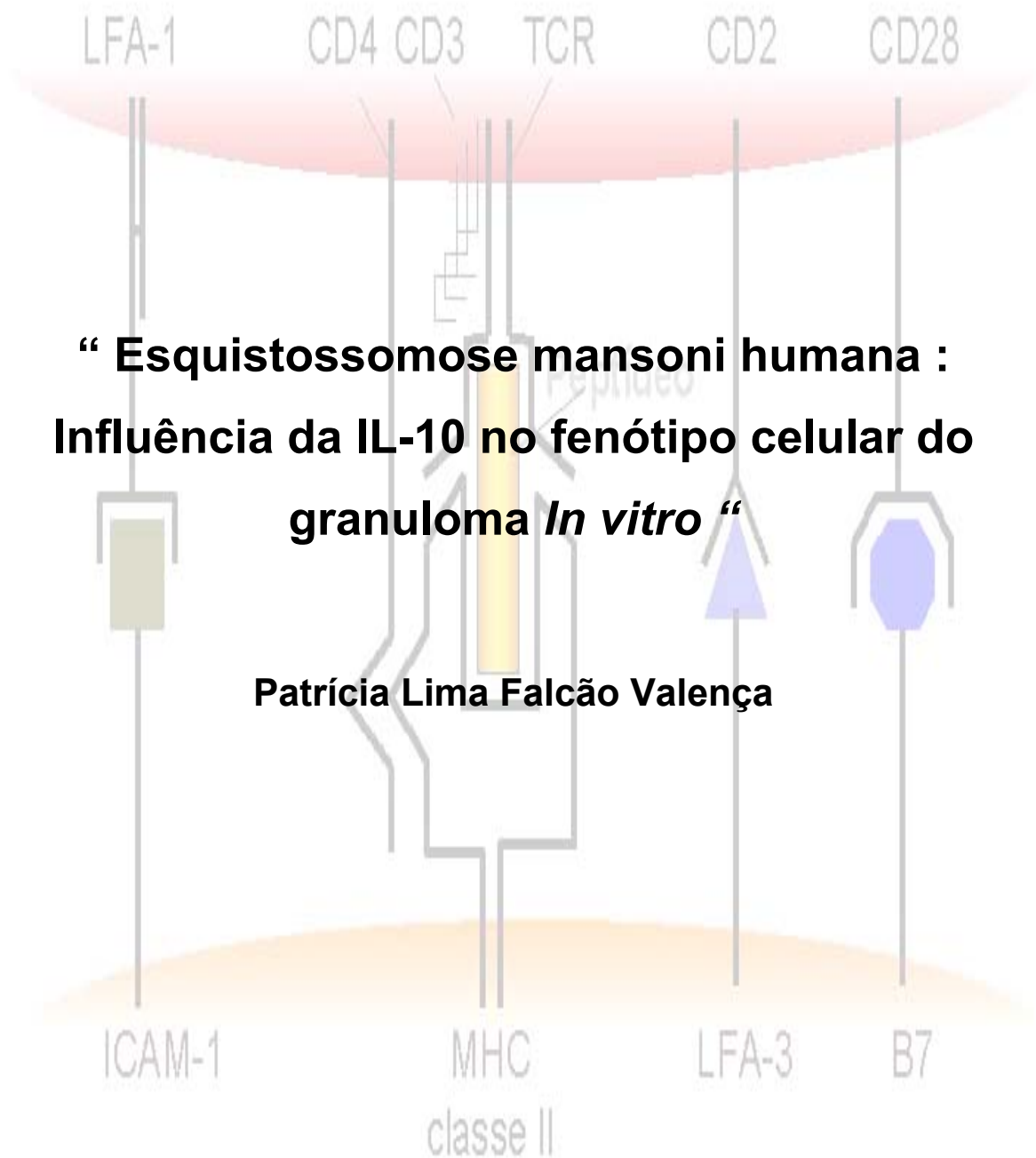


Linfócito T Helper
Fundação Oswaldo Cruz



**“ Esquistossomose mansoni humana :
Influência da IL-10 no fenótipo celular do
granuloma *In vitro* “**

Patrícia Lima Falcão Valença

Rio de Janeiro

Maio de 2000

APC expressando
MHC classe II

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz**

Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular

**“ Esquistossomose mansoni humana :
Influência da IL-10 no fenótipo celular do
granuloma *In-vitro* “**

por

Patrícia Lima Falcão Valença

Tese defendida e aprovada em 02 de maio de 2000

Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Imunologia

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Tânia Cremonini de Araújo-Jorge (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira (ICB/UFMG)

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (ICB/UFMG)

Prof. Dr. Alfredo de Miranda Goes (ICB/UFMG)

Profa. Dra. Silvana Elói-Santos (Faculdade de Medicina/UFMG)

Orientador : Rodrigo Corrêa-Oliveira

043
V152e
2000

Valença, Patrícia Lima Falcão
“Esquistossomose mansoni humana : Influência da IL-10
no fenótipo celular do granuloma *in vitro*”/ Patrícia Lima Falcão
Valença, 2000.

145p.

Orientador: Rodrigo Côrrea-Oliveira.

Tese (doutorado) – Fundação Oswaldo Cruz, pós-graduação em
Biologia Celular e Molecular. Área de concentração: Imunologia.

1. Esquistossomose. 2. Granuloma. 3. Moléculas acessórias IL10. I.
Título. II. Oliveira, Rodrigo Côrrea.

Esta tese foi desenvolvida sob a orientação do Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz. No decorrer do trabalho contamos com o suporte financeiro WHO/TDR, EC, NIH-ICIDR AI45451-01, CAPES e CNPq/PRONEX.

Dedico este trabalho a

Meus pais,

que nunca deixaram de me amar e compreender nos momentos mais difíceis da minha vida e sempre acreditaram que seria possível ver a “cria” não esmorecer...

Eduardo,

meu amor, que demonstrou tolerância e paciência infinita. Sem ele, não teria sido possível!

Flávia, Isadora e Luíza,

por compreenderem a mãe pelos dias infindáveis de ausência.

Minha irmã,

por ser a pessoa que é e por sua participação no meu crescimento como pessoa.

Gostaria de agradecer:

Ao Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira, meu orientador, por ter me recebido em seu Laboratório e com isso ter aberto portas e possibilidades na minha vida profissional. Pela orientação e confiança em mim depositada, que tornou possível a realização deste trabalho. Sobretudo, por ter contribuído de várias formas para que eu superasse minhas próprias dificuldades.

Ao professor Giovanni Gazzinelli, por ter participado do meu crescimento profissional e pessoal. Não é preciso dizer nada, visto que ele já conhece muito bem o que penso a seu respeito.

Ao Dr. Olindo, pela contribuição incontestável na minha vida profissional e ao amigo Olindo por tudo que compartilhamos durante todos esses anos, inclusive a visão da vida de uma forma mais ampla.

À Clari, minha amiga especial, por tudo que tem feito por mim. Sei que continuaremos a caminhar juntas por essa vida afora, até mesmo em pensamento.

Ao Dr. Luiz Cosme, que sempre trilhou comigo todos os caminhos e permaneceu alento nos momentos mais difíceis, mesmo estando fisicamente longe.

Ao Dr. Guilherme, meu colaborador, pelo carinho, amizade, paciência e pela competência ao transmitir seu vasto conhecimento.

À Dra. Iramaya, pela valiosa colaboração e apoio durante a realização deste trabalho e principalmente por sua integridade tocante.

Ao Dr. Alan Wilson, da Universidade de York/Inglaterra, que me recebeu em seu Laboratório e orientou experimentos que subsidiaram a discussão dos estudos realizados no Laboratório de Imunologia/CPqRR.

À Andréa, por ter tido a oportunidade de conhecê-la e saber que compartilhamos visões bem semelhantes da vida. Por sua valiosa colaboração e desprendimento em doar-se às pessoas.

Ao Dr. Ivan Sampaio, pela orientação e colaboração durante o tratamento estatístico dos trabalhos.

Ao Dr. Jeffrey Bethony, pela colaboração na análise estatística dos experimentos.

À Dra. Maria José Morato, pelo carinho, amizade, apoio e conselhos tão valiosos ao longo de nossa convivência.

Ao Alex, Flávio e Cláudia em especial pela ajuda na parte final do meu trabalho e pelo companheirismo de sempre.

À Tiza, minha amiga, que tem acompanhado tudo de perto.

À Jujú, que afinal de contas caminhou comigo durante todos esses anos.

À Aninha, pelo apoio técnico e disponibilidade constante.

À Dra. Lúcia Alves Fraga, profa. Alda, Virgínia e Fátima, pela valiosa colaboração no envio do sangue dos pacientes da área endêmica e sobretudo, pela amizade.

Ao Dr. Aluísio Prata e à Dra. Maria Carolina Álvarez pelo exame clínico e sonográfico dos pacientes.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia que conviveram comigo ao longo desses anos e que sempre demonstraram companheirismo e tolerância nos momentos nebulosos da minha jornada.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou, na pessoa de seu atual diretor Dr. Roberto Sena Rocha e de seu diretor anterior, Dr. Naftale Katz e à chefe do Departamento Administrativo Valéria Lima Falcão Campos.

Acima de tudo aos pacientes, que confiaram no nosso propósito.

SUMÁRIO

A resposta granulomatosa em torno dos ovos do *Schistosoma mansoni* alojados nos tecidos do hospedeiro é considerada uma das principais causas da patologia na esquistossomose. São diversos os estudos que investigaram os eventos de formação e modulação do granuloma *in vitro*, empregando o modelo de formação de granuloma *in vitro*. Eventos de modulação da reatividade celular *in vitro*, durante a infecção crônica, podem ser correlacionados com a diminuição do tamanho do granuloma observados nos indivíduos que apresentam a forma clínica intestinal da infecção (INT).

Trabalhos recentes mostraram que a IL-10 exerce um papel central na modulação da reatividade granulomatosa *in vitro* observada em pacientes INT. Os estudos que avaliam o fenótipo de células mononucleares e a expressão de moléculas co-estimuladoras em populações e subpopulações celulares, envolvidas na reatividade granulomatosa *in vitro* são ainda escassos. Embora, diversos trabalhos, na esquistossomose experimental, tenham demonstrado que fatores solúveis podem estar correlacionados à expressão diferenciada de marcadores de superfície celular, esses mecanismos não estão ainda esclarecidos na esquistossomose humana.

Nesta tese, foram avaliadas, através da citometria de fluxo, as alterações fenotípicas na população com PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) de pacientes portadores de esquistossomose crônica intestinal (INT) e hepatoesplênica (HE) quando submetidas ao ensaio de formação de granuloma *in vitro*, na presença de anticorpos anti-IL10 ou de rIL-10.

A análise dos resultados obtidos demonstrou que a IL-10 foi capaz de modular significativamente no grupo INT, o percentual de populações de linfócitos T expressando os marcadores CD3, CD4, bem como a subpopulação de linfócitos CD4⁺, co-expressando os marcadores CD28, CD18, CD62L e HLA-DR. A IL-10 exerceu seu efeito modulando as células CD19⁺CD86⁺ na população de células B e células CD14⁺CD54⁺. Os linfócitos T CD8⁺, co-expressando os marcadores CD28, CD62L e HLA-DR não foram moduladas pela IL-10 neste grupo de pacientes.

No grupo de indivíduos HS, o bloqueio da IL-10 não promoveu alterações nos percentuais de nenhuma subpopulação estudada. Com exceção das células

CD8⁺ CD62L⁺ e CD8⁺ HLA-DR⁺, que apresentaram um aumento neste grupo de indivíduos, as subpopulações expressando os marcadores CD28, CD18 apresentaram percentuais significativamente menores em relação ao grupo INT e ao grupo controle. Este estudo sugeriu ainda que o aumento de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ expressando o marcador CD62L e HLA-DR no grupo HS não são moduladas pela IL-10, e podem ser relacionadas à severidade da doença. Por outro lado, a modulação de populações de linfócitos CD8⁺CD28⁺ parece ocorrer por outra via não dependente da IL-10, visto que o bloqueio dessa citocina, não foi capaz de alterar os percentuais dessa população celular. A indução de mecanismos de modulação diferenciados de CD28, poderiam estar diretamente correlacionados às formas clínicas distintas na esquistossomose.

Finalmente, os resultados gerados neste estudo permitiram a avaliação de populações celulares expressando marcadores de co-estimulação e adesão, antes e após a formação do granuloma *in vitro*, que se encontram modulados, provavelmente, pela ação da IL-10 e/ou outros mecanismos, durante a fase crônica assintomática, e portanto, essa citocina parece ter papel importante no controle da morbidade da esquistossomose.

ABSTRACT

The granulomatous response around eggs trapped in the tissues of patients infected with *Schistosoma mansoni* is the major cause of the pathology associated with this disease. During the course of the infection the granuloma size decreases in most individuals. This regulatory response has been named granuloma modulation. In humans, the majority of the data generated on granuloma formation/modulation has been obtained by examining of infected patients PBMC reactivity to antigen-conjugated polyacrilamde beads using the *in vitro* granuloma.

Recent reports show that interleukin 10 (IL-10) plays a central role in this modulation of the immune response in chronic intestinal schistosomiasis and that may be involved in the control of morbidity. However, the mechanism to evaluate the PBMC phenotype and the expression of costimulatory molecules by cell populations involved on the granulomatous reactivity is not well established. In addition the mechanism by which IL-10 modulates the immune response in these patients is still unknown. Although several reports on experimental schistosomiasis has been demonstrated that soluble factors may be correlated with differentiated cell markers, these mechanism are not well known.

In this thesis, we evaluated phenotypic alterations on the cell populations and accessory molecules involved in the development of *in vitro* granuloma reaction using PBMCs from patients with the intestinal (INT) and hepatosplenic (HS) forms of schistosomiasis.

The results obtained by flow cytometer demonstrated that IL-10 was able to significantly modulate the percentage of CD3⁺, CD4⁺ cell populations, as well the CD4⁺ lymphocytes expressing CD28, CD18, CD62L and HLA-DR markers in all INT patients when compared with the HS group. These results show that in PBMC cultures, in the absence of blocking monoclonal antibodies (mAb) to IL-10, the percentage of CD4⁺ cells expressing these markers was lower.

It is worth mentioning that the analysis of the CD19⁺CD86⁺ and CD14⁺CD54⁺ cell populations in the intestinal group demonstrated a significant downregulation of these populations by IL-10 in the PB-SEA cultures. The CD28, CD8⁺CD62⁺L and CD8⁺ HLA-DR⁺ lymphocytes were not modulated by IL-10 in this

group. Addition of recombinant IL-10 to the cultures readily decreased the percentages of all receptors in most of the individuals.

The effect of IL-10 on the HS group was evaluated by the expression of all molecules investigated. The results did not show any difference on the expression of receptors, neither in the presence nor in the absence of anti-IL-10 monoclonal antibodies after the granuloma formation. On the other hand, the L-selectin and HLA-DR molecules were highly expressed in the HS group when compared to the INT group. The results presented in this study suggests that the high expression of these molecules may be correlated with the severity of the infection. Furthermore, the modulation of CD28 on the CD8⁺ cells in this group did not appear to be due to IL-10, since the addition of anti-IL-10 blocking antibodies to the *in vitro* granuloma cultures did not alter the percentage of expression of this molecule.

Finally, the results generated in this thesis allowed the evaluation of cells populations expressing accessory molecules after the *in vitro* granuloma formation during the chronic intestinal phase. Together, these data strengthen the idea of IL-10 being a key player in determining the control of the morbidity in Schistosomiasis.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígeno
B7-1	Ligante da molécula co-estimuladora CD28 expresso na superfície de linfócitos B e macrófagos/monócitos (CD80)
B7-2	Ligante da molécula co-estimuladora CD28 expresso na superfície de linfócitos B e macrófagos/monócitos (CD86)
CMF	Canal médio de fluorescência
CD	Cluster differentiation
CD3	População de células T
CD4	Subpopulação de células T auxiliadora
CD8	Subpopulação de células T citotóxica
CD19	População de células B
CD14	População de células apresentadoras de antígenos da linhagem monocítica/macrofágica
CD28	Molécula co-estimuladora expressa em linfócitos
DTH	Reação de hipersensibilidade tardia
FSC	“Forward scatter”; parâmetro citofluorométrico indicativo de tamanho celular
FL1	Fluorescência do tipo 1 – Isotiocianato de fluoresceína
FL2	Fluorescência do tipo 2 - ficoeritrina
GI	Índice de granuloma
GM-CSF	Fator de estimulação de colônia de granulócitos e macrófagos
HLA-DR	Produto dos genes do complexo de histocompatibilidade de classe II
HS	Pacientes portadores da forma clínica hepatoesplênica da esquistossomose
IC	Imunocomplexos
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular (CD54)
IgE	Imunoglobulina E
IFN- γ	Interferon gamma
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5

IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
INT	Pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose
LT	Linfotoxina
LFA-1	Molécula associada a função de leucócitos (CD11a/CD18)
L-NAME	L-N-arginina-metil-éster
L-selectina	Molécula de adesão de leucócitos (LAM-1/Leu-8) (CD62)
MRNA	Ácido ribonucleíco mensageiro
MHC II	Complexo de histocompatibilidade do tipo II
NI	Indivíduos não infectados
NK	Células Natural Killer
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
SEA	Antígenos solúveis de ovo de <i>schistosoma</i>
SSC	“Side scatter”; parâmetro citofluorométrico indicativo de granulosidade celular
SWAP	Antígenos solúveis de verme adulto
TNF	Fator de necrose tumoral
Th1	Células T CD4 ⁺ auxiliaadoras do tipo 1
Th2	Células T CD4 ⁺ auxiliaadoras do tipo 2
αIL-10	Anticorpos anti-IL-10
RIL-10	IL-10 recombinante

Lista de Figuras, Tabelas e Diagramas

Figura 1 – Representação esquemática da sequência da análise dos dados obtidos por citometria de fluxo.

Figura 2 – Percentual médio de linfócitos T CD3⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI INT e HS.

