97, 1981.

KING, C. L. *et al.* Cytokine control of parasite-specific anergy in human urinary schistosomiasis. IL-10 modulates lymphocyte reactivity. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 156, p. 4715-4721, 1996.

KUNKEL, S. L.; CHENSUE, S. W.; MOUTON, C.; HIGASHI, G. I. Role of lipoxigenase products in murine pulmonary granuloma formation. *Journal of Clinical Investigation*, New York, v. 74, p. 514-524, 1984.

LAMMIE, P. J.; LINETTE, G. P.; PHILLIPS, S. M. Characterization of *Schistosoma mansoni* antigen-reactive T cell clones that form granulomas *in vitro*. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 134, p. 4170-4175, 1985.

LAMMIE, P. J. *et al.* *In vitro* granuloma formation using defined antigenic nidi. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v. 465, p. 341-346, 1986.

LANGLEY, J. C.; BOROS, D. L. T-lymphocyte responsiveness in murine schistosomiasis mansoni is dependent upon the adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, lymphocyte function-associated antigen-1, and very late antigen-4. *Infection and Immunity*, Washington, v. 63, p. 3980-3986, 1995.

LATTIME, S. C.; STOPACCIARO, A.; STUTMAN, O. Limiting dilution analysis of TNF- $\alpha$  producing cells in C3H/HeJ mice. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 141, p. 3422-3428, 1988.

LEWIS, W. H. The formation of giant cells in tissue cultures and their similarity to those in tuberculosis lesions. *Annual Review of Tuberculosis*, Chicago, v. 15, p. 616, 1927.

LIMA, M. S. *et al.* Demonstration of leukocyte inhibitory factor in human schistosomiasis mansoni and its evaluation from patients in an endemic setting. *Clinical Immunology and Pathology*, Philadelphia, v. 37, p. 351-359, 1985.

LIMA, M. S. *et al.* Immune responses during human schistosomiasis mansoni. Evidence for anti-idiotypic T lymphocyte responsiveness. *Journal of Clinical Investigation*, New York, v. 78, p. 983-988, 1986.

- LUKACS, N. W. *et al.* The role of macrophage inflammatory protein 1 alpha in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 177, p. 1551-1559, 1993.
- LUKACS, N. W. *et al.* Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF- $\alpha$ -inducible intercellular adhesion molecule-1. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 152, p. 5883-5889, 1994.
- MACKENZIE, C. D. *et al.* Antibody-mediated adherence of rat eosinophils to schistosomula of *Schistosoma mansoni* *in vitro*. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 30, p. 97-101, 1977.
- MARIANO, M.; SPECTOR, W. G. The formation and properties of macrophage polykaryons (inflammatory giant cells). *Journal of Pathology*, London, v. 113, p. 1-19, 1974.
- MATHEWS, R. C.; BOROS, D. L. Regulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis. III. Recruitment of antigen-specific I-J<sup>+</sup> T suppressor cells of the granulomatous response by an I-J<sup>+</sup> soluble suppressor factor. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 136, p. 1093-1099, 1986.
- MCINNES, A.; RENNICK, D. M. Interleukin 4 induces culture monocyte/macrophage to form giant multinucleated cells. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 167, p. 598-611, 1988.
- MENSON, E. N.; WILSON, R. A. Lung-phase immunity to *Schistosoma mansoni*. Flow cytometric analysis of macrophage activation states in vaccinated mice. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 143, p. 2342-2348, 1989.
- MILLER, P.; WILSON, R. Q. Migration of schistosomulum of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. *Parasitology*, v. 77, p. 281-302, 1978.
- MINTY, A. *et al.* Interleukin-13 is a new human lymphokine regulating inflammatory and immune responses. *Nature*, London, v. 362, p. 248-251, 1993.
- MOORE, D. L.; GROVE, D. I.; WARREN, K. S. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell population. *Journal of Pathology*, London, v. 121, p. 41, 1977.
- MOSER, G.; SHER, A. Studies of the antibody-dependent killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* employing hapten and target antigen. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 126, p. 1025-1029, 1982.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GREDLIN, M. A.; COFFMANN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profile of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 136, p. 2348-2357, 1986.
- MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W. The role of IL-10 in cross regulation of TH1 and TH2 responses. *Immunology Today*, Amsterdã, v. 12, p. 49-53, 1991.
- NASH, T. E. *et al.* Schistosome infection in humans: perspectives and recent findings. *Annals of Internal Medicine*, Philadelphia, v. 97, p. 740-754, 1982.