Figura 3 – Percentual médio de linfócitos T CD4⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 4 – Percentual médio de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 5 – Percentual médio de linfócitos T CD4⁺CD28⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 6 – Canal médio de intensidade de fluorescência do marcador CD18 expresso na população de linfócitos CD4⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 7 – Percentual médio de linfócitos T CD4⁺CD62L⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 8 – Percentual médio de linfócitos T CD8⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 9 – Percentual médio de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 10 – Percentual médio de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 11 – Canal médio de intensidade de fluorescência do marcador CD18 expresso na população de linfócitos T CD8⁺ obtidos antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 12 – Percentual médio de linfócitos T CD8⁺CD62L⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 13 – Percentual médio de células B CD19⁺ obtidos antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 14 – Percentual médio de células B CD19⁺CD86⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 15 – Percentual médio de linfócitos B CD19⁺CD80⁺ obtidos antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 16 – Percentual médio de células CD14⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 17 – Percentual médio de linfócitos B CD14⁺CD86⁺ obtidos antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 18 – Percentual médio de células CD14⁺CD80⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 19 – Percentual médio de células CD14⁺CD54⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI.

Figura 20 - Média dos índices de granuloma (GI) obtidos na avaliação da reatividade granulomatosa com PBMC pacientes INT, HS e indivíduos NI, cultivadas na ausência ou presença de anticorpos anti-IL10 e rIL-10.

Figura 21 – Percentual médio de linfócitos T CD3⁺ obtido após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, HS e INT, na ausência e presença de anticorpos anti-IL-10 e/ou rIL-10.

Figura 22 – Percentual médio de linfócitos T CD4⁺ (A), CD4⁺HLA-DR⁺ (B), CD4⁺CD28⁺ (C), (CMF) CD4⁺ CD18⁺ (D), CD4⁺CD62L⁺ (E) obtido após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI, na ausência e presença de anticorpos anti-IL-10 e/ou rIL-10.

Figura 23 – Percentual médio de linfócitos T CD8⁺ (A), CD8⁺HLA-DR⁺ (B), CD8⁺CD28⁺ (C), (CMF) CD8⁺ CD18⁺ (D), CD8⁺CD62L⁺ (E) obtido após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI, na ausência e presença de anticorpos anti-IL-10 e/ou rIL-10.

Figura 24 – Percentual médio de células B CD19⁺ (A), CD19⁺CD86⁺ (B), CD19⁺CD80⁺ (C) obtido após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI, na ausência e presença de anticorpos anti-IL-10 e/ou rIL-10.

Figura 25 - Percentual médio de células CD14⁺ (A), CD14⁺CD86⁺ (B), CD14⁺CD80⁺ (C), CD14⁺CD54⁺ (D) obtido após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes INT, HS e indivíduos NI, na ausência e presença de anticorpos anti-IL-10 e/ou rIL-10.

Tabela 1 - Características do Grupo de Pacientes.

Tabela 2 - Classificação dos granulomas em torno de cada esfera de Poliacrilamida

Tabela 3 - Análise de células CD3⁺ após cultura de granuloma *in vitro* (Controle PB) com PBMC de indivíduos NI, INT e HS.

Tabela 4 - Análise de linfócitos T CD4⁺, CD4⁺HLA-DR⁺, CD4⁺CD28⁺, (CMF) CD4⁺ CD18⁺, CD4⁺CD62L⁺ após cultura de granuloma *in vitro* (Controle PB) com PBMC de indivíduos NI, INT e HS.

Tabela 5 - Análise de linfócitos T CD8⁺, CD8⁺HLA-DR⁺, CD8⁺CD28⁺, (CMF) CD8⁺ CD18⁺, CD8⁺CD62L⁺ após cultura de granuloma *in vitro* (Controle PB) com PBMC de indivíduos NI, INT e HS.

Tabela 6 - Análise de células B CD19⁺, CD19⁺CD86⁺, CD19⁺CD80⁺ após cultura de granuloma *in vitro* (Controle PB) com PBMC de indivíduos NI, INT e HS.

Tabela 7 - Análise de células CD14⁺, CD14⁺CD86⁺, CD14⁺CD80⁺ e CD14⁺CD54⁺ após cultura de granuloma *in vitro* (Controle PB) com PBMC de indivíduos NI, INT e HS.

Diagrama 1- Estudo comparativo do fenótipo de populações e subpopulações celulares avaliadas após cultura de granuloma *in vitro* em relação à análise *ex vivo*

Diagrama 2- Estudo comparativo do efeito do bloqueio da IL-10 em relação a PB-SEA.

Diagrama 3- Estudo comparativo do efeito da rIL10 em relação a PB-SEA .

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - CICLO BIOLÓGICO	1
1.2 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ESQUISTOSSOMOSE	2
1.3 - RESPOSTA IMUNE NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI	3
1.4 - O GRANULOMA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI	11
2 - OBJETIVO GERAL	15
3 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
4 - MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 - POPULAÇÃO ESTUDADA	16
4.2 - PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE OVO DE <i>S.MANSONI</i> (SEA)	17
4.3 - OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO	17
4.4 - ENSAIO DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	18
4.4.1 - LIGAÇÃO DO SEA ÀS ESFERAS DE POLIACRILAMIDA	18
4.4.2 - CULTURAS DE CÉLULAS NA PRESENÇA DE ESFERAS DE POLIACRILAMIDA	19
4.4.3 - ANTICORPOS	20
4.5 - COLETA DE CÉLULAS PROVENIENTES DOS GRANULOMAS FORMADOS <i>IN VITRO</i>	23
4.6 - CITOMETRIA DE FLUXO	23
4.6.1 - IMUNOFLUORÊSCÊNCIA PARA ANÁLISE CITOMÉTRICA DE CÉLULAS MONONUCLEARES <i>EX-VIVO</i> E DAS PROVENIENTES DOS GRANULOMAS FORMADOS <i>IN VITRO</i>	23
4.7 - MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR	27
4.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5 - RESULTADOS	28
PACIENTES INT APRESENTAM DIMINUIÇÃO SIGNIFICATIVA DO PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD3 ⁺ APÓS CULTURA DO GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	28
O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ DIMINUI SIGNIFICATIVAMENTE APÓS CULTURA DO GRANULOMA <i>IN VITRO</i> NO GRUPO INT	30
O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ EXPRESSANDO HLA-DR NÃO É ALTERADO APÓS CULTURA COM PBMC NO GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	32
GRUPO INT APRESENTA DIMINUIÇÃO SIGNIFICATIVA DO PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ EXPRESSANDO CD28 APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	34
EXPRESSÃO DO MARCADOR CD18 NÃO É ALTERADO APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	36
O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD4 ⁺ EXPRESSANDO CD62 NÃO É ALTERADO CULTURA COM PBMC DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	38
O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD8 ⁺ NÃO É ALTERADO APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	40
O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD8 ⁺ ATIVADOS NÃO É ALTERADO APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	42
O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD8 ⁺ EXPRESSANDO CD28 NÃO É ALTERADO APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	44
EXPRESSÃO DO MARCADOR CD18 NA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8 ⁺ NÃO É ALTERADO APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	46
PACIENTES INT APRESENTAM DIMINUIÇÃO SIGNIFICATIVA DO PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD8 ⁺ EXPRESSANDO CD62 APÓS CULTURA GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	48
O PERCENTUAL DE CÉLULAS B CD19 ⁺ NÃO É ALTERADO APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	50
O PERCENTUAL DE CÉLULAS B CD19 ⁺ EXPRESSANDO CD86 ⁺ DIMINUI APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i> NO GRUPO INT	52
NÃO HÁ ALTERAÇÃO NO PERCENTUAL DE CÉLULAS B CD19 ⁺ CD80 ⁺ APÓS CULTURA COM PBMC NO GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	54
PACIENTES INT APRESENTAM DIMINUIÇÃO SIGNIFICATIVA DO PERCENTUAL DE CÉLULAS CD14 ⁺ APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	56
PACIENTES INT APRESENTAM DIMINUIÇÃO SIGNIFICATIVA DO PERCENTUAL DE CÉLULAS CD14 ⁺ EXPRESSANDO CD86 APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	58
O PERCENTUAL DE CÉLULAS CD14 ⁺ CD80 ⁺ NÃO É ALTERADO APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	60
NÃO HÁ ALTERAÇÃO NO PERCENTUAL DE CÉLULAS CD14 ⁺ CD54 ⁺ APÓS CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	62
FORMAÇÃO DO GRANULOMA <i>IN VITRO</i> NA PRESENÇA DOS ANTICORPOS ANTI-INTERLEUCINA 10 (IL-10) E/OU IL-10 RECOMBINANTE (rIL-10)	64

BLOQUEIO DA IL-10 AUMENTA O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS CD3 ⁺ EM CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i> ..	66
BLOQUEIO DA IL-10 AUMENTA O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS CD4 ⁺ TOTAIS E CO-EXPRESSANDO OS MARCADORES HLA-DR, CD28, CD18 E CD62L NOS INDIVÍDUOS INT EM CULTURA DE GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	68
O BLOQUEIO DA IL-10 ALTERA APENAS O PERCENTUAL DE LINFÓCITOS DE CD8 ⁺ CD62L ⁺ E DO MARCADOR CD18 EM CÉLULAS CD8 ⁺ DE INDIVÍDUOS INT NO GRANULOMA <i>IN VITRO</i> ”	72
O BLOQUEIO DA IL-10 EM CULTURA FOI CAPAZ DE ALTERAR SOMENTE CÉLULAS B CD19 ⁺ CD86 ⁺ NO GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	75
O BLOQUEIO DA IL-10 DIMINUI SIGNIFICATIVAMENTE O PERCENTUAL DE CÉLULAS CD14 ⁺ , MAS NÃO ALTERA O PERCENTUAL DOS MARCADORES CO-EXPRESSOS NESSA POPULAÇÃO CELULAR EM CULTURA PBMC NO GRANULOMA <i>IN VITRO</i>	78
6 - DISCUSSÃO.....	81
7 – RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO	98
8 - COMENTÁRIOS E PERSPECTIVAS	101
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102
10 - APÊNDICE.....	125

1 - INTRODUÇÃO

O estudo da esquistossomose nasce da necessidade de se contribuir para a mudança de uma realidade adversa, em que há comprometimento significativo da saúde pública, induzido por esta doença e onde todos os esforços no sentido de conter seus efeitos junto à população se apresentam como lastro para o desenvolvimento de um país. No mundo, o número atual de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* alcança a soma de 180 a 200 milhões (WHO, 1998).

O controle da esquistossomose é complexo e a eficiência dos serviços de saneamento básico, educação sanitária, bem como outras medidas de cunho técnico-político apresentam-se como elementos importantes no controle da doença ou de sua morbidade. Entretanto, fazem-se necessários, associado a essas medidas, novos estudos no sentido de melhor se conhecer a doença e a dinâmica das interações hospedeiro-parasita, como estratégia na busca de novos instrumentos de controle da esquistossomose.

1.1 - CICLO BIOLÓGICO

As três principais espécies do *Schistosoma* que infectam o homem são: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma haematobium* (JORDAN *et al.*, 1969). Estas espécies diferem na maneira como infectam, incluindo o período compreendido entre a penetração da larva e oviposição, localização final no hospedeiro, número médio de ovos produzidos pelos pares de vermes, tamanho e morfologia dos ovos e reações inflamatórias que induzem no hospedeiro (WARREN, 1975).

O *S. mansoni* pertence à família *Schistosomatidae*, sendo a espécie causadora da esquistossomose no Brasil. O *S. mansoni* possui um ciclo de vida com dois estádios distintos que alternam gerações entre um hospedeiro intermediário e um hospedeiro definitivo (vertebrado). Três espécies de moluscos do gênero *Biomphalaria*, *glabrata*, *tenagophila* e *straminea* são os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* no Brasil (PESSOA & MARTINS, 1982). Durante a infecção dos vertebrados, os vermes adultos e os ovos apresentam-se como os estádios de maior relevância na indução de eventos conectados à interação parasita-hospedeiro (PEARCE & SIMPSON, 1992; JACOBS *et al.* 1997.). Os

vermes adultos vivem acasalados no sistema porta-hepático, com a fêmea alojada no canal ginecóforo do macho, por período médio de 2 a 5 anos (COELHO, 1970). Esse processo de pareamento resulta na completa maturação dos vermes (PESSOA & MARTINS, 1982; DAMIAN, 1984). Nas veias mesentéricas, a fêmea inicia a oviposição, produzindo cerca de 300 ovos por dia. Parte dos ovos atravessam a parede do intestino, caem na luz intestinal e são eliminados nas fezes do hospedeiro. Quando entram em contato com a água, os ovos eclodem e uma larva ciliada de vida livre, o miracídio, é liberada. A penetração do miracídio no caramujo é ativa, auxiliada por enzimas proteolíticas. Dentro do hospedeiro intermediário, através de um processo assexuado de poliembrionia, o miracídio transforma-se em esporocisto primário em cerca de 8 a 10 dias, posteriormente em esporocisto secundário e finalmente em cercária, estágio infectante para o hospedeiro vertebrado. Cerca de 30% dos ovos produzidos pelos vermes adultos ficam retidos na mucosa intestinal e capilares do sistema porta-hepático do hospedeiro vertebrado, sendo alvo de reações imunológicas intensas (WARREN, 1963, 1966; DOMINGOS & WARREN, 1969).

1.2 - MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA ESQUISTOSSOMOSE

A infecção humana pelo *S. mansoni* induz diferentes manifestações clínicas características. Estudos anátomo-clínicos de BARROS-COELHO (1955) e BOGLIOLO (1959) mostram que existem diferenças significativas entre os indivíduos portadores das várias formas clínicas da esquistossomose mansoni, nas fases aguda e crônica. A fase aguda surge entre a quarta e décima semanas após exposição às cercárias e é caracterizada por manifestações toxêmicas durante a migração da larva e no período inicial de postura de ovos. Alguns indivíduos após a exposição podem apresentar manifestações cutâneas do tipo urticária. A hepatomegalia é frequente nessa fase. Neste período o doente, em geral, apresenta, diarreia característica com presença de muco e sangue. Os sintomas da fase aguda, tais como os surtos febris, tosse seca e persistente sem sinais pulmonares apreciáveis, desaparecem espontaneamente ou após tratamento. (revisado por BOROS, 1989).

A fase crônica apresenta-se sob as formas clínicas intestinal (INT), hepatointestinal (HI) e hepatoesplênica (HS) compensada ou descompensada. A forma intestinal é a mais frequentemente encontrada em pacientes cronicamente infectados. Nesta forma, os sintomas são geralmente brandos: com perda de apetite e dispepsia e desconforto abdominal (SAVIOLI *et al.*, 1997). Embora não existam estudos detalhados relacionados à forma hepatointestinal, pacientes portadores dessa forma clínica apresentam uma hepatomegalia não associada à esplenomegalia.

A forma hepatoesplênica caracteriza-se pelo aumento considerável do baço e do fígado. Na forma hepatoesplênica compensada, as lesões hepáticas caracterizam-se por fibrose periportal com vários graus de obstrução dos ramos intra-hepáticos da veia porta. O aumento do baço se deve a dois fatores principais: 1) hiperplasia dos elementos do retículo endotelial da polpa vermelha e 2) congestão passiva determinada pela hipertensão porta (PESSOA & MARTINS, 1982; REY, 1991). Nesta forma predominam as manifestações decorrentes da hipertensão porta.

Na forma hepatoesplênica descompensada, o quadro clínico é caracterizado pela fibrose periportal podendo resultar no bloqueio da microcirculação, hipertensão porta e desenvolvimento de circulação colateral. Esta manifestação acomete uma porcentagem pequena da população infectada, variando de 1 a 10%, dependendo da área de estudo (ANDRADE & VAN MARCK, 1984).

1.3 - RESPOSTA IMUNE NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

Na esquistossomose, o sistema imune do hospedeiro é exposto a uma série de antígenos derivados do parasita e do ovo que induzem intensa resposta celular e humoral. Na tentativa de se identificar os mecanismos patogênicos e protetores desencadeados pela infecção pelo *S. mansoni*, vários estudos têm sido desenvolvidos em modelos experimentais. Entre os vários modelos experimentais, o camundongo é o mais utilizado.

A relevância do papel dos linfócitos T na imunidade contra a infecção pelo *S. mansoni* foi descrita inicialmente em estudos utilizando camundongos timectomizados (DOENHOFF & LONG, 1979). Esses autores mostraram que a resistência à reinfecção nestes animais foi significativamente reduzida, embora nenhuma diferença na recuperação de vermes da infecção primária tenha sido

observada. A deficiência de células T afetou a eliminação dos vermes provenientes da infecção desafio, mas não a da infecção primária. Esses mesmos autores observaram que a diminuição do número de parasitas após a infecção desafio também ocorreu quando animais adultos timectomizados eram tratados com soro anti-timócitos, imediatamente após a infecção inicial. A dependência de células na resistência à infecção foi observada ainda através de estudos de transferência passiva de células de camundongos portadores de infecção crônica para animais normais (SHER *et al.*, 1975; HARRISON *et al.*, 1982). A transferência passiva de células em combinação com soro imune de animais portadores de infecção crônica para animais normais desafiados, também levou a uma redução significativa dos parasitas da infecção desafio (MADISON & KAGAN, 1979).

Vale a pena salientar que a investigação de mecanismos imunes dependentes de células T envolvidos na resistência ou patologia da doença, tornou-se ainda mais evidente, após a descrição das subpopulações de células T auxiliaadoras, dos tipos Th0, Th1 e Th2. Enquanto células Th1 secretam principalmente IFN- γ , IL-2 e linfotóxina (LT) e estão associadas a reações de hipersensibilidade tardia (DTH) (CHER & MOSMANN, 1987), células Th2 secretam principalmente IL-4, IL-5 e IL-10, sendo mais efetivas como promotores na estimulação de linfócitos B para secreção de anticorpos (STEVENS *et al.*, 1988).

Alguns autores mostraram uma possível associação entre o desenvolvimento da resistência ou susceptibilidade à infecção pelo *S. mansoni* e a presença de subpopulações T CD4⁺ Th1 e Th2. Assim, a resistência à infecção induzida em camundongos vacinados com cercárias irradiadas pôde ser relacionada ao desenvolvimento de um padrão de resposta tipicamente Th1, uma vez que a utilização de anticorpos anti-IFN- γ bloqueou a imunidade induzida pela vacina (JAMES & SHER, 1990; SMYTHIERS *et al.*, 1992). Outros estudos, também com cercárias irradiadas, mostraram que a IL-12 é um potente indutor da resposta do tipo Th1, inibindo a diferenciação de células (WYNN *et al.*, 1995).

Vários estudos têm sugerido que a modulação da imunidade mediada por células efetoras poderia, pelo menos em parte, ser atribuída à ação de algumas citocinas reguladoras. Dentre essas citocinas com atividade inibidora estão a IL-4, IL-10 e TGF- β . Tanto a IL-4 quanto a IL-10 podem inibir a secreção de várias citocinas, desempenhando um papel importante não somente na regulação da

resposta de células T, mas também como moduladores da resposta inflamatória aguda induzida por infecção ou injúria, inibindo a secreção de IL-1, IL-6 e TNF- α e promovendo a diminuição da atividade de macrófagos (ESSNER *et al.*, 1989; HART *et al.*, 1989; RALPH *et al.*, 1992).

SHER *et al.* (1990), demonstraram que eosinofilia e o aumento dos níveis séricos de IgE ocorridos durante a formação do granuloma são mediados por IL-5 e IL-4, respectivamente. GRZYCH *et al.*, (1991) mostraram que células do baço e de linfonodo de camundongos portadores de infecção esquistossomótica secretam quantidades significativas de IL-4 e IL-5 quando estimuladas por mitógeno, caracterizando um perfil Th2, enquanto animais não infectados secretam principalmente IFN- γ e IL-2. VELLA & PEARCE (1992) também mostraram que animais normais imunizados com ovos viáveis de *S. mansoni* desenvolveram uma resposta tipicamente do tipo Th2.

A avaliação do perfil de citocinas produzidas por células de animais portadores de infecção unissexuada ou em período pré-patente, apresentam um padrão de resposta tipicamente Th1 (PEARCE *et al.* 1991; GRZYCH *et al.*, 1991). Baseados nestas observações, esses autores sugeriram que os ovos, e não outro estágio de vida do parasita são os principais responsáveis pela formação do granuloma induzido por uma resposta do tipo Th2, desempenhando papel importante na patogênese da esquistossomose (YMASHITA & BOROS, 1992; WYNN *et al.*, 1993; CHEEVER *et al.*, 1994 ; AMIRI *et al.*, 1994).

Outras citocinas com funções reguladoras tem sido também estudadas, como a IL-10 que age não apenas sobre as células T da subpopulação Th1 Th2 (FIORENTINO *et al.*, 1989; ZLOTINIK *et al.*, 1991), mais também sobre macrófagos ativados, mas especificamente sobre a apresentação de antígenos por essas células. O papel da IL-10 na infecção pelo *S. mansoni* foi investigado avaliando-se o efeito de sobrenadantes de cultura de células de baço de camundongos cronicamente infectados sobre o crescimento de linhagens de células Th1. A adição de sobrenadante de cultura inibiu significativamente o crescimento de células T e conseqüentemente da resposta imune. Essa inibição foi revertida pela adição de anticorpos anti-IL-10 (SHER *et al.*, 1991). Esse estudo vai de encontro a outros dados da literatura que sugerem ser IL-4 a citocina chave na indução do perfil celular do tipo 2 na infecção crônica (GRZYCH *et al.*, 1991). VELUPILLAI & HARN, (1994)

mostraram que, em camundongos, o desvio da resposta imune do tipo Th1 para Th2, ocorre por ocasião da deposição dos ovos pelo parasita e está relacionada com um aumento de IL-10.

É importante mencionar que os mecanismos envolvidos na indução das respostas Th1 e Th2 na esquistossomose ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns estudos na esquistossomose experimental revelam a existência de interações complexas entre tipos celulares e demonstram a importância de moléculas acessórias além das citocinas no direcionamento dessas respostas (FLORES-VILLANUEVA *et al.* 1994; FREEMAN *et al.*, 1996; KING *et al.*, 1996; PACHECO & LENZI, 1997; JACOBS *et al.*, 1998; HERNANDEZ *et al.* 1999).

A molécula CD28 e seu ligante B7 foram investigados em modelos experimentais e, atualmente, é de amplo conhecimento o papel fundamental que desempenham na ativação da resposta celular. Vários autores mostraram que a expressão desses receptores pode direcionar a resposta celular no sentido de um padrão do tipo 1 ou 2 (KING *et al.*, 1996; GREENWALD *et al.* 1999; SUBRAMANIAN *et al.* 1997).

Estudos em camundongos “knockout” para algumas moléculas acessórias, mostraram que a resposta do tipo Th2 é, em grande parte, dependente da ativação de CD28, uma vez que, nos camundongos CD28 *-/-* e não em animais normais, a produção de IL-4 e IL-5 foi significativamente diminuída e a produção de IFN- γ não foi alterada. Os níveis de IgG1 e IgE também foram significativamente diminuídos nos animais CD28 *-/-*. KING *et al.* (1996).

SUBRAMANIAN e colaboradores (1997) mostraram que anticorpos anti-B7-2 bloqueiam respostas do tipo 2 mediadas por células CD4⁺ na esquistossomose mansoni. Resultados similares foram observados por BROWN e colaboradores (1997) na leishmaniose experimental. Já para o nematódeo *Heligmosomoides polygyrus* respostas do tipo 2 específicas foram inibidas apenas com a administração combinada de anticorpos anti-B7-1 e B7-2. Esses resultados demonstram mais uma vez a importância de moléculas acessórias no desenvolvimento da resposta imune.

Estudos na esquistossomose experimental têm sugerido ainda que as moléculas B7-1 e B7-2 podem ser redundantes, podendo as duas moléculas fornecer os sinais co-estimuladores importantes para ativação celular (NATESAN *et*

al., 1996; BORRIELO *et al.*, 1997; UEDA *et al.*, 1995). Outros autores mostram que somente a molécula B7-2 parece ter um papel importante na co-estimulação. HERNANDEZ *et al.*, (1999) investigaram a resposta de proliferação *in vitro* de células de animais B7-1 ou B7-2 *-/-* infectados pelo *S. mansoni* 7 a 8 semanas após a infecção. Esses autores mostraram que a resposta de proliferação dos camundongos B7-1 *-/-* não diferiu da resposta dos animais controle, enquanto a proliferação de células dos animais B7-2 *-/-* estava significativamente diminuída. Esse estudo mostrou ainda que as células T produziram apenas IFN- γ , não tendo sido detectada a produção de IL-4 e IL-10, um padrão completamente oposto ao apresentado pelos animais controle.

Embora vários estudos tenham avaliado a produção de citocinas e o seu papel na infecção esquistossomótica, poucos foram os pesquisadores que investigaram a relação entre esses fatores solúveis e a expressão de moléculas acessórias em modelos experimentais. FLORES-VILLANUEVA *et al.* (1994 e 1996) em estudos com animais experimentalmente infectados demonstraram que a regulação da resposta de células T, por citocinas, ocorre via regulação das moléculas B7-1 e B7-2 em macrófagos. Esses mesmos autores demonstraram que na presença de anti-IL-10 há um aumento significativo principalmente de B7-2, em macrófagos. Neste estudo, observou-se ainda um aumento expressivo de moléculas do MHC classe II. Anteriormente, atribuiu-se papel importante de IL-10 na modulação de B7-2. Entretanto, IL-10 não foi capaz de modular LFA-1, molécula também envolvida nos eventos de adesão, que se liga fortemente a ICAM-1, além de não ter sido modulada pela IL-10 (BLEIJS *et al.* 1999).

Na esquistossomose experimental, pode se destacar ainda o papel das selectinas que estão envolvidas em várias reações inflamatórias, incluindo o recrutamento de granulócitos. Estudos de FREEMAN *et al.*, (1996) mostraram, através de análise fenotípica, que células de camundongos com a síndrome de hiperesplenomegalia devido a infecção pelo *S. mansoni* expressavam muito mais CD62L (L-selectina) do que os animais com esplenomegalia moderada. JACOBS *et al.*, (1997) detectaram a expressão de ICAM-1 e LFA-1 nas células endoteliais e nas células de Kupffer, através de ensaios de imunohistoquímica, em estágio precoce da formação do granuloma, isto é, 3 dias após a injeção das esferas sensibilizadas com SEA.

Na infecção esquistossomótica humana, SECOR e colaboradores (1994), estudando o papel de ICAM-1 e E-selectina no soro de pacientes portadores de esquistossomose portadores de diferentes formas clínicas e cargas parasitárias, mostraram que pacientes hepatoesplênicos apresentaram níveis mais elevados de ICAM-1 no soro do que os da forma intestinal. Esses achados sugerem que a detecção de altos níveis de ICAM-1 poderiam estar relacionados à severidade da doença.

Como mencionado anteriormente, há pelo menos três décadas, vários pesquisadores vem investigando os mecanismos imunológicos desencadeados pela infecção pelo *S. mansoni*, principalmente, em nível experimental, com o objetivo de identificar mecanismos imunopatológicos e de resistência associados a infecção. A investigação da resposta imune no homem enfoca, principalmente, a reatividade de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) frente a antígenos e/ou mitógenos.

GAZZINELLI *et al.* (1985) demonstraram que PBMC de pacientes na fase aguda da infecção apresentam uma alta resposta de proliferação linfocitária *in vitro* a antígenos solúveis do ovo (SEA). Esta resposta é consideravelmente maior do que aquela observada para PBMC de pacientes com a forma INT. A diminuição da resposta celular ao SEA por PBMC de pacientes portadores da forma INT tem sido associada a mecanismos imunorreguladores do sistema imune.

ELLNER *et al.* (1981) e COLLEY *et al.* (1986) investigaram, especificamente, a resposta de proliferação com PBMC estimuladas pelo SEA e concluíram que as células de pacientes portadores da forma clínica HS apresentavam respostas mais elevadas que as células de pacientes portadores da forma clínica INT. Esses autores formularam a hipótese de que, após uma intensa resposta dirigida contra os antígenos do parasita na fase aguda e posterior estabelecimento de uma infecção estável na fase crônica, muitos pacientes desenvolvem mecanismos que modulam o grau de resposta imune a esses antígenos. Entretanto, alguns pacientes podem não expressar esta modulação e continuar respondendo vigorosamente a esses antígenos durante toda a infecção levando ao aparecimento dos quadros graves característicos da doença.

Embora exista uma série de observações referentes às diferenças entre a resposta de proliferação celular em pacientes portadores das diversas formas

clínicas da doença, os mecanismos envolvidos nessa transição da fase aguda para a fase crônica, necessitam ainda de estudos mais aprofundados. No entanto, não existem contradições no que diz respeito aos resultados que indicam uma modulação na resposta ao SEA, na fase crônica assintomática (COLLEY, 1986; OTTESEN *et al.* 1978; GAZZINELLI, *et al.*, 1985).

Vários mecanismos imunorreguladores foram descritos na esquistossomose mostrando que indivíduos infectados possuem linfócitos T capazes de induzir *in vitro* funções supressoras, como a inibição da resposta de proliferação com PBMC 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 ROCKLIN e colaboradores (1981) apresentaram estudos com células supressoras capazes de inibir a reatividade de linfócitos a antígenos do parasita.

A participação de células aderentes da linhagem monocítica/macrofágica em circuitos imunorreguladores também tem sido investigada. TODD *et al.* (1979) realizaram experimentos em que as células aderentes eram removidas da população de células mononucleares de pacientes com a forma INT, resultando em um aumento da resposta de proliferação estimulada por antígenos do parasita, sem, contudo, alterar a resposta a mitógenos e a antígenos não relacionados. OTTESEN (1979) mostrou que a reposição de macrófagos restaurava a inibição anteriormente apresentada frente à estimulação antigênica.

Além da participação da resposta celular na imunorregulação no hospedeiro, o soro de pacientes infectados também possui fatores supressores reguladores capazes de inibir a resposta de proliferação por PBMC estimuladas por antígenos do parasita (COLLEY *et al.*, 1977; OTTENSEN & POINDEXTER, 1980; ROCKLIN *et al.*, 1980). A natureza da imunorregulação por componentes do soro também pode envolver, ainda, interações idiotipo anti-idiotipo (LIMA *et al.*, 1986). Nesse contexto, foi demonstrado que pacientes portadores da forma INT desenvolvem anticorpos anti-SEA capazes de estimular células anti-idiotípicas, em ensaios de proliferação celular (MONTESANO *et al.*, 1989), que teriam por consequência, atividade reguladora da resposta imune. O mesmo foi observado para pacientes HS.

Estudos recentes têm traçado um esboço da importância de citocinas na resposta imune humana à infecção esquistossomótica, e têm especulado sobre as evidências de uma dicotomia Th1/Th2, tanto em modelos experimentais (SHER *et al.*, 1991; PEARCE *et al.*, 1991; GRZYCH *et al.*, 1991), como no homem. Vários laboratórios têm estudado o papel das citocinas IL-2, IL-4 e IFN- γ na resposta imune de células humanas a antígenos brutos ou fracionados de *S. mansoni*. ZWINGENBERGER *et al.* (1989) demonstraram que a secreção de IL-2 por células de sangue periférico de pacientes portadores das formas INT e HS não tratados, estimulados *in vitro* com Pokeweed Mitogen (PWM), foi significativamente mais baixa em relação a pacientes não infectados. Baixos níveis de IL-2 também foram detectados após estimulação por antígenos de verme adulto ou de ovo. Após tratamento com praziquantel, os níveis de IL-2 produzido por células de sangue periférico dos pacientes portadores da forma intestinal foi restaurada em 3 meses, enquanto que em pacientes portadores da forma clínica HS, esses níveis foram restaurados após 6 meses de tratamento. Alguns estudos têm demonstrado um desequilíbrio na relação IL-4/IFN- γ em cultura estimulada de linfócitos de pacientes infectados, com ausência da produção de IFN- γ em níveis detectáveis e elevação considerável de IL-4 (ZWINGENBERGER *et al.*, 1991; BAHIA-OLIVEIRA *et al.* 1992).

ARAÚJO e colaboradores (1994) mostraram resultados semelhantes aos descritos acima para células de pacientes infectados, demonstrando, ainda, que a inibição da secreção de IFN- γ estimulada por antígeno não era dependente da carga parasitária do paciente.

Apesar dos trabalhos acima citados apresentarem resultados importantes sobre a secreção de citocinas por células mononucleares de pacientes moradores de área endêmica, há ainda necessidade de se conhecer melhor o papel das subpopulações de linfócitos T CD4+ do tipo 1 e 2 na regulação da resposta imune na esquistossomose mansoni humana.

Dentre as citocinas já descritas envolvidas na regulação de respostas Th1 e Th2 na esquistossomose humana, vários estudos tem demonstrado que a IL-10 parece exercer, como na infecção experimental, uma atividade reguladora sobre a imunidade mediada por células (RIBEIRO *et al.* 1993; GROUX *et al.* 1996; ARAÚJO *et al.* 1996; MALAQUIAS *et al.* 1997). GROUX e colaboradores (1996) mostraram que a IL-10 bloqueia a produção de IL-2, GM-CSF e IFN- γ . KING e colaboradores

(1996) mostraram que anticorpos anti-IL10 adicionados às culturas com PBMC de indivíduos infectados pelo *S. haematobium* foram capazes induzir o aumento da resposta de proliferação celular anti-SEA e SWAP com PBMC de indivíduos infectados, bem como o aumento da produção de IFN- γ . Em contraste, os anticorpos anti-IL-10 não induziram um aumento da proliferação celular contra PPD. Além disso, esse estudo mostrou ainda que quando as células eram estimuladas com SEA, a principal fonte de IL-10 eram as células CD4+.

Além dos antígenos de SEA e de SWAP, a resposta aos antígenos de esquistossômulos de fase pulmonar (SLAP) foram investigados no estudo de MALAQUIAS e colaboradores (1997), que mostraram que o bloqueio da IL-10 foi capaz de alterar a resposta de proliferação *in vitro* de PBMC de pacientes portadores da forma clínica INT não só aos antígenos de ovo, mas também ao SLAP, sugerindo mais uma vez, que a IL-10 exerce papel importante na regulação da resposta imune na esquistossomose humana.

1.4 - O GRANULOMA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

A patologia na esquistossomose é mediada, principalmente, pela deposição de ovos de *S. mansoni* no sistema porta do hospedeiro, levando a indução de reação imunológica granulomatosa contra o ovo (COLLEY, 1972; REIS & ANDRADE, 1987). Vários estudos tem demonstrado a participação de células T neste tipo de resposta, que se apresenta como uma reação inflamatória mista, com infiltrado celular composto de células mononucleares, polimorfonucleares, células epitelioides e fibroblastos (DOMINGO & WARREN 1967; WARREN *et al.*, 1972a,b; REIS & ANDRADE, 1987). No camundongo, a intensidade da resposta imune contra o ovo é máxima entre 8 a 10 semanas da infecção. Com a evolução da doença para a fase crônica, a resposta inflamatória sofre uma modulação espontânea com diminuição de tamanho do granuloma (ANDRADE & WARREN, 1964). A modulação espontânea ou regulação do granuloma é, em parte, mediada por células T CD4+ e CD8+ (BOROS, 1986). Alguns estudos demonstraram que, durante a fase crônica da infecção, a modulação da resposta granulomatosa é acompanhada por um aumento da atividade de células T supressoras CD8+ (BOROS, 1986; CHENSUE *et al.*, 1991) e diminuição de células T CD4+ (BOROS *et al.*, 1975; BOROS, 1986).