NIMER, S. D.; GATES, M. J.; KOEFFLER, H. P.; GASSON, J. C. Multiple mechanisms control the expression of granulocyte-macrophage colony stimulating factor by human fibroblasts. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 7, p. 2374-2377, 1989.

NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; GONTIJO, C. M.; GAZZINELLI, G.; KATZ, N. *Schistosoma mansoni*: Inhibition of "in vitro" granulocyte cytotoxicity against schistosomula by autologous mononuclear cells from patients. *Experimental Parasitology*, San Diego, v. 56, p. 180-185, 1983.

NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; NOVATO-SILVA, E.; SOUSA, M. F.; KRITZ, G. V. *Schistosoma mansoni*: Cell-mediated immunity evaluated by antigen induced by Leukocyte Adherence Inhibition Assay. *Immunology Letters*, Amsterdã, v. 9, p. 39-42, 1985.

NOVATO-SILVA, E.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; GAZZINELLI, G. *Schistosoma mansoni*: Comparison of the killing effect of granulocytes and complement with or without antibody on fresh and cultured schistosomula "in vitro". *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Northbrook, v. 29, p. 1263-1265, 1980.

ORENTAS, R. J.; REINLIB, L.; HILDRETH, J. E. Anti-class II MHC antibody induces multinucleated giant cell formation from peripheral blood monocytes. *J. Leukocyte Biology*, Bethesda, v. 51, p. 199-209, 1992.

OSWALD, I. P.; WYNN, T. A.; SHER, A.; JAMES, S. L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 89, p. 8676-8680, 1992.

OSWALD, I.; ELTOUM, T. A.; WYNN, B.; SCHWARTZ, P.; CASPAR, D.; PAULIN, A.; SHER, A.; JAMES, S. L. Endothelial cells are activated by cytokine treatment to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through the production of nitric oxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 91, p. 999-1003, 1994.

OTTESEN, E. A. Modulation of host response in human schistosomiasis I. Adherent suppressor cells that inhibit lymphocyte proliferative response to parasite antigens. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 123, p. 1639-1644, 1979.

OTTESEN, E. A.; HIATI, R. A.; CHEEVER, A. W.; SOTOMAYOR, Z. R.; NEVA, F. A. The acquisition and loss of antigen-specific cellular immune responsiveness in acute and chronic schistosomiasis in man. *Clinical and Experimental Immunology*, Hoboken, v. 33, p. 38-47, 1978.

OTTESEN, E. A.; POINDEXTER, R. W. Modulation of the host response in human schistosomiasis. II. Humoral factors which inhibit lymphocyte proliferative responses to parasite antigens. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Northbrook, v. 29, p. 592-597, 1980.

PARRA, J. C.; LIMA, M. S.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D. G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XV. Anti-idiotypic T cells can recognize and respond to anti-SEA idiotypes directly. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 140, p. 2401-2405, 1988.

PAUL, W. E.; OHARA, J. B-cell stimulatory factor 1/interleukin 4. *Annual Review of Immunology*, Palo Alto, v. 5, p. 429-481, 1987.

PEARCE, E. J.; SHER, A. Functional dichotomy in the CD4+ T cell response to *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology*, Amsterdam, v. 73, p. 110-115, 1991.

PEARCE, E. J.; APPLETON, J. Production of immunomodulatory neuropeptides by *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Today*, Cambridge, v. 8, p. 353-356, 1992.

PEARCE, E. J.; CASPAR, P.; GRZYCH, J. M.; LEWIS, F. A.; SHER, A. Down-regulation of Th1, cytokine production accompanies induction of Th2 response by parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 173, p. 159-166, 1991.

PEMBERTON, R. M.; MALAQUIAS, L. C. C.; FALCÃO, P. L.; SILVEIRA, A. M. S.; RABELLO, A. L. T.; KATZ, N.; AMORIM, M.; MOUNTFORD, A. P.; COFFMAN, R. L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; WILSON, R. A. Evaluation of mechanisms operating against lung-stage parasites which might be exploited in a vaccine. *Tropical and Geographical Medicine*, Amsterdam, v. 46, p. 247-254, 1994.

PEREIRA, L. H.; COELHO, P. M. Z.; FONSECA, J. J. A.; BREDT, A.; PELLEGRINO, J. Migration of *Schistosoma mansoni* larvae in the albino mouse. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 14, p. 301, 1972.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. *Parasitologia médica*. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. 872 p.

PHILLIPS, S. M.; COLLEY, D. G. Immunologic aspects of host responses to schistosomiasis: resistance, immunopathology and eosinophil involvement. *Progress in Allergy*, Basel, v. 24, p. 46-58, 1978.

PHILLIPS, S. M.; DICONZA, J. J.; GOLD, J. A.; REID, W. A. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I. Thymic dependence of eosinophilia, granuloma formation and host morbidity. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 118, p. 594-600, 1977.

PHILLIPS, S. M.; LAMMIE, P. J. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis. *Parasitology Today*, Cambridge, v. 2, p. 296-301, 1986.

PHILLIPS, S. M.; REID, W. A.; DOUGHTY, B. L.; BENTLEY, A. G. The immunologic modulation of morbidity in schistosomiasis studies in athymic mice and *in vitro* granuloma formation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Northbrook, v. 29, p. 820-821, 1980.

PHIPPS, R. P.; STEIN, S. H.; ROPER, R. L. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. *Immunology Today*, Cambridge, v. 12, p. 349-351, 1991.

POBER, J. S.; GIMBRONE, M. A.; LAPIERRE, L. A. Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 137, p. 1893-1899, 1986.

POBER, J. S.; LAPIERRE, L. A.; STOLPEN, A. H. Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 138, p. 3319-3325, 1987.

POSTELTHWAITE, A. E.; JACKSON, B. K.; BEACHEY, E. H.; KANG, A. H. Formation of multinucleated giant cell from human monocyte precursors. Mediation by a soluble protein from antigen and mitogen stimulated lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 155, p. 168-178, 1982.