Evidências para o envolvimento de células T, na resposta imune induzida pelo ovo de *S. mansoni*, foram obtidas ainda através dos estudos de COLLEY e colaboradores (1976) e MADDISON e colaboradores (1978) que observaram que animais atímicos não desenvolviam hepatoesplenomegalia, enquanto animais deficientes de células B apresentavam resposta granulomatosa semelhante àquela encontrada em animais normais infectados. Experimento conclusivo sobre o papel de linfócitos T na resposta imune foi realizado em camundongos atímicos, que não apresentaram resposta granulomatosa típica e a resposta anti-SEA foi significativamente menor, com a presença marcante de monócitos, raros neutrófilos e, ausência de células epiteliais (BRYAN & VON LINCHTENBERG; 1977; PHILLIPS *et al.*, 1977; WELLHAUSEN & BOROS, 1981; DOUGHTY & PHILLIPS, 1982a).

No homem, a cinética de formação do granuloma foi através de biópsias de lesões hepáticas da forma toxêmica (fase aguda) da esquistossomose mansoni (BARROS-COELHO, (1955); BOGLIOLO, (1959); RASO *et al.*, 1965; RASO & BOGLIOLO, 1970). Esses autores mostraram que, em sua evolução, os granulomas esquistossomóticos apresentavam as fases necrótico-exudativa, exudativas, produtivas e, finalmente, cura por fibrose.

Devido a limitações éticas para estudo do granuloma em seres humanos, procurou-se utilizar modelos *in vitro* com células humanas que apresentassem analogia com a reação granulomatosa *in vivo*, com a finalidade de se aprofundar os estudos relacionados aos eventos e tipos celulares envolvidos na formação e modulação do granuloma. Vale ressaltar que um modelo de granuloma *in vitro* similar já havia sido desenvolvido anteriormente para o cultivo de células esplênicas de camundongos, na presença de ovos de *S. mansoni*, obtidos por cultura de vermes adultos (BENTLEY *et al.*, 1982 ; DOUGHTY *et al.* 1982).

O modelo de granuloma *in vitro* com células humanas foi utilizado, posteriormente, para avaliar as interações celulares envolvidas na formação do granuloma, estabelecendo-se uma sequência de eventos caracterizados pela migração e aderência de células mononucleares em torno dos ovos e sua subsequente transformação blástica (DOUGHTY *et al.*, 1982; DOUGHTY *et al.* 1984). A essas reações iniciais, seguia-se a migração de macrófagos epitelioides e a formação de células gigantes (PHILLIPS *et al.*, 1980). As aplicações possíveis do

modelo *in vitro* foram posteriormente estendidas, após a substituição de esferas de látex ligadas covalentemente ao SEA

Outros estudos mostraram que células mononucleares de pacientes de área não endêmica, portadores de infecção esquistossomótica recente, apresentavam alta reatividade em ensaios de formação de granuloma *in vitro* em comparação com a reatividade de células de pacientes INT (DOUGHTY *et al.* 1987). Esses mesmos autores mostraram ainda a participação de populações de células T CD4+ ou CD8+ na regulação da reatividade granulomatosa. Posteriormente, DOUGHTY e colaboradores (1987) mostraram que a formação do granuloma é dependente de células T CD4+, macrófagos e independente de células B e que populações de células CD4+, obtidas de pacientes portadores da forma crônica intestinal inibem parcialmente a reação granulomatosa *in vitro* quando estimuladas pelo SEA.

O modelo de granuloma *in vitro* possibilitou, ainda, o estudo das interações idiotípicas/anti-idiotípicas, utilizando-se anticorpos anti-SEA, na modulação da formação do granuloma formado por PBMC de indivíduos INT (PARRA *et al.*, 1991). Esse estudo sugeriu que a interação de anticorpos idiotípicos anti-SEA com a população de células T era capaz de modular a formação do granuloma *in vitro* e que essa interação era específica, uma vez que não ocorria quando eram utilizadas esferas de poliacrilamida ligadas a PPD ou IgG humana normal nos ensaios de estimulação e modulação por anticorpos.

GOES *et al.* (1991,1994) demonstraram através da utilização do modelo de formação de granuloma *in vitro* atividade reguladora de imunocomplexos obtidos do soro de pacientes na fase crônica da esquistossomose.

FALCÃO e colaboradores (1998) mostraram que a adição de anticorpos anti-IL-10 foi capaz de induzir um aumento no granuloma *in vitro* formado por células mononucleares de pacientes INT quando comparado ao tamanho do granuloma de pacientes HS ou indivíduos não infectados pelo parasita. Esse estudo mostrou ainda que IL-10 recombinante, foi capaz de modular o tamanho do granuloma formado por células de pacientes HS, sugerindo a presença dos receptores nas células desses pacientes para esta citocina.

Esses dados, em conjunto, salientam a importância das interações e dos produtos celulares na formação e modulação da resposta imune granulomatosa.

Todavia, o fenótipo das células envolvidas nessas interações é pouco conhecido, o que nos levou a propor esse estudo que envolve além da caracterização do fenótipo das subpopulações envolvidas na formação do granuloma, a investigação da influência da IL-10 na expressão desses fenótipos e, conseqüentemente, na formação e regulação do granuloma.

2 - OBJETIVO GERAL

Analisar o fenótipo de populações celulares do granuloma *in vitro* e a influência da IL-10 na sua formação.

3 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar o perfil fenotípico da população de PBMC de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da esquistossomose, antes e após formação do granuloma *in vitro*.
2. Avaliar a influência da IL-10 na expressão fenotípica de subpopulações celulares formadoras do granuloma *in vitro*.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - POPULAÇÃO ESTUDADA

Neste estudo, foram utilizadas amostras de sangue de indivíduos portadores de esquistossomose na fase crônica da infecção e de indivíduos não infectados. Os grupos de pacientes na fase crônica intestinal (INT), hepatoesplênica compensada (HE) e indivíduos negativos para *S. mansoni*, residentes em área endêmica (NI), foram compostos de indivíduos moradores das áreas endêmicas para esquistossomose mansoni, do Córrego do Bernardo - distrito rural de Governador Valadares, Boa União, Nova União e Patrimônio Velho - distritos rurais de Itabirinha de Mantena - Estado de Minas Gerais.

As populações dos distritos de Córrego Bernardo, Patrimônio Velho, Boa União e Nova União estão sendo avaliadas através de estudos longitudinais, como parte de projetos de pesquisa sob a responsabilidade do laboratório de Imunologia (Centro de Pesquisas René Rachou-FIOCRUZ). Os pacientes são examinados periodicamente, submetidos à avaliação clínica e a exames de fezes periódicos, utilizando-se o método de Kato/Katz (KATZ *et al.*, 1972). O grupo controle (NI) utilizado nesse estudo foi constituído por indivíduos com exame parasitológico de fezes negativo, que não apresentavam relatos de exposição ao parasita.

Após a constatação de diagnóstico laboratorial positivo para esquistossomose, ou outras infecções helmínticas, todos os pacientes foram tratados, independente da sua participação neste estudo. Indivíduos tratados para esquistossomose mansoni receberam oxaminiquine ou praziquantel na dose padrão brasileira (15-20 mg de oxaminiquine ou 50-60 mg de praziquantel)

Consentimento informado foi obtido de todos os indivíduos incluídos neste estudo. O projeto e os protocolos utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz.

Grupos Clínicos	Idade (Média)	Variação Idade	Homens	Mulheres	Média EPG ² (variação)
NI	19	(19-58)	11	08	-
INT	26	(04-57)	16	10	432 (179-1853)
HS	17	(09-47)	11	06	644 (179-1353)

EPG – Ovos por grama de fezes

Tabela 1 : Características do Grupo de Pacientes

4.2 - PREPARAÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE OVO DE *S.mansoni* (SEA)

O antígeno utilizado neste estudo, foi preparado segundo o método descrito por CARTER & COLLEY (1978). Os ovos de *S. mansoni* foram obtidos do fígado de camundongos SWISS infectados para obtenção do antígeno solúvel de ovos (SEA). Os ovos foram homogeneizados (VirTis '45', VirTis Company) com pistilo de teflon. O homogenato centrifugado a 40000 X g, por 1 hora a 4°C e esterilizado por filtração em Millex-Ha 0.45 (Millipore Corporation). A concentração de proteína foi determinada pelo método de LOWRY & cols., (1951). A concentração final, utilizada nos ensaios de proliferação *in vitro* foi de 25 µg de proteína /ml.

4.3 - OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO

As células mononucleares do sangue periférico de pacientes eram separadas segundo procedimento descrito por GAZZINELLI e colaboradores (1983). O sangue heparinizado, era aplicado em tubos de 50 ml (Pyrex Laboratory Glassware), siliconizados contendo uma mistura de Ficoll-diatrozato, obtida comercialmente (LSM - Lymphocyte Separation Medium, Organon Teknika Corporation, Durhan, NC), na proporção de uma parte de Ficoll-diatrozato para duas partes de sangue. A preparação era submetida a centrifugação por 40 minutos, a 400 X g à temperatura ambiente. Ao final da centrifugação obtinha-se um anel de células mononucleares na interface entre o Ficoll e o plasma, o qual era cuidadosamente removido com o auxílio de uma pipeta Pasteur (Thomas Laboratory Specialities) e transferido para tubos de fundo cônico de 50 ml, estéreis (2070 Graduated conical tube, Falcon). Completava-se o volume para 50 ml de meio de cultura MEM (Minimal Essential Medium, GIBCO) e procedia-se a centrifugação

(10 min, 400 X g, 4°C). As células eram lavadas por mais duas vezes utilizando-se cerca de 30 ml de MEM. Ao final, as células eram ressuspensas em 2 ml de meio de cultura RPMI-1640 (GIBCO). Uma alíquota da suspensão de células era diluída (1:20) em solução de Turck's, e o número de células determinado através de contagem em câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio ótico. A concentração de células era ajustada para uma suspensão contendo 10×10^6 células/ml de RPMI-1640. Toda manipulação das células era realizada em condições estéreis, em capela de fluxo laminar (BBL-Biological Cabinet, model 60474).

4.4 - ENSAIO DE GRANULOMA *IN VITRO*

4.4.1 - LIGAÇÃO DO SEA ÀS ESFERAS DE POLIACRILAMIDA

Para ligação do antígeno de SEA, esferas de poliacrilamida (Bio-gel P-4, 200-400 mesh, BIORAD cat nº 150-0450), eram acondicionadas em frasco de vidro siliconizado, e esterilizados por autoclavagem. Posteriormente as esferas eram hidratadas em 1000 ml de água destilada, por 48 horas, à temperatura ambiente. Após a lavagem em tampão carbonato/bicarbonato 0.5 M, 200 mg de esferas de poliacrilamida eram incubadas, por 4 horas, em banho-maria a 63°C, sob agitação lenta e contínua em tampão carbonato/bicarbonato 0.5 M. Esta operação era repetida novamente, seguida da adição de 20 mg de SEA (Ver item II, M&M), na presença de 100 mg de EDAC (1- etil-3(3-dimetilaminopropil) carbodimida-HCL), (BIORAD) em 100 ml de água destilada acidificada, pH 5.5 - 6.0. O frasco era incubado por 18 horas, a 4°C, sob agitação lenta e contínua. Após esse período, as esferas eram lavadas e estocadas em PBS contendo 0.1% de azida sódica até o momento do uso, quando então eram lavadas, por três vezes em RPMI-1640. Desse modo, obtinha-se esferas de poliacrilamida ligadas ao antígeno solúvel de ovo (PB-SEA). Em paralelo, as esferas de poliacrilamida para controle (PB) eram submetidas aos mesmos reagentes e incubações descritos acima, apenas na ausência de antígeno. Todo o procedimento era realizado em condições estéreis.

4.4.2 - CULTURAS DE CÉLULAS NA PRESENÇA DE ESFERAS DE POLIACRILAMIDA

O ensaio para formação de granuloma *in vitro* era realizado segundo procedimento descrito por DOUGHTY e colaboradores (1987). O meio para cultivo de células continha 1.6% de L-glutamina (Solução estoque: 200 mM, GIBCO), 3% de coquetel de antibióticos (10000 U de penicilina e 10000 U de estreptomicina e 25 µg de fungizona/ml), 10% de NHS (Soro humano AB⁺). A esse meio, eram adicionadas as células mononucleares do sangue periférico numa concentração de 10×10^6 células/ml. O cultivo era feito em placas de 24 poços (COSTAR). Além das PBMCs, a cada poço acrescentavam-se 200 a 300 esferas de PB ou PB-SEA, completando-se o volume para 1.5 ml com meio de cultura. As culturas eram mantidas a 37°C em ar úmido contendo 5% de CO₂, em incubadora, por 5 dias. No último dia de cultura, avaliava-se a reação granulomatosa por quantificação da intensidade da reatividade celular em torno das esferas de poliacrilamida, utilizando-se microscópio invertido (IMT-2 Olympus Optical Co.). A reatividade celular era determinada com base nas observações morfológicas, de acordo com critério previamente descrito que leva em consideração o número de células ligadas às esferas, evidências visuais de células blásticas, acompanhadas de migração celular e células aderidas ao redor das esferas. Para cada poço de cultura era determinada a reatividade de 100 esferas/por poço. A cada reação era dado um valor numérico de acordo com esquema apresentado na Tabela 2.

Índice de Granuloma	Alterações Morfológicas
1	≤ 1 célula aderida
2	Até 5 células aderidas
3	> 5 células aderidas
4	> 5 células aderidas + migração celular
5	1 camada células + migração celular
6	>1 camada células + migração celular

Tabela 2 - Classificação dos granulomas em torno de cada esfera de Poliacrilamida

A média ponderada de classificação de 100 esferas em cada poço era expressa como índice de granuloma (GI). Cada cultura era feita em triplicatas e a média das triplicatas era apresentada, com respectivo desvio padrão.

4.4.3 – ANTICORPOS

O anticorpo monoclonal anti-IL-10 (JES3-9D7), assim como a IL-10 recombinante (rIL-10) foram gentilmente cedidos pelo DNAX Research Institute. Os anticorpos eram adicionados às culturas no dia 0, em volume de 25 µl previamente diluídos para concentrações finais previamente estabelecidas de 20 µg para os ensaios de formação de granuloma *in vitro*. A concentração de rIL-10 utilizada nos ensaios de formação de granuloma foi estabelecida em estudos anteriores para 2 U/ml. Em paralelo, foi utilizado IgG de rato (GL113) anti-βgalactosidase de *Escherichia coli* nas mesmas concentrações, como controle para os anticorpos anti-IL-10.

Foto representativa de cultura de PBMC de paciente INT, na presença de esferas de poliacrilamida não ligadas ao antígeno solúvel de ovo de *S. mansoni* (PB). Estabeleceu-se o índice 2 para esta reação, após 5 dias de cultura.

Foto representativa de reação granulomatosa de PBMC de paciente INT, na presença de esferas de poliacrilamida ligadas ao antígeno solúvel de ovo de *S. mansoni* (PB-SEA). Estabeleceu-se o índice 4 para esta reação, após 5 dias de cultura.

4.5 - COLETA DE CÉLULAS PROVENIENTES DOS GRANULOMAS FORMADOS *IN VITRO*

No 5º dia de cultura, após a contagem dos granulomas e atribuição do índice como descrito anteriormente, 1 ml de sobrenadante de cada poço (triplicata) era desprezado. Em seguida, as placas eram incubadas por 30 min. em banho de gelo. O conteúdo (500 µl) de cada triplicata era então homogeneizado nos poços com pipeta de 500 µl. As células eram removidas com o auxílio de “scraper” e transferido para tubos Falcon de 15 ml contendo 5 ml de RPMI-1640. Uma nova homogeneização vigorosa (1 min.) era feita em vortex com o objetivo de permitir a remoção das células aderidas às esferas. Em seguida o material era filtrado em uma tela apropriada com trama de 200 µm, de maneira que as esferas já livre de células, ficavam retidas na tela. O conteúdo filtrado era então centrifugado a 4° C, durante 5 min., a 1000 rpm. As células eram contadas e a concentração ajustada para 10×10^6 células/ml em RPMI-1640 e submetidas aos ensaios de imunofluorescência para análise por citometria de fluxo.

4.6 - CITOMETRIA DE FLUXO

4.6.1 - IMUNOFLUORÊSCENCIA PARA ANÁLISE CITOMÉTRICA DE CÉLULAS MONONUCLEARES *EX-VIVO* E DAS PROVENIENTES DOS GRANULOMAS FORMADOS *IN VITRO*.

Os ensaios de imunofluorescência para população de células mononucleares de sangue periférico *ex vivo* e das provenientes dos granulomas formados *in vitro* foram realizados segundo protocolo indicado pela Becton Dickinson, e adaptado para placas de 96 poços, como descrito abaixo.

Às placas de 96 poços eram adicionados 25 µl de solução de anticorpo monoclonal específico para o receptor celular de interesse, marcados com fluorocromo, diluídos 1:5 em Tampão FACS (PBS 1% BSA, pH 7.4). Para cada teste, foram utilizados 25 µl de células mononucleares, o equivalente a 250.000 células por poço. As placas eram incubadas por 20-30 min., ao abrigo da luz, à 4°C. As amostras eram lavadas 1 vez com 200 µl de PBS 0.015M pH 7.4 por centrifugação

(1300 rpm, 7 min à 4°C) e o sobrenadante desprezado. As amostras eram então fixadas com 200 µl de solução fixadora (10 g/l de paraformaldeído, 1% de Cacodilato de Sódio, 6.67 g/l de cloreto de Sódio, pH 7.2). Após um período de 30 min., a 4°C, as amostras eram transferidas para tubos de 1 ml e os parâmetros fenotípicos das células presentes em cada amostra determinado, com o auxílio de um citômetro de fluxo (FACScan Becton Dickinson). A identificação das populações celulares de interesse bem como a determinação do valor percentual de populações e subpopulações celulares e a expressão de moléculas co-estimuladoras e de adesão nessas populações eram feitas utilizando-se o software *cell quest* acoplado ao citômetro.