- RAMADAN, M. A.; GABR, N. S.; BACHA, P.; GUNZLER, V.; PHILLIPS, S. M. Suppression of immunopathology in schistosomiasis by interleukin-2-targeted fusion toxin DAB389IL-2. 1. Studies of *in vitro* and *in vivo* efficacy. *Cellular Immunology*, Orlando, v. 166, p. 217-226, 1995.
- RAMALHO-PINTO, F. J.; McLAREN, D. J.; SMITHERS, S. R. Complement mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils "*in vitro*". *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 147, p. 147-156, 1978.
- RENKONEN, R. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on endothelial cells with correlation to lymphocyte-endothelial binding. *Scandinavian Journal of Immunology*, Oxford, v. 29, p. 717-721, 1989.
- REZENDE, S. A.; MIRANDA, T. C. L.; FERREIRA, M. G.; GOES, A. M. In vitro granuloma modulation by immune complexes in human Schistosomiasis mansoni. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 26, p. 207-211, 1993.
- ROBERTS, M.; BUTTERWORTH, A. E.; KIMANI, G.; KAMAU, T.; FULFORD, A. J. C.; DUNNE, D. W.; OUMA, J. H.; STURROCK, R. F. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between cellular responses and resistance to reinfection. *Infection and Immunity*, Washington, v. 61, p. 4984-4993, 1993.
- ROCKLIN, R. E. *et al.* Factor that modify the cellular immune response in patients infected by *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 125, p. 1916-1920, 1980.
- ROCKLIN, R. E.; TRACY, J. W.; EL KHOLY, A. Activation of antigen-specific suppressor cells in human schistosomiasis mansoni by fractions of soluble egg antigens nonadherent to Con A Sepharose. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 127, p. 2314-2318, 1981.
- ROKITANSKY, C. Lehrbuch der pathologischem. Anatomic. 3rd ed. Vienna: Braumuller, 1885. v. 1, p. 295.
- ROMAGNANI, S. Biology of human Th1 and Th2 cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 15, p. 121-129, 1995.
- ROUVIEX, B.; DEROVIN, F.; LEVACHER, M. Evaluation of cellular immune response during chronic schistosomiasis in human by the leucocyte aggregation test and leucocyte migration inhibition test. *Journal of Clinical Microbiology*, Washington, v. 21, p. 649-651, 1995.
- RUFF, M. R.; GIFFORD, G. E. Purification and physicochemical characterization of rabbit tumor necrosis factor. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 125, p. 1671-1677, 1980.
- RUPPER, T. J.; PETERS, J. H. IL-6 and IL-1 Enhance the accessory activity of human blood monocytes during differentiation to macrophages. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 146, p. 144-149, 1991.
- SAMBON, L. W. Remarks on *Schistosoma mansoni*. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 10, p. 303, 1907.
- SCHLESINGER, L.; MUSSON, R. A.; JOHNSTON, R. B. Functional and biochemical studies of multinucleated giant cells derived from the culture of human monocytes. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 159, p. 1289-1294, 1984.
- SECOR, W. E. *et al.* Soluble intercellular adhesion molecules in human schistosomiasis: correlations with disease severity and decreased responsiveness to egg antigens. *Infection and Immunity*, Washington, v. 62, p. 2695-2701, 1994.

SHER, A. *et al.* Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 87, p. 61-65, 1990.

SHIKAMA, Y. *et al.* Granuloma formation by artificial microparticles *in vitro*. Macrophages and monokines play a critical role in granuloma formation. *American Journal of Pathology*, Baltimore, v. 134, p. 1189-1199, 1989.

SILVA-TEIXEIRA, D. N. *et al.* Human giant cell formation induced by *Schistosoma mansoni* antigens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, Ribeirão Preto, v. 26, p. 609-613, 1993.

SILVA-TEIXEIRA, D. N.; DOUGHTY, B. L.; GOES, A. M. Human Schistosomiasis: modulation of *in vitro* granulomatous hypersensitivity and lymphocyte proliferative responses by macrophages undergoing differentiation. *Scandinavian Journal of Immunology*, Copenhagen, v. 44, p. 522-529, 1996.

SLUITER, W. *et al.* Macrophages as origin of factor increasing monocytopoiesis. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 166, p. 909-922, 1987.

SMITH, M. D. The ultrastructural development of the *Schistosoma* egg granuloma in mice. *Parasitology*, Cambridge, v. 75, p. 119-123, 1977.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology*, Cambridge, v. 55, p. 565, 1965.

STANDEN, D. The penetration of cercariae of *Schistosoma mansoni* into the skin and lymphatics of the mouse. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 42, p. 292-298, 1953.

STENGER, R. J.; WARREN, K. S.; JOHNSON, F. A. An ultrastructural study of hepatic granuloma and schistosome egg shells in murine hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Experimental and Molecular Pathology*, New York, v. 8, p. 116-121, 1967.

STRIETER, R. M. *et al.* Differential regulation of tumor necrosis factor alpha in human alveolar macrophages and peripheral blood monocytes: A cellular and molecular analysis. *American Journal of Cellular and Molecular Biology*, New York, v. 1, p. 57-63, 1989.

TABATA, N. *et al.* Expression of fusion regulatory proteins (FRPs) on human peripheral blood monocytes. Induction of homotypic cell aggregation and formation of multinucleated giant cells by anti-FRP-1 monoclonal antibodies. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 153, p. 3256-3266, 1994.

TAGA, K.; TOSATO, G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 148, p. 1143-1148, 1992.

TAKASHIMA, T. *et al.* Differential regulation of formation of multinucleated giant cells from concanavalin A-stimulated human blood monocytes by IFN-gamma and IL-4. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 150, p. 3002-3010, 1993.

TAKATSU, K.; TAKAKI, S.; HITOSHI, Y. Interleukin-5 and its receptor system: Implications in the immune system and inflammation. *Advances in Immunology*, San Diego, v. 57, p. 145-170, 1994.

THORSBY, E.; BRATLIER, A. A rapid method for preparation of pure lymphocyte suspensions. In: TERASAKI, P. I. (Ed.). *Histocompatibility testing*. Copenhagen: Munksgaard, 1970. p. 665.

TODD, C. W.; GOODGAME, R. M.; COLLEY, D. G. Immune response during human *schistosomiasis mansoni*. V. Suppression of schistosome antigen-specific lymphocyte blastogenesis by adherent/phagocytic cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 122, p. 1440-1446, 1979.

TOSSI, Z. *et al.* Decreased production of TGF- $\beta$ 1 by human alveolar macrophages compared with blood monocytes. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 156, p. 3461-3468, 1996.

TRIPP, C. S. *et al.* Macrophages isolated from liver granulomas of murine *Schistosoma mansoni* synthesize predominantly TxA<sub>2</sub> during the acute and chronic phases of infection. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 140, p. 3140-3143, 1988.

TWEARDY, D. J. *et al.* Abnormalities of immunosuppression in patients with hepatosplenic schistosomiasis. *Transactions of the Association of American Physicians*, Philadelphia, v. 96, p. 392-400, 1983.

VADAS, M. A. *et al.* A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils and a comparison of the ability of these cells to damage schistosome of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 122, p. 1228-1232, 1979.

VADAS, M. A. *et al.* Functional studies on purified eosinophils and neutrophils from patients with *Schistosoma mansoni* infections. *Clinical and Experimental Immunology*, Oxford, v. 39, p. 683-689, 1980.

VAN DER MEER, J. W. M. *et al.* Characteristics of human monocytes cultured in the teflon culture bag. *Immunology*, Oxford, v. 47, p. 617-625, 1982.

VAN FURTH, R.; SLUITER, W. Current views on the ontogeny of macrophages and the humoral regulation of monocytopoiesis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 5, p. 614-619, 1983.

VAN MARCK, E. A. E. *et al.* The implantation of Sepharose beads in mouse livers as an aid in the study of hepatic schistosomal fibrosis. *Experientia*, Basel, v. 36, p. 1116, 1980

VELLA, A. T.; PEARCE, E. J. CD4<sup>+</sup> Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, Th0-like stage. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 148, p. 2283-2290, 1992

VELLA, A. T.; HULSEBOSH, M. D.; PEARCE, E. J. *Schistosoma mansoni* eggs induce antigen-responsive CD44<sup>hi</sup> T helper 2 cells and IL-4-secreting CD44<sup>lo</sup> cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 149, p. 1714-1722, 1992

VIANA, I. R. C. *et al.* Interferon- $\gamma$  production by peripheral blood mononuclear cells from residents of an area endemic for *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 88, p. 466-470, 1994.

VIGNALI, D. A. A.; BICKLE, Q. D.; TAYLOR, M. G. Studies on immunity to *Schistosoma mansoni in vivo*: whole body irradiation has no effect on vaccine-induced resistance in mice. *Parasitology*, Cambridge, v. 96, p. 49-61, 1988.

VOGE, M.; PHICE, Z.; BRUCHMER, D. A. Changes in the tegumental surface during development of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Parasitology*, Lawrence, v. 64, p. 585-589, 1978.

VON LICHTENBERG, F. Host response to eggs of *S. mansoni*. I. Granuloma formation in the unsensitized laboratory mouse. *American Journal of Pathology*, Bethesda, v. 41, p. 711, 1962.

VON LICHTENBERG, F. Consequences of infections with schistosomes. In: The biology of schistosomes. London: Academic Press Limited, 1987. p. 184.

WAHL, S. M. *et al.* Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 84, p. 5788-5792, 1987.