A figura 1 mostra, de forma esquemática, a sequência de procedimentos necessários para análise dos dados obtidos por citometria de fluxo. O primeiro passo consistiu na identificação de linfócitos. Para isso foram utilizados gráficos de distribuição puntual onde essa população ocupa uma região característica após ajustes de ganhos de seu tamanho - FSC e granulosidade - SSC (R1, Figura 1A). Após a seleção da região de interesse, foi analisada a intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes na região selecionada, utilizando-se gráficos de distribuição puntual de fluorescência 1 (FL1) versus fluorescência 2 (FL2) (Figura 1B e C). A fluorescência do tipo 1 representa células marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC) e a fluorescência do tipo 2 representa células marcadas com ficoeritrina (PE). As análises de subpopulações celulares foram realizadas através de combinações de gráficos pontuais e de histogramas de fluorescência individual (Figura 1 C, D e E). Os marcadores de superfície celular que apresentavam distribuição bimodal, permitindo a discriminação de populações positivas e negativas foram analisados por "dot plot". A análise era realizada através da determinação do percentual de células positivas para os marcadores de interesse. No caso de marcadores de superfície de células com distribuição unimodal, a análise quantitativa era realizada através da determinação do canal médio de fluorescência (CMF) em histogramas unidimensionais. Gráficos de distribuição puntual foram utilizados para obtenção dos valores percentuais de subpopulações celulares dentro de região de linfócitos (Figuras 1B e C). Os histogramas de fluorescência individual foram utilizados para seleção de subpopulação linfocitária de interesse, seguida pela análise da expressão de um outro marcador pela população selecionada. Esta

seleção da população expressando o primeiro marcador de interesse foi feita através do posicionamento de uma região sobre a população celular fluorescente (R2, Figura 1 D). Em seguida, procedeu-se à criação de uma região virtual R3, que continha as células presentes em R1 e R2, simultaneamente. Ao final destas etapas obtinha-se um histograma de fluorescência individual demonstrando o valor percentual da subpopulação expressando o segundo marcador de interesse.

Observação : Os ensaios nos quais foi utilizada a dupla marcação, por exemplo , percentual de células CD4⁺CD28⁺ avaliados da população de células T CD4⁺, foram expressos pelo percentual médio segundo a expressão matemática:

$$\text{Ex: } \frac{\text{CD4}^+ \text{ CD28}^+}{\text{CD4}^+} \times 100$$

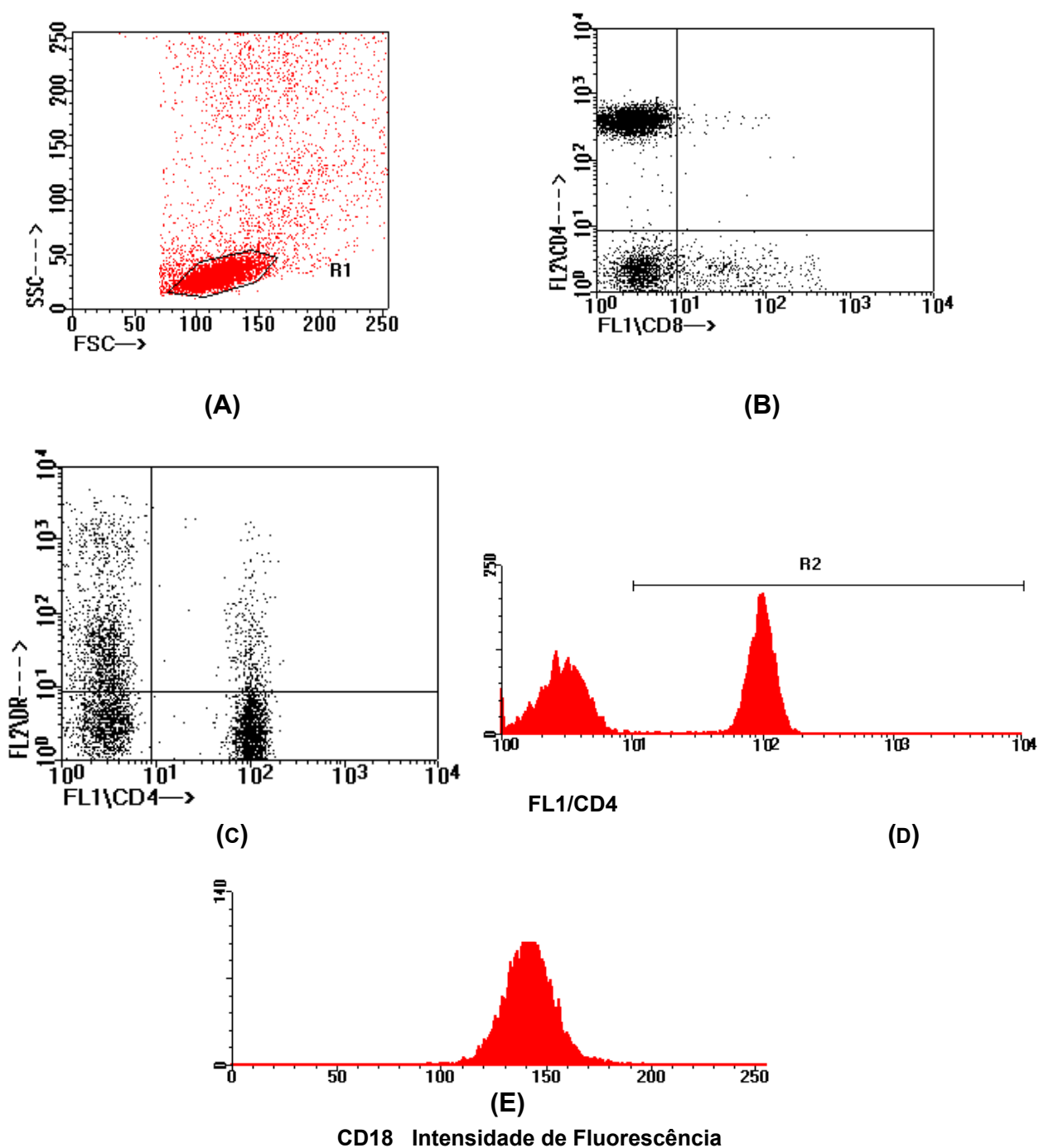


Figura 1 – Representação esquemática da sequência da análise dos dados obtidos por citometria de fluxo. Gráficos de distribuição puntual FSC x SSC são utilizados para seleção da população linfocitária – R1 (A). Gráficos de distribuição puntual; FL1 x FL2 são utilizados para análise de subpopulações celulares excludentes (B) ou para análise de subpopulações celulares (C). Histogramas de fluorescência individual são utilizados para seleção de populações linfocitárias – R2 (D). O percentual de subpopulações dentro das populações de interesse (R1 e R2, simultaneamente = R3) é obtido através de histograma de fluorescência individual (E).

4.7 - MARCADORES DE SUPERFÍCIE CELULAR

Os marcadores de superfície celular utilizados nos ensaios realizados com células mononucleares do sangue periférico obtidas *ex vivo* e nos ensaios de formação de granuloma *in vitro* foram os seguintes: Anticorpos marcados com fluoresceína (FITC) – anti-CD2, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19 e anti-CD14 e com ficoeritrina (PE) – anti-CD3, anti-CD28, anti-CD18 (LFA-1), anti-CD80 (B7-1), anti-CD86 (B7-2) , anti-CD62L(L-selectina) anti-HLA-DR.

4.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quando a comparação foi feita entre dois grupos utilizou-se o teste T-student. Para análise de mais de dois utilizou-se o teste de análise de variância (ANOVA). As amostras que apresentaram diferenças estatisticamente significativas foram submetidas ao teste de Scheffe e Bonferroni. Foi adotado um nível de significância de 5%. A análise foi feita intergrupos (*ex vivo* X 5° dia) ou (PB-SEA X PB-SEA α IL-10) e (PB-SEA X PB-SEA rIL-10) e intragrupos (NI X INT X HS). O 'software' utilizado para as análises foi SPSS for windows.

5 - RESULTADOS

Os resultados foram divididos em duas seções: na primeira, comparou-se os parâmetros avaliados no contexto *ex vivo* com aqueles obtidos após cultura *in vitro*, com objetivo de avaliar possíveis alterações nas populações celulares, na expressão de moléculas de co-estimulação e de adesão, induzidas pela formação do granuloma *in vitro*. Em seguida, foi realizada a análise da expressão desses marcadores celulares, na presença de anticorpos anti-IL-10 ou IL-10 recombinante, com objetivo de investigarmos o efeito do bloqueio da IL-10 ou rIL-10 em cultura de granuloma *in vitro*.

Os dados serão apresentados da seguinte maneira: primeiramente, linfócitos T CD3⁺, CD4⁺ e CD8⁺ e os marcadores co-expressos pelas populações CD4⁺ e CD8⁺. Em seguida, as células apresentadoras de antígenos CD19⁺ e CD14⁺ e os marcadores co-expressos por essas duas populações.

Pacientes INT apresentam diminuição significativa do percentual de linfócitos T CD3⁺ após cultura do granuloma *in vitro*

Os resultados da Figura 2 mostram o percentual médio de linfócitos T CD3⁺ na população de linfócitos totais do sangue periférico de indivíduos dos grupos NI, INT e HS avaliados antes (*ex vivo*) e após cultura de granuloma *in vitro*.

A análise dos dados mostrou que o grupo INT diferiu significativamente antes (64,2%) e após cultura (54,3%), o que não ocorreu nos grupos NI e HS avaliados antes (NI= 69,3% e HS= 62,0%) e após cultura (NI= 65,8% e HS= 58,8%). No contexto *ex vivo*, a análise entre os grupos NI, INT e HS mostrou que o grupo HS (62,0%) diferiu significativamente do grupo NI (69,3%). Por sua vez, o mesmo não foi observado em relação ao grupo INT (64,2%) não diferiu do grupo NI.

As culturas PB-SEA (NI=65,8%, INT=54,2%, HS=58,7) diferiram das culturas controle (PB) (NI=44,5%, INT=41,5%, HS=39,7%).

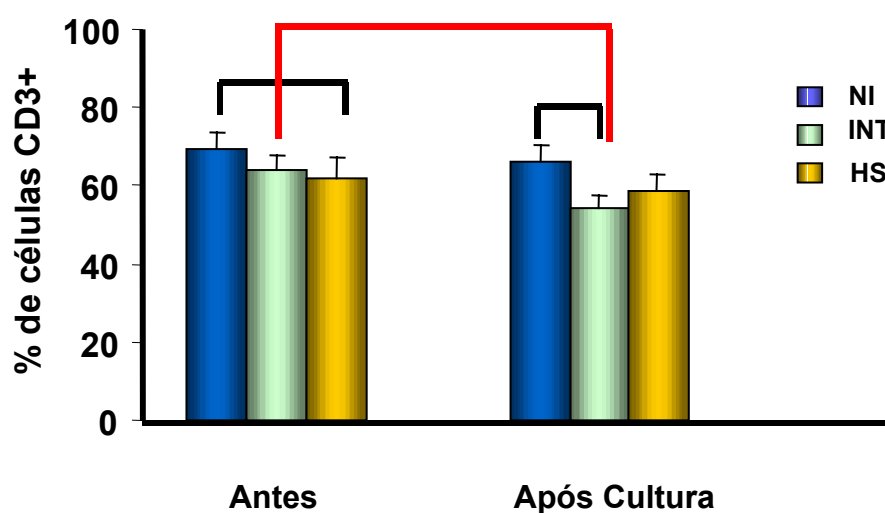


Figura 2 – Percentual médio de linfócitos T CD3⁺ obtidos antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes NI, INT e HS. A população celular foi identificada utilizando-se anticorpo monoclonal anti-CD3 marcado com o fluorocromo FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. As diferenças estatísticas ($p < 0.05$) na análise entre os grupos (NI, INT e HS) estão indicadas pelas chaves pretas e na análise antes e após a cultura pela chave vermelha. Número de pacientes (N) = 19, 26 e 17 para NI, INT e HS, respectivamente.

O percentual de linfócitos T CD4⁺ diminui significativamente após cultura do granuloma *in vitro* no grupo INT

A análise da Figura 3 apresenta o percentual médio de linfócitos T CD4⁺ na população de linfócitos totais do sangue periférico de indivíduos dos grupos NI, INT e HS avaliados antes e após cultura de granuloma *in vitro*.

A análise mostrou que o grupo INT diferiu antes (39,2%) e após a cultura (30,5%). Os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas antes (NI= 40,8% e HS= 32,4%). e após cultura (NI= 40,1% e HS= 31,3%).

No contexto *ex vivo*, a análise entre os grupos NI, INT e HS mostrou que o grupo HS (33,4%) diferiu significativamente do grupo NI (40,8%). Por sua vez, o grupo INT (38,2%) não diferiu do grupo NI.

A análise após cultura mostrou que os grupos INT (31,5%) e HS (31,3%) diferiram do grupo NI (40,1%) nas culturas PB-SEA como, também, nas culturas controle (PB) (NI=34,6%, INT=25,6%, HS=26,7%)

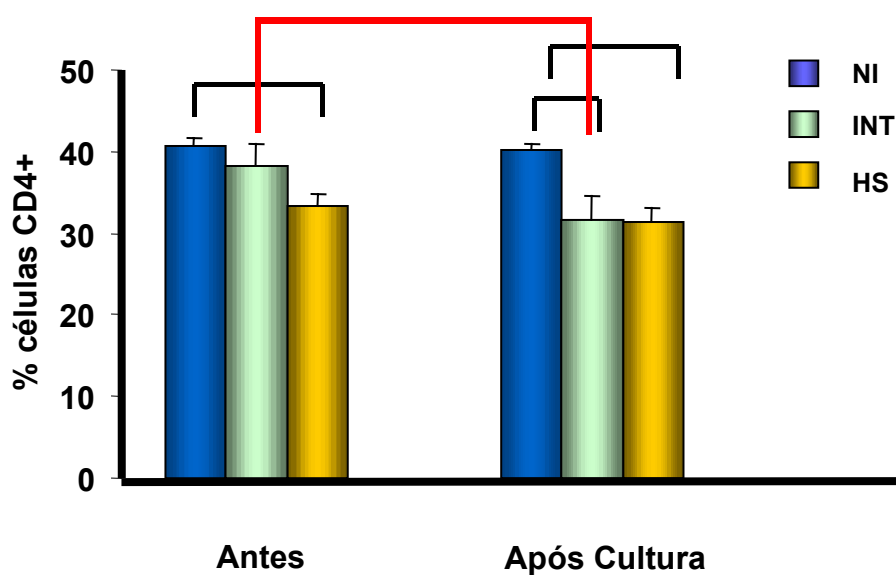


Figura 3 – Percentual médio de linfócitos T antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de pacientes NI, INT e HS. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoplanos anti-CD4 marcados com o fluorocromo FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. As diferenças estatísticas ($p < 0.05$) na análise entre os grupos (NI, INT e HS) estão indicadas pelas chaves pretas e na análise antes e após a cultura pela chave vermelha. As médias de PB foram estatisticamente significativas em relação a PB-SEA. Número de pacientes (N) = 19, 26 e 17 para NI, INT e HS, respectivamente.

O percentual de linfócitos T CD4⁺ expressando HLA-DR não é alterado após cultura com PBMC no granuloma *in vitro*

Os resultados apresentados na Figura 4 mostram o percentual de linfócitos T CD4⁺HLA-DR⁺ avaliados na população de linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico de pacientes dos grupos NI, INT e HS antes e após cultura de granuloma *in vitro*. Os grupos (NI=8,9%, INT=11,3% e HS=17,3%) não apresentaram após a cultura de granuloma nenhuma diferença estatisticamente significativa em relação à análise *ex vivo* (INT=12,1% ; HS=16,0% e NI=8,3%).

A análise no contexto *ex vivo* entre NI, INT e HS mostrou que os grupos HS (16,0%) e INT (12,1%) diferiram grupo NI (8,3%). Após cultura apenas o grupo HS (17,3%) diferiu dos demais (NI=8,9% e INT=11,3%).

As culturas PB-SEA (NI=8,9%, INT=11,3%, HS=17,3%) diferiram das culturas controle (PB) (NI=5,9%, INT=8,4%, HS=10,3%).

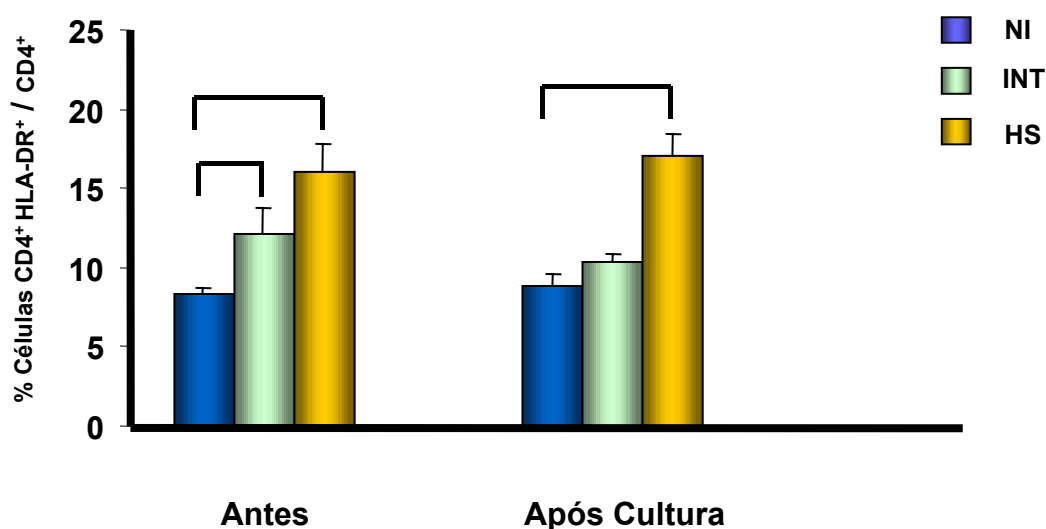


Figura 4 - Percentual médio de linfócitos T CD4⁺ HLA-DR⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI INT e HS.

Ensaio de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células T CD4 que co-expressam o marcador HLA-DR. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-HLA-DR marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. As diferenças estatísticas ($p < 0.05$) na análise entre os grupos (NI, INT e HS) estão indicadas pelas chaves pretas. Número de indivíduos (N) = 19, 26 e 17 para NI, INT e HS, respectivamente.