WARREN, K. S. The contribution of worm burden and host response to the development of hepatosplenic schistosomiasis *mansoni* in mice. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Northbrook, v. 12, p. 34-39, 1963.

WARREN, K. S. The pathogenesis of "clay-pipe stem cirrhosis" in mice with chronic schistosomiasis *mansoni* with a note on the longevity of the schistosomes. *American Journal of Pathology*, Bethesda, v. 49, p. 477, 1966.

WARREN, K. S. Pipe-stem fibrosis of the liver. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 66, p. 948-953, 1972b.

WARREN, K. S. The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, London, v. 66, p. 417-432, 1972a.

WARREN, K. S. Regulation of the prevalence and intensity of schistosomiasis in man. Immunology or ecology? *Journal of Infectious Diseases*, Oxford, v. 127, p. 595-609, 1973.

WARREN, K. S. The pathology, pathobiology and pathogenesis of schistosomiasis. *Nature*, London, v. 273, p. 609-612, 1978.

WARREN, K. S. The secret of the immunopathogenesis of schistosomiasis: *in vivo* models. *Immunological Reviews*, Copenhagen, v. 61, p. 189-194, 1982.

WARREN, K. S.; DOMINGO, E. C.; COWAN, R. B. T. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Northbrook, v. 51, p. 735-756, 1967.

WEIBERG, J. B.; HOBBS, M. M.; MISUKONIS, M. A. Recombinant human gamma interferon induces human polykaryon formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Washington, v. 81, p. 4554-4559, 1989.

WEINSTOCK, S. W.; CHENSUE, D. L.; BOROS, D. Modulation of granulomatous hypersensitivity. V. Participation of histamine receptor positive and negative lymphocytes in the granulomatous response of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 130, p. 423-427, 1983.

WELLHAUSEN, S. R.; BOROS, D. L. Characterization and functional analysis of inflammatory lymphocytes isolated from liver granuloma of *S. mansoni* infected mice. *Federation Proceedings*, Bethesda, v. 40, p. 1002, 1981.

WILLIAMS, M. E. *et al.* Leukocytes of patients with *Schistosoma mansoni* respond with a TH2 pattern of cytokine production to mitogen or egg antigens but with a Th0 pattern to worm antigens. *Journal of Infectious Diseases*, Oxford, v. 170, p. 946-954, 1994.

WYLER, D. J.; SADHAMA, P.; LIBBY, P. Mesenchymal target cell specificity of egg granuloma-derived fibroblast growth factor in schistosomiasis. *Journal of Infectious Diseases*, Oxford, v. 155, p. 728-735, 1987.

WYNN, T. A. *et al.* An IL-12-based vaccination for preventing fibrosis induced by schistosome infection. *Nature*, London, v. 376, p. 594-596, 1995a.

WYNN, T. A. *et al.* IL-12 exacerbates rather than suppress T helper 2-dependent pathology in the absence of endogenous IFN-gamma. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 154, p. 3999-4009, 1995b.

WYNN, T. A. *et al.* Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 151, p. 1430-1440, 1993.

WYNN, T. A. *et al.* Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. *Journal of Experimental Medicine*, New York, v. 179, p. 1551-1561, 1994.

YSSEL, H. *et al.* IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *Journal of Immunology*, Baltimore, v. 149, p. 2378-2384, 1992.

ZUCKERMAN, S. H.; ACKERMAN, S. K.; DOUGLAS, S. D. Long term human peripheral blood monocyte-macrophage cell culture. *Immunology*, Oxford, v. 38, p. 401-411, 1979.

ZWINGENBERGER, K. *et al.* Release of IL-2 and gamma interferon by peripheral mononuclear cells in human *Schistosoma mansoni* infection normalizes after chemotherapy. *Scandinavian Journal of Immunology*, Copenhagen, v. 30, p. 463-471, 1989.

ZWINGENBERGER, K. *et al.* Impaired balance of interleukin-4 and interferon- $\gamma$  production in infections with *Schistosoma mansoni* and intestinal nematodes. *Scandinavian Journal of Immunology*, Copenhagen, v. 34, p. 243-251, 1991.