Grupo INT apresenta diminuição significativa do percentual de linfócitos T CD4⁺ expressando CD28 após cultura de granuloma *in vitro*

Os resultados apresentados na Figura 5 mostram o percentual de linfócitos T CD4⁺CD28⁺ avaliados na população de linfócitos T CD4⁺ do sangue periférico de pacientes dos grupos NI, INT e HS. A análise mostrou que apenas o grupo INT diferiu significativamente antes (95,6%) e após cultura (74,2%). Já os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas antes (NI=87,9%, HS=91,4%) e após cultura de granuloma *in vitro* (NI=85,6%, HS=88,9%).

Os grupos NI, INT e HS não mostraram diferenças estatisticamente significativas antes da cultura (*ex vivo*) (NI=87,9%, INT=95,6%, HS=91,4%). Após cultura apenas o grupo INT(74,2%), nas culturas PB-SEA, diferiu significativamente dos demais (NI=87,9% e HS=91,4%).

As médias do controle PB (NI=61,6%, INT=63,8% e HS=66,7%) foram significativamente menores em relação a PB-SEA (NI=85,6%, INT=74,2% e HS=88,9%).

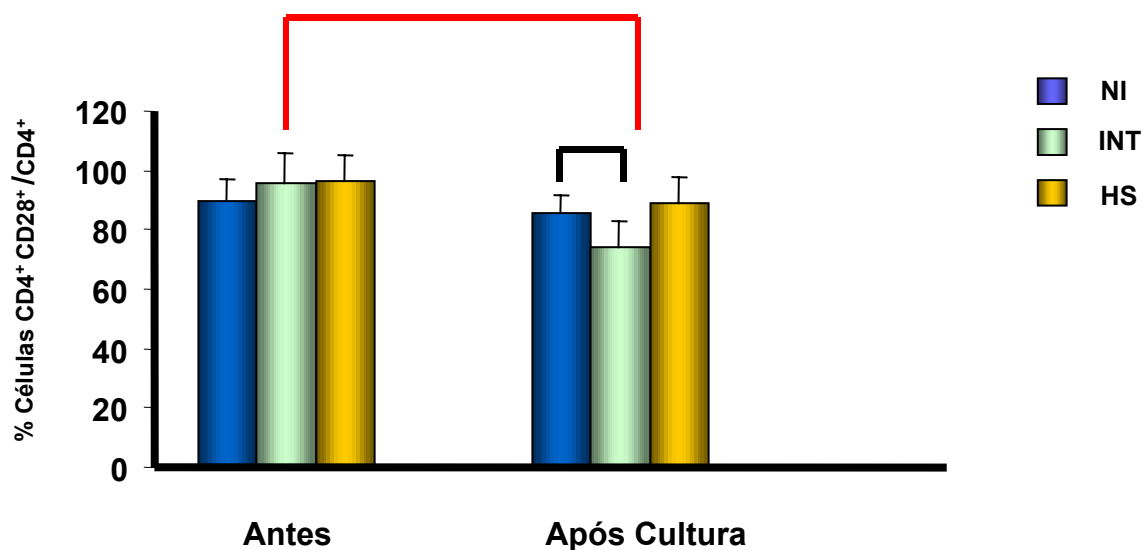


Figura 5– Percentual médio de linfócitos T CD4⁺ CD28⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI INT e HS. Ensaios de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células T CD4 que co-expressam o marcador CD28. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD28 marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. As diferenças estatísticas ($p < 0.05$) na análise entre os grupos (NI, INT e HS) estão indicadas pelas chaves pretas e na análise antes e após a cultura (*ex vivo* X 5^o dia) pela chave vermelha. Número de indivíduos (N) = 19, 26 e 17 para NI, INT e HS, respectivamente.

Expressão do marcador CD18 não é alterado após cultura de granuloma *In vitro*

Os resultados apresentados na Figura 6 mostram a expressão do marcador CD18 (LFA-1) avaliado na população de linfócitos T CD4⁺ no sangue periférico de pacientes dos grupos NI, INT e HS antes e após cultura de granuloma *in vitro*. Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas no percentual médio de expressão do marcador CD18 antes (NI=92,1%, INT=107,8%, HS=114,5%) e após a cultura de granuloma (NI=94,5%, INT=111,5%, HS=121,3%).

Por outro lado, a análise entre os grupos clínicos antes e após cultura mostrou diferenças estatisticamente significativas no grupo HS em relação ao NI

As médias das culturas PB (NI=79,8%, INT=89,7%, HS=98,7%) foram significativamente menores em relação a PB-SEA (NI=94,5%, INT=111,5%, HS=121,3%).

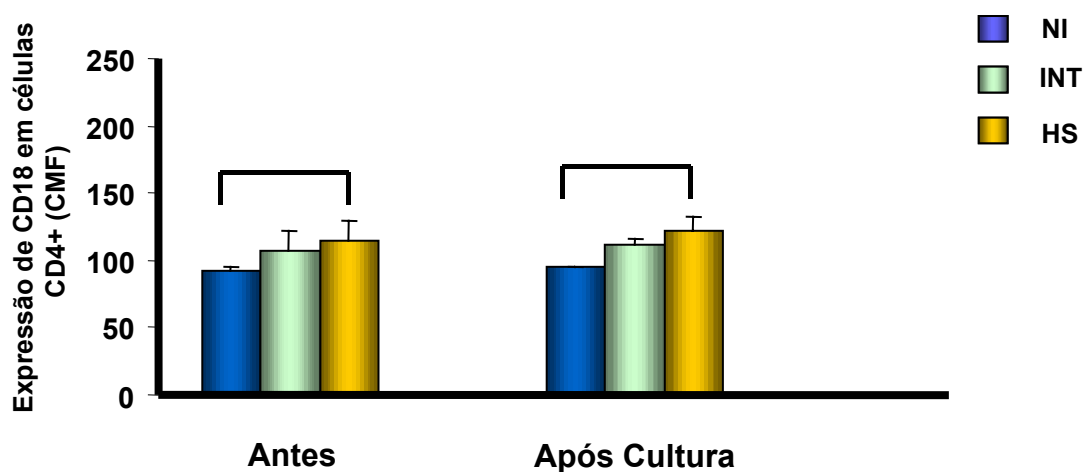


Figura 6 – Percentual médio de intensidade de fluorescência do marcador CD18 expresso na população de linfócitos T CD4+ obtidos antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. Ensaio de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células T CD4 que co-expressam o marcador CD18. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD18 marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. As diferenças estatísticas ($p < 0.05$) na análise entre os grupos (NI, INT e HS) estão indicadas pelas chaves pretas. (CMF) – Canal médio de fluorescência. N = (19, 26 e 17) para NI, INT e HS, respectivamente.

O Percentual de linfócitos T CD4⁺ expressando CD62 não é alterado cultura com PBMC de granuloma *In vitro*

Os resultados apresentados na Figura 7 mostram o percentual de L-selectina (CD62L) avaliados na população de linfócitos CD4⁺ do sangue periférico de pacientes dos grupos NI, INT e HS. Não constatamos nenhuma diferença estatisticamente significativa no percentual médio de linfócitos T CD4⁺CD62⁺ antes (NI=8,7%, INT=12,5%, HS=15,4%) e após cultura (NI=7,2%, INT=11,2%, HS=16,7%).

Por outro lado, a análise entre os grupos de pacientes mostrou que os grupos INT e HS diferiram significativamente do grupo NI antes e após cultura.

As culturas estimuladas com PB-SEA (INT=11,2%; HS=15,4%) foram significativamente maiores do que as culturas controle (PB) para os grupos INT (6,8%) e HS (7,8%). O grupo NI (7,2%) em PB-SEA não diferiu de PB (5,6%).

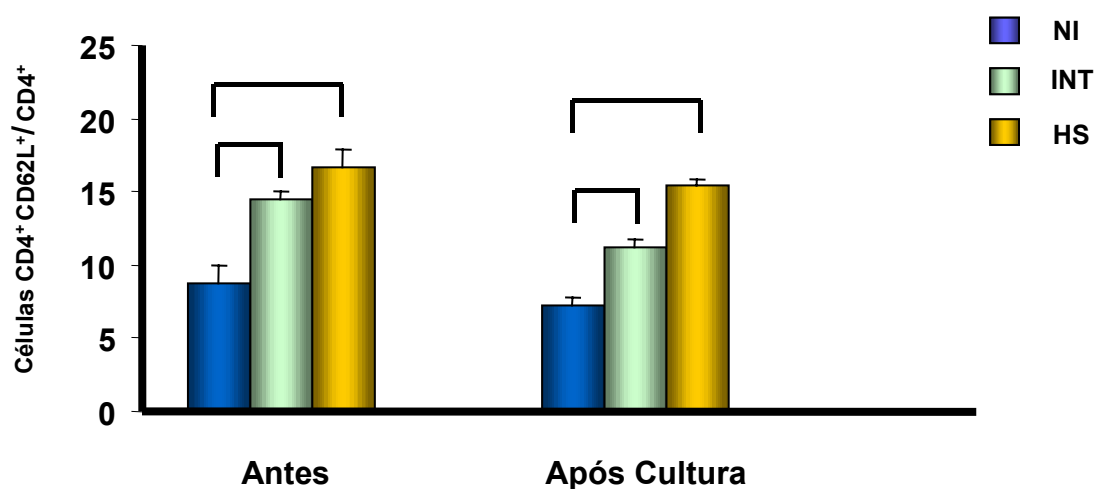


Figura 7 – Percentual médio de linfócitos T CD4⁺ CD62L⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. Ensaio de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células T CD4 que co-expressam o marcador CD62. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD62 marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvio padrão. As diferenças estatísticas na análise intragrupos (NI, INT e HS) estão indicadas por linhas entre barras. $p < 0.05$.

Número de indivíduos (N) = 19, 26 e 17 para NI, INT e HS, respectivamente.

O Percentual de linfócitos T CD8⁺ não é alterado após cultura de granuloma *in vitro*

O percentual de linfócitos T CD8⁺ na população de linfócitos totais do sangue periférico de pacientes do grupo NI, INT e HS estão mostrados na Figura 8. Os dados não mostraram diferença estatisticamente significativa do percentual de linfócitos T CD8⁺ antes (NI=31,2%, INT=33,4%; HS=26,0%;) e após cultura (NI=31%, INT=31,3%; HS=24,5%;) para nenhum dos grupos investigados.

Por sua vez, a análise entre os grupos mostrou que o grupo HS diferiu significativamente antes (26,0%) e após cultura (24,5%) em relação ao grupo NI ($p < 0,05$). O mesmo não ocorreu em relação ao grupo INT quando comparado antes e após cultura com o grupo NI.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas culturas PB (NI=26,2, INT=28,1%, HS=24,9%) em relação a PB=SEA (NI=31%, INT=31,3%; HS=24,5%;).

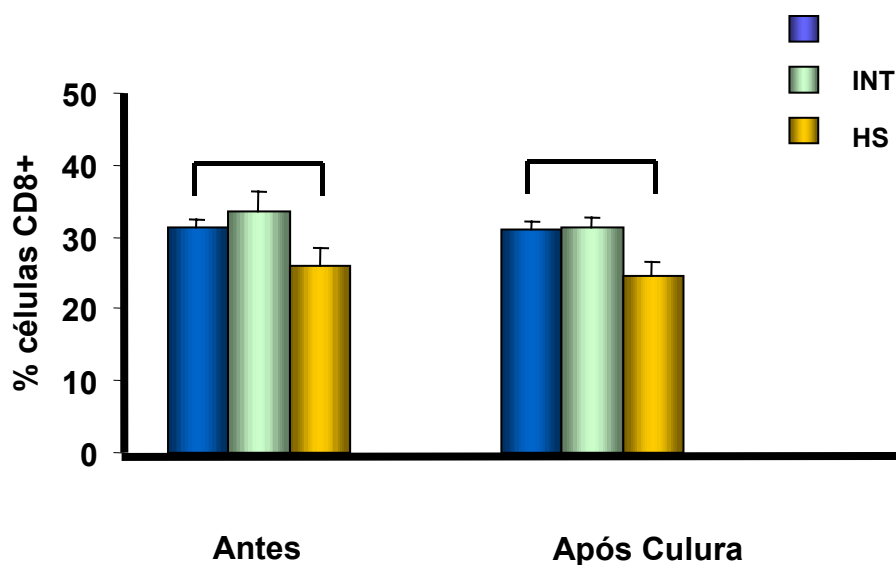


Figura 8– Percentual médio de linfócitos T CD8⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 marcados com o fluorocromo FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. As diferenças estatísticas na análise entre os grupos (NI, INT e HS) estão indicadas por linhas entre barras. $p < 0.05$. N = 19, 26 e 17 para NI, INT e HS, respectivamente.

O Percentual de linfócitos T CD8⁺ ativados não é alterado após cultura de granuloma *In vitro*

Os resultados apresentados na Figura 9 mostram o percentual de linfócitos T CD8⁺HLA-DR⁺ avaliados na população de linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico de pacientes dos grupos NI, INT e HS antes e após cultura de granuloma *in vitro*. A análise dos resultados não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa dos valores percentuais nos grupos antes (NI=21,4%,INT=25,3% ; HS=33,7%,) e após cultura (NI=21,8%,INT=25,6% ; HS=36,9% e).

A análise entre os grupos de pacientes mostrou que apenas o grupo HS diferiu significativamente antes (33,7%) e após cultura (36,9%) quando comparado aos demais grupos antes (NI=21,4% e INT=25,3%) e após cultura (NI=21,8% e INT=25,6%). O mesmo ocorreu nas culturas PB (NI=19,2%,INT=22,1%, HS=30,6%).

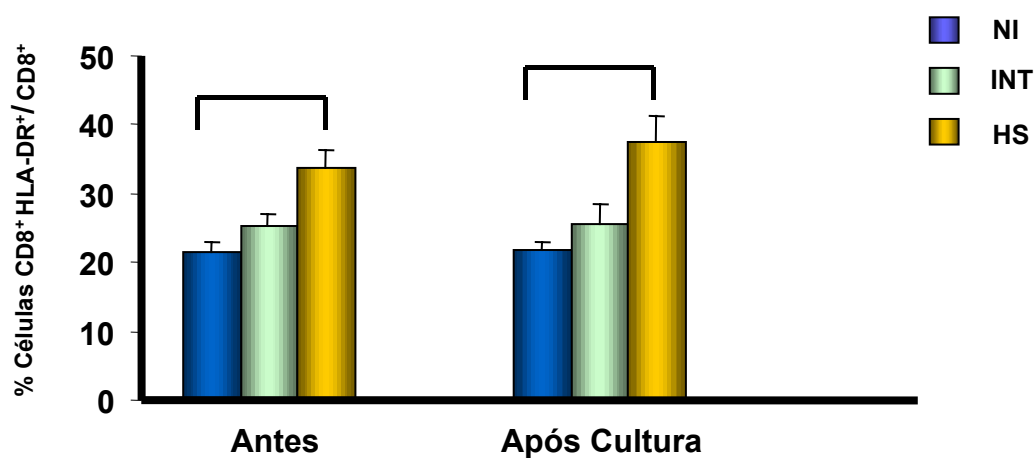


Figura 9 – Percentual médio de linfócitos T CD8⁺ HLA-DR⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. Ensaio de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células T CD8 que co-expressam o marcador HLA-DR. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 e anti-HLA-DR marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. As diferenças estatísticas na análise intragrupos (NI, INT e HS) estão indicadas por linhas entre barras. $p < 0.05$. N = 19, 26 e 17 para NI, INT e HS, respectivamente.

O Percentual de Linfócitos T CD8⁺ expressando CD28 não é alterado após cultura de granuloma *In vitro*

Os resultados da Figura 10 mostram o percentual de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ avaliados na população de linfócitos CD8⁺ do sangue periférico de pacientes dos grupos NI, INT e HS antes e após cultura de granuloma *in vitro*. Os resultados não mostraram nenhuma diferença estatisticamente significativa no percentual médio de linfócitos T CD8⁺CD28⁺ nos grupos antes (NI= 47,8%,INT= 55,4%; HS= 45,6%) e após cultura (NI= 49,7%, INT= 57,8%; HS= 45,9%).

Todavia, a análise entre os grupos mostrou que o grupo INT diferiu significativamente dos demais antes e após cultura ($p < 0,05$).

As médias das culturas PB (NI=41,1%, INT=44,5%, HS=30,6%) foram significativamente menores em relação a PB-SEA (NI=49,7%, INT=57,8%, HS=45,9%).

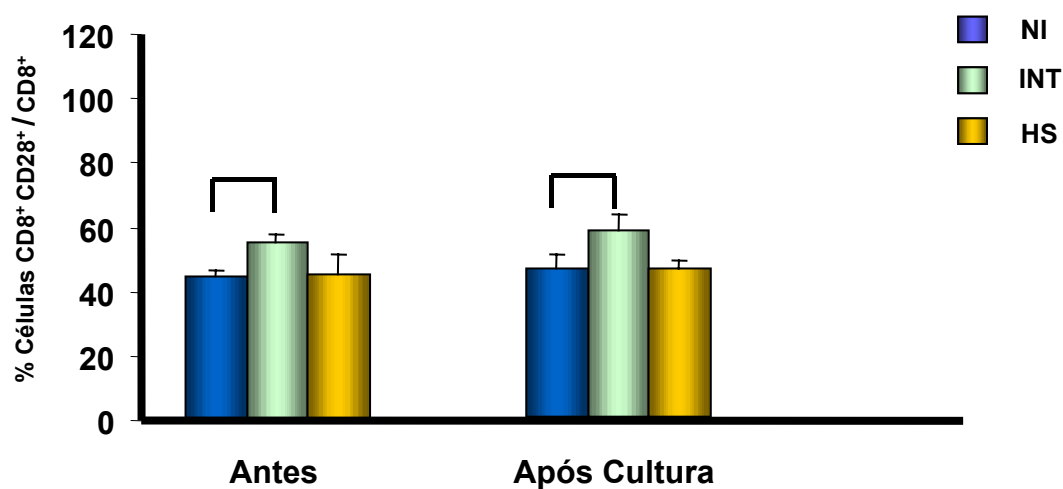


Figura 10 – Percentual médio de linfócitos T CD8⁺ CD28⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. Ensaio de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células T CD8 que co-expressam o marcador CD28. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 e anti-CD28 marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. As diferenças estatísticas na análise intragrupos (NI, INT e HS) estão indicadas por linhas entre barras. $p < 0.05$.

N = 19, 26 e 17 para NI, INT e HS, respectivamente.

Expressão do marcador CD18 na população de linfócitos T CD8⁺ não é alterado após cultura de granuloma *In vitro*

Os resultados apresentados na Figura 11 mostram a média de expressão do marcador CD18 avaliado na população de linfócitos T CD8⁺, no sangue periférico de indivíduos dos grupos NI, INT e HS antes após cultura de granuloma *in vitro*. Os resultados não mostraram nenhuma diferença estatisticamente significativa na média de expressão do marcador CD18 por linfócitos T CD8⁺ nos grupos avaliados antes (NI= 88,7%, INT= 99,6%; HS= 107,8%). e após cultura (NI= 90,1; INT=107,6; HS=111,6).

A análise dos grupos mostrou que indivíduos HS avaliados antes (107,8%) e após cultura (111,6%) apresentaram uma média de expressão de CD18 significativamente maior ($p < 0,05$) em relação ao grupo NI. O grupo INT (107,8%) diferiu do grupo NI (90,1%) apenas após cultura

As médias das culturas PB (NI=71,1%, INT=82,1%, HS=89,7%) foram significativamente menores em relação a PB-SEA (NI= 90,1; INT=107,6; HS=111,6).

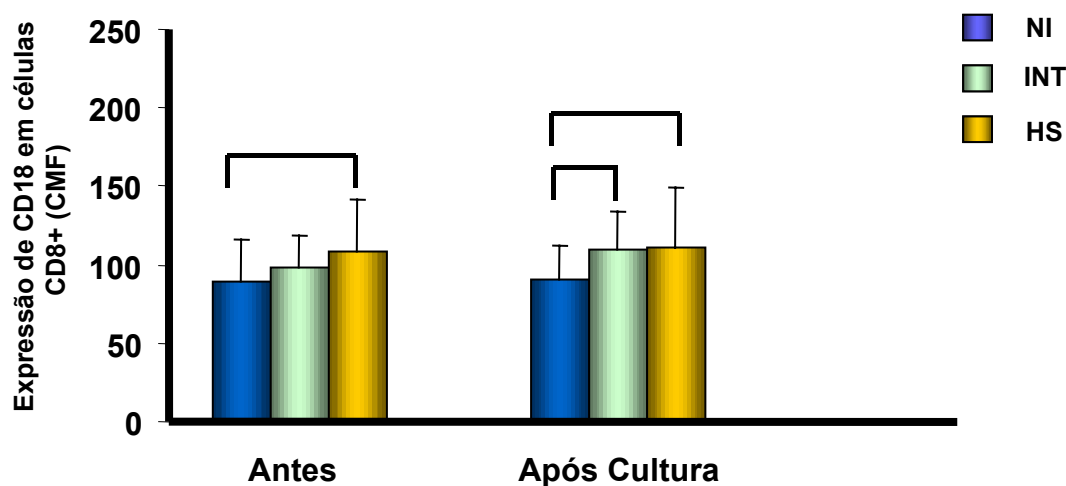


Figura 11– Percentual médio de intensidade de fluorescência do marcador CD18 expresso na população de linfócitos T CD8+ obtidos antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. Ensaio de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células T CD8 que co-expressam o marcador CD18. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 e anti-CD18 marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. As diferenças estatísticas na análise intragrupos (NI, INT e HS) estão indicadas por linhas entre barras. $p < 0.05$. (CMF) – Canal médio de fluorescência. N = 19, 17 e 26 para NI, INT e HS, respectivamente

Pacientes INT apresentam diminuição significativa do percentual de linfócitos T CD8⁺ expressando CD62 após cultura granuloma *in vitro*

Os resultados apresentados na Figura 12 mostram o percentual de linfócitos CD8⁺CD62L⁺ avaliados na população de linfócitos CD8⁺ do sangue periférico de indivíduos dos grupos NI, INT e HS antes e após cultura de granuloma *in vitro*. A análise dos resultados mostrou que apenas o grupo INT diferiu significativamente quando avaliado antes (INT=16,7%) e após cultura (INT=11,2%) ($p < 0,05$). Já os demais grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas antes (NI=8,7%, HS=17,9%) e após cultura (NI=7,9%, HS=15,4%).

A análise entre os grupos de pacientes mostrou que os grupos INT e HS diferiram significativamente do grupo NI antes (INT=16,7%, HS=17,9%) e após cultura (INT=11,2%, HS=15,4%) ($p < 0,05$).

Nas médias das culturas PB, os grupos HS e INT diferiram do NI (NI=5,6%, INT=10,5%, HS=11,7%) Apenas a média de PB no grupo INT não diferiu da média de PB-SEA.

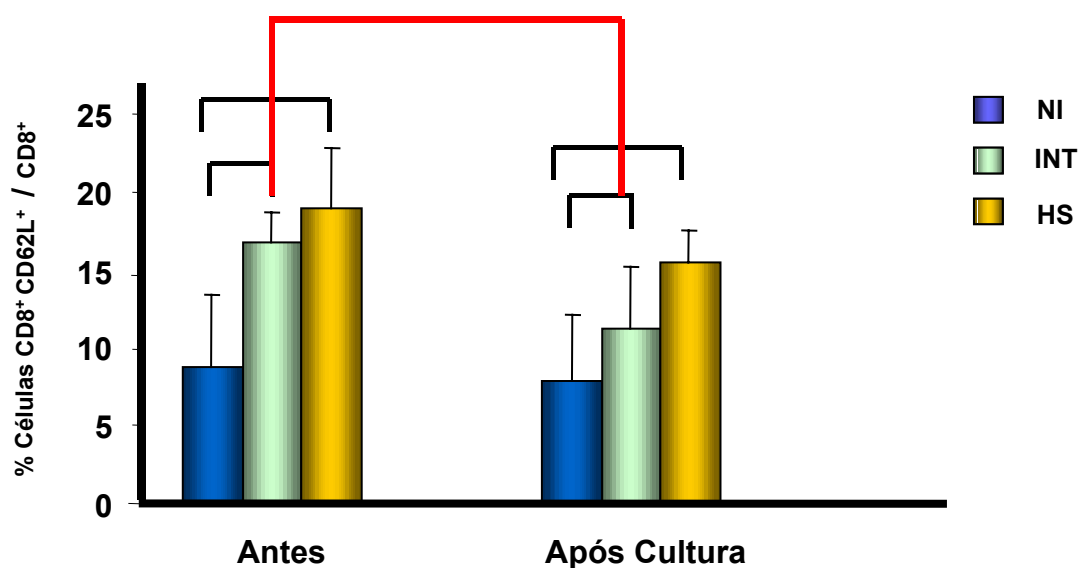


Figura 12 – Percentual médio de linfócitos T CD8⁺ CD62L⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI INT e HS. Ensaios de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células T CD8 que co-expressam o marcador CD62. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 e anti-CD62 marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. As diferenças estatísticas na análise entre os grupos NI, INT e HS estão indicadas por chaves pretas entre barras e na análise entre *ex vivo* após cultura por chave vermelha. $p < 0.05$.

N = 19, 26 e 17 para NI, INT e HS, respectivamente.

O Percentual de células B CD19⁺ não é alterado após cultura de granuloma *in vitro*

O percentual de células B CD19⁺ na população de linfócitos totais do sangue periférico de indivíduos dos grupos NI, INT e HS antes e após a cultura de granuloma *in vitro* estão apresentados na Figura 13. A análise dos dados não mostrou nenhuma diferença estatisticamente significativa do percentual de linfócitos B CD19⁺ antes (NI=9,7%, INT=14,2%; HS=17,6%) e após a cultura (NI=9,1%, INT=14,8%; HS=15,4%) em nenhum dos grupos investigados.

Já na análise entre os grupos, os resultados mostraram que os indivíduos HS e INT avaliados antes (INT=14,2%; HS=17,6%) e após cultura (INT=15,4%, HS=14,8%) apresentaram valores percentuais de células B CD19⁺ circulantes significativamente maiores em relação ao grupo NI($p < 0,05$).

As médias das culturas PB (NI=7,6, INT=9,7%, HS=11,2%) foram significativamente menores em relação a PB-SEA(NI=9,1%, INT=14,8%; HS=15,4%).

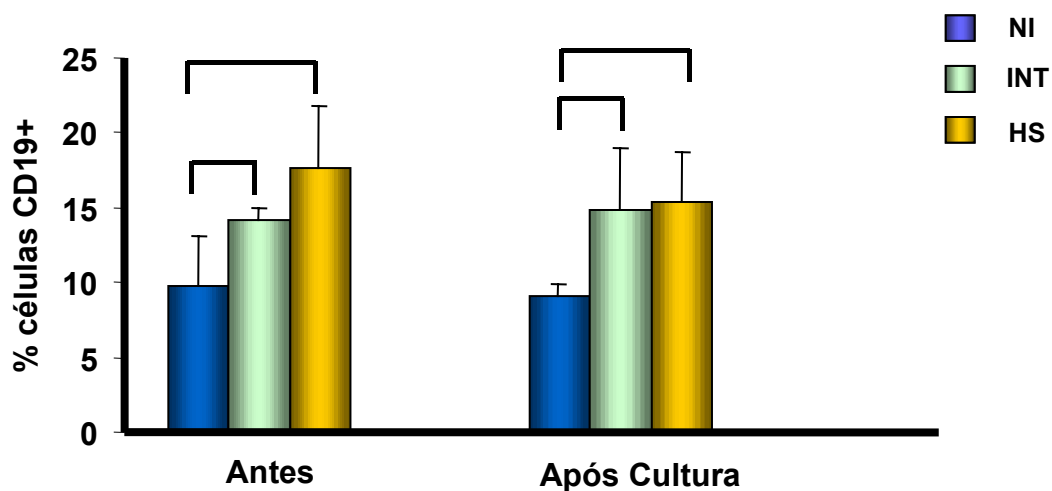


Figura 13 – Percentual médio de células B CD19⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 marcados com o fluorocromo FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. * $p < 0.05$ = Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos investigados estão indicadas por chaves pretas entre as barras.

N = (15, 21 e 12) para NI, INT e HS, respectivamente.

O Percentual de células B CD19⁺ expressando CD86⁺ diminui após cultura de granuloma *In vitro* no grupo INT

A análise do percentual da molécula B7-2 (CD86) na população de linfócitos B, em cultura com PBMC de indivíduos dos grupos NI, INT e HS antes e após cultura de granuloma *in vitro* está apresentada na Figura 14. Os resultados mostraram que apenas o grupo INT diferiu significativamente quando comparado antes (75,4%) e após cultura (62,3%) ($p < 0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas antes (NI=44,8%, HS=65,8%) e após cultura (NI=38,1%, HS=58,7%).

Enquanto na análise entre os grupos de pacientes, os resultados mostraram que os indivíduos INT e HS diferiram significativamente do grupo NI quando avaliados antes (INT=75,4%, HS=65,8%) e após cultura (INT=62,3%, HS=58,7%) ($p < 0,05$).

As médias das culturas PB (INT=41,2%, HS=45,8%) foram significativamente menores em relação a PB-SEA (INT=62,3%; HS=58,7%). O grupo NI não diferiu nas culturas PB (38,7%) em relação a PB-SEA (38,1%).

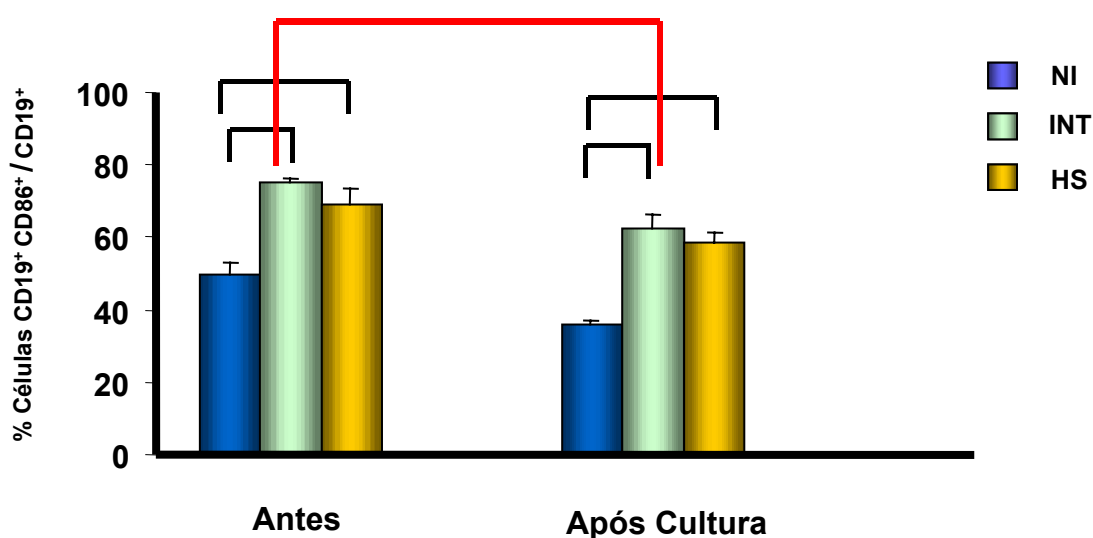


Figura 14– Percentual médio de células B CD19⁺ CD86⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. Ensaio de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células B CD19 que co-expressam o marcador CD86. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 e anti-CD86 marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. $p < 0.05$ =. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos investigados estão indicadas por chaves pretas entre as barras e por chave vermelha na análise (antes e após cultura).

N = 15, 21 e 12 para NI, INT e HS, respectivamente.

Não há alteração no percentual de células B CD19⁺CD80⁺ após cultura com PBMC no granuloma *In vitro*

A análise da Figura 15 mostra o percentual de linfócitos B CD19⁺CD80⁺ avaliados na população de linfócitos B CD19⁺ do sangue periférico de indivíduos dos grupos NI, INT e HS antes e após cultura de granuloma *in vitro*. A análise dos resultados não mostrou diferenças estatisticamente significativas nos grupos quando avaliados antes (NI=20,5%,INT=26,8% ; HS=20,2%;) e após a cultura (NI=24,5%, INT=25,4% ; HS=22,7%;) nas culturas estimuladas com SEA.

A análise entre os grupos mostrou que apenas o grupo INT diferiu do grupo NI quando avaliado no contexto *ex vivo*. Após cultura, não constatamos diferenças significativas entre os grupos.

As médias das culturas PB (NI=18,7%, INT=20,1%, HS=18,8%) foram significativamente menores do que nas culturas PB-SEA cultura (NI=24,5%, INT=25,4% ; HS=22,7%;).

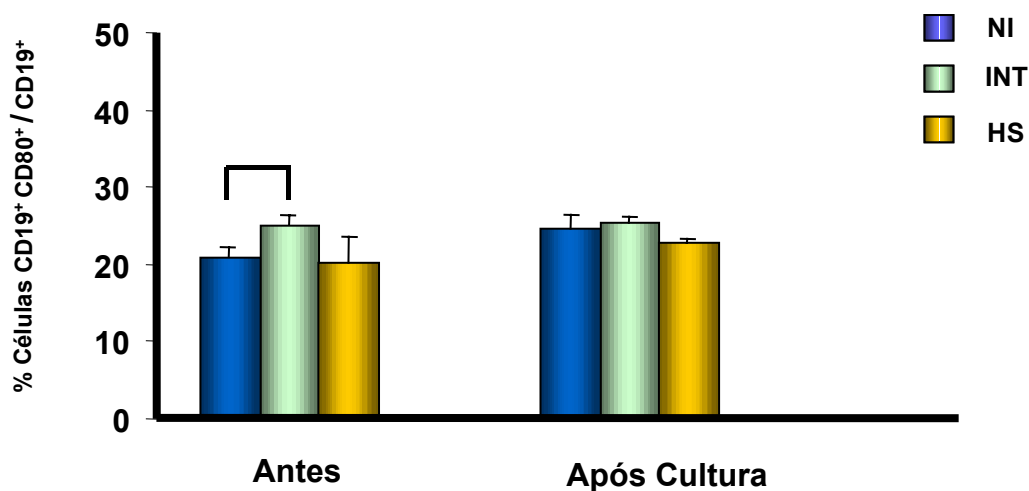


Figura 15– Percentual médio de células B CD19⁺ CD80⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. Ensaio de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células B CD19 que co-expressam o marcador CD80. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 e anti-CD80 marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. $p < 0.05$ =. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos investigados estão indicadas por chaves pretas entre as barras. N = 15, 21 e 12 para NI, INT e HS, respectivamente

Pacientes INT apresentam diminuição significativa do percentual de células CD14⁺ após cultura de granuloma *In vitro*

Os resultados apresentados na Figura 16 mostram o percentual da população de células CD14⁺ do sangue periférico de indivíduos dos grupos IN, HS e NI antes e após a cultura de granuloma *in vitro*.

A análise dos resultados mostrou que apenas o grupo INT diferiu significativamente quando avaliado antes (4,9%) e após cultura (3,9%) ($p < 0,05$). Por sua vez, os demais grupos não diferiram antes (NI=5,1%, HS=5,3%) e após a cultura (NI=4,8%, HS=5,2%).

Os resultados mostraram, ainda, na análise entre os grupos que os indivíduos INT (3,9%) diferiram significativamente do grupo NI (5,1%) apenas após cultura.

As médias nas culturas PB (NI=5,1%, INT=5,6%, HS=4,9%) foram significativamente menores que PB-SEA (NI=4,8%, INT=3,9%, HS=5,2%) apenas para o grupo INT.

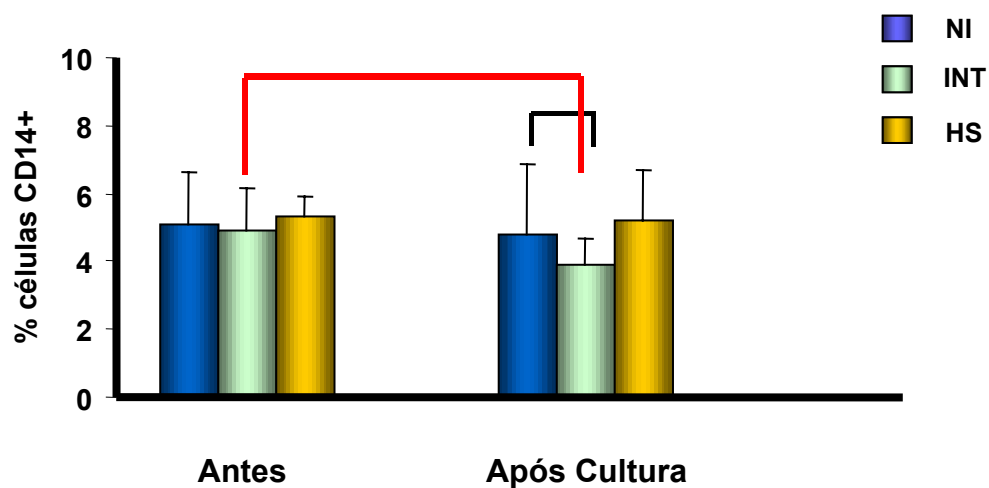


Figura 16 – Percentual médio de células CD14⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD14 marcados com o fluorocromo FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. $p < 0.05$ = Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos investigados estão indicadas por chaves pretas entre as barras e por chave vermelha entre antes X após cultura. N = 11, 16 e 09 para NI, INT e HS, respectivamente.

Pacientes INT apresentam diminuição significativa do percentual de células CD14⁺ expressando CD86 após cultura de granuloma *In vitro*

Os resultados apresentados na Figura 17 mostram o percentual de células B7-2 (CD86⁺) avaliados na população de células CD14⁺ do sangue periférico de indivíduos dos grupos NI, INT e HS antes e após cultura de granuloma *in vitro*.

A análise dos resultados mostrou que apenas o grupo INT diferiu significativamente quando avaliado antes (19,7%) e após cultura (15,2%) ($p < 0,05$). Por sua vez, os demais grupos não diferiram antes (NI=18,5%, HS=15,3%) e após a cultura (NI=19,1%, HS=13,2%).

Por outro lado, os resultados entre os grupos mostraram diferenças estatisticamente significativas nos grupos investigados INT e HS (INT=15,2%, HS=15,3%) quando comparado ao grupo NI (19,1%) após cultura ($p < 0,05$).

As médias das culturas PB (NI=12,3%, INT=11,2%, HS=10,8%) foram significativamente menores que as de PB-SEA (NI=19,1%, INT=15,2%, HS=13,2%).

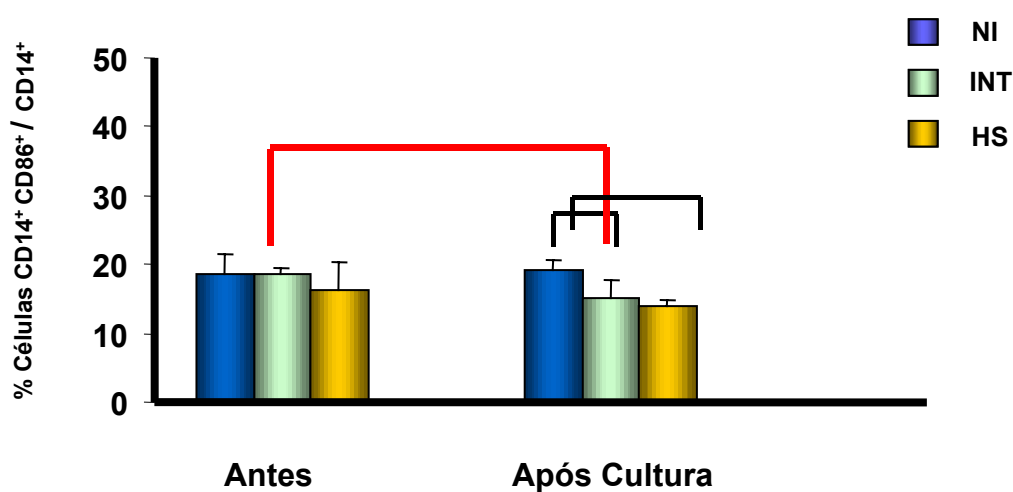


Figura 17– Percentual médio de células CD14⁺ CD86⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. Ensaio de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células CD14 que co-expressam o marcador CD86. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD14 e anti-CD86 marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. $p < 0.05$ =. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos investigados estão indicadas por chaves pretas entre as barras e por chave vermelha entre antes X após cultura. N = 11, 16 e 09 para NI, INT e HS, respectivamente

O Percentual de células CD14⁺CD80⁺ não é alterado após cultura de granuloma *In vitro*

Os resultados apresentados na Figura 18 mostram o percentual da molécula B7-1 (CD80) avaliados na população de células marcadas com anti-CD14 do sangue periférico de indivíduos dos grupos NI, INT e HS antes e após cultura de granuloma *in vitro*.

Não observamos diferenças estatisticamente significativas na análise dos grupos quando avaliados antes (NI= 16,3%,INT=17,6% ; HS=15,6%;) e após cultura (NI= 16,5%, INT=15,6% ; HS=14,9%;).

A análise entre os grupos de pacientes também não mostrou diferenças estatisticamente significativas antes e após cultura de granuloma *in vitro* tanto para PB-SEA.

As médias nas culturas PB (NI=12,3%, INT=11,2%, HS=10,8%) foram significativamente menores do que as de PB-SEA (NI= 16,5%, INT=15,6% ; HS=14,9%;).

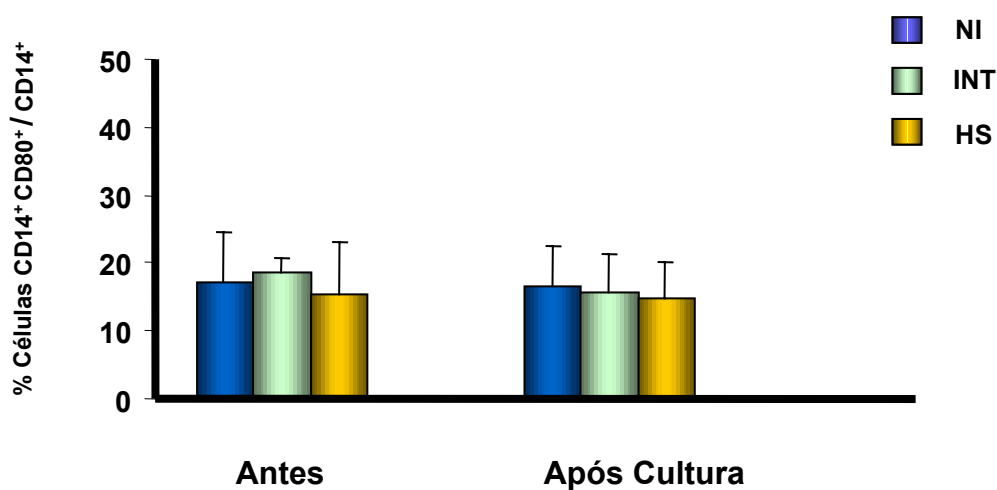


Figura 18 – Percentual médio de células CD14⁺ CD80⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI INT e HS. Ensaio de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células CD14⁺ que co-expressam o marcador CD80. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD14 e anti-CD80 marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. N = 11, 16 e 09 para NI, INT e HS, respectivamente

Não há alteração no percentual de Células CD14⁺CD54⁺ após cultura de granuloma *In vitro*

A análise da Figura 19 mostra o percentual de ICAM-1 (CD54) avaliados na população de células apresentadoras de antígenos CD14⁺ do sangue periférico de indivíduos dos grupos NI, INT e HS antes e após cultura de granuloma *in vitro*.

Os resultados não mostraram diferenças estatisticamente significativas nos grupos quando avaliados antes (NI=3,7%, INT=5,9%; HS=4,2%;) e após cultura (NI=3,9%,INT=4,9%; HS=3,4%;).

Por sua vez, a análise *ex vivo* entre os grupos mostrou diferenças estatisticamente significativas somente para o grupo INT (5,9%) que apresentou um percentual mais elevado dessas células comparado ao grupo NI (3,7%). Não foram observadas diferenças entre os grupos após cultura.

As médias de PB (NI=2,8%, INT=3,2%, HS=2,7%). Foram significativamente menores nos grupos INT e NI em relação a PB-SEA (NI=3,9%,INT=4,9%; HS=3,4%;).

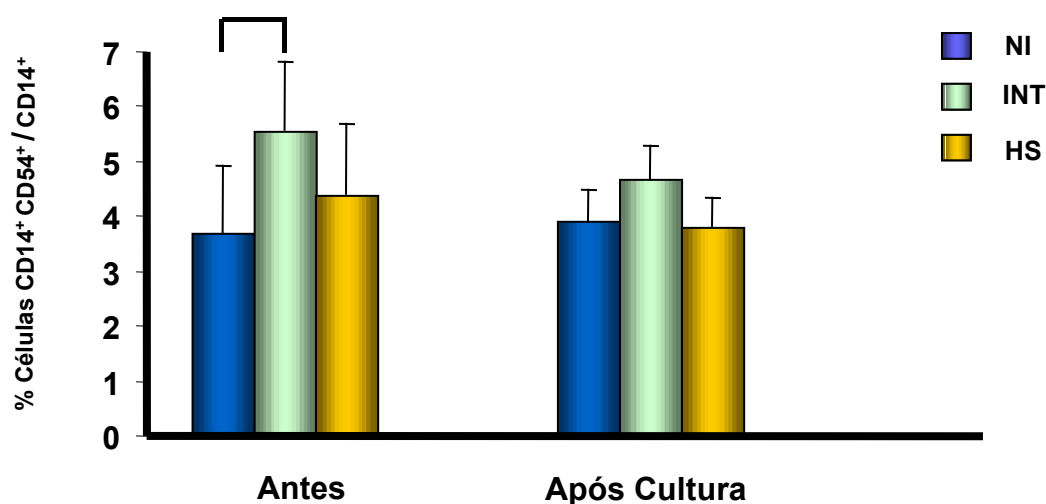


Figura 19 – Percentual médio de células CD14⁺ CD54⁺ obtido antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS. Ensaio de dupla marcação foram utilizados para avaliar o percentual de células CD14⁺ que co-expressam o marcador CD54. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD14 e anti-CD54 marcados com o fluorocromo FITC e PE respectivamente, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. $p < 0.05$ =. Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos investigados estão indicadas por chaves pretas entre as barras. N = 11, 16 e 09 para NI, INT e HS, respectivamente

Formação do granuloma *in vitro* na presença dos anticorpos anti-interleucina 10 (IL-10) e/ou IL-10 recombinante (rIL-10)

Inicialmente procuramos avaliar se o índice de granuloma era alterado pela adição de anticorpos anti-IL-10 ou IL-10 recombinante (rIL-10).

Os resultados apresentados na Figura 20 mostram a média do índice de granuloma *in vitro* (GI) obtido após cultura. Observou-se um aumento significativo no índice do granuloma formado com PBMCs de pacientes HS quando comparado ao grupo (NI). Na presença de anticorpos anti-IL10 houve um aumento significativo ($p < 0,05$) da média de índice de granuloma (GI) para o grupo INT em comparação à cultura, sem a adição dos anticorpos anti-IL10 e em relação ao grupo controle NI. Os demais grupos não apresentaram alterações significativas no GI, na presença de anticorpos anti-IL-10.

Os resultados apresentados na Figura 20 mostram, ainda, que a adição da IL-10 recombinante (rIL-10) foi capaz de reduzir, significativamente, a média de GI do grupos HS e INT quando comparados ao grupo NI ($p < 0,05$).

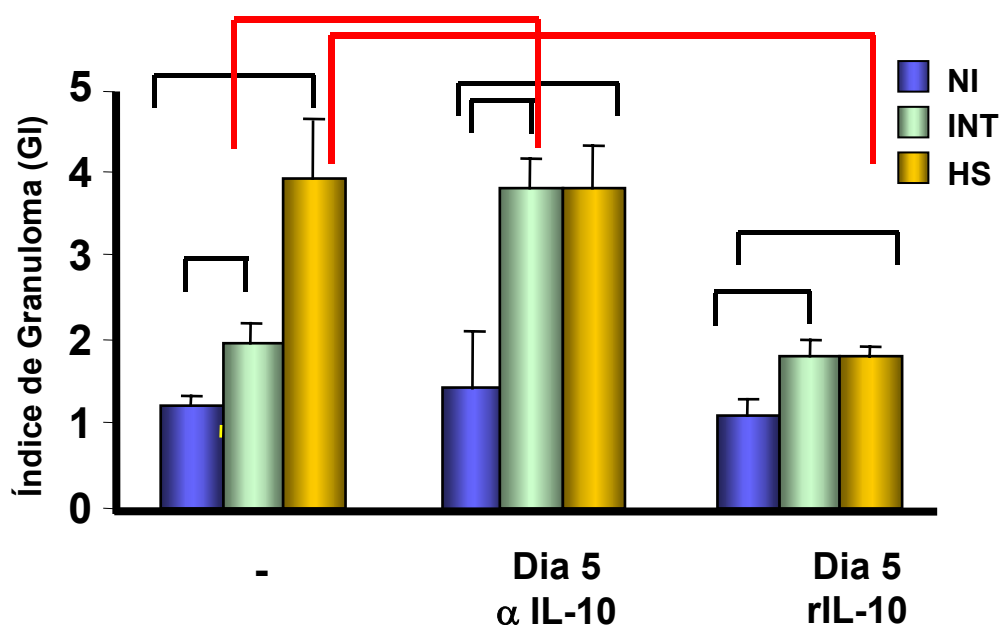


Figura 20 - Resultados apresentados: (E – C) Experimento (PB-SEA) – Controle (PB). Média dos índices de granuloma (IG) obtidos na avaliação da reatividade granulomatosa com PBMC de 26 pacientes na fase crônica intestinal (INT), 17 pacientes na fase crônica hepatoesplênica compensada (HS) e 19 indivíduos não infectados para *S. mansoni*, cultivadas na ausência ou presença de anticorpos anti-IL10 e rIL-10. Média do anticorpo não relacionado para pacientes do grupo intestinal ($2,61 \pm 0,35$); grupo hepatoesplênico ($3,91 \pm 0,31$) e grupo controle ($1,3 \pm 0,29$). As diferenças estatísticas na análise entre NI, INT e HS estão indicadas por chaves pretas entre barras e na análise entre PB-SEA, PB-SEA α IL-10 e PB-SEA r IL-10 por chave vermelha entre as barras. Valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$)

Afim de alcançar o nosso segundo objetivo, que foi avaliar a influência da IL 10 na expressão de alguns marcadores de superfície celular e de moléculas acessórias presentes nas subpopulações celulares formadoras do granuloma *in vitro*, a análise nos grupos NI, INT e HS foi realizada entre as culturas PB-SEA + anti-IL-10 X PB-SEA e PB-SEA + rIL-10 X PB-SEA, além da análise entre NI, INT e HS nas culturas PB-SEA + anti-IL-10 e PB-SEA + rIL-10.

Bloqueio da IL-10 aumenta o percentual de linfócitos CD3⁺ em cultura de granuloma *in vitro*

A análise dos resultados apresentada na Figura 21 mostra que nas culturas PB-SEA+ anti-IL-10 do grupo INT houve um aumento significativo no percentual de células CD3⁺ quando comparados aos controles PB-SEA. Nos demais grupos, as culturas PB-SEA + anti-IL-10 não diferiram significativamente do controle PB-SEA.

Por sua vez, todos os grupos investigados apresentaram percentuais de células CD3⁺ significativamente menores na presença da rIL-10 quando comparado às culturas PB-SEA na ausência da citocina recombinante.

A análise entre os grupos NI, INT e HS avaliou, primeiramente, o efeito da adição de anticorpos bloqueadores anti-IL-10. A análise dos dados mostrou uma diminuição significativa apenas no percentual de linfócitos T no grupo HS ($p < 0,05$). Enquanto a adição de rIL-10 foi capaz de diminuir significativamente o percentual dessas células em todos os grupos. Nenhum efeito dos anticorpos bloqueadores ou citocina recombinante foi observado nas culturas controle PB (Tabela 3).

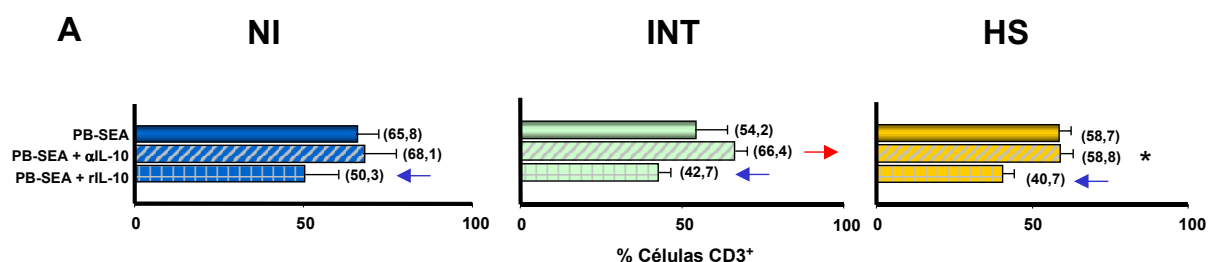


Figura 21 - Percentual médio de linfócitos T antes e após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS na ausência e presença de anticorpos anti-IL-10 e/ou rIL-10. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD3 marcados com o fluorocromo FITC, segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais \pm desvios padrão. As diferenças estatísticas na análise entre os grupos NI, INT e HS estão indicadas por um asterisco a frente da(s) barra(s) do(s) grupo(s) que apresentou(aram) diferença(s) estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle (NI) e INT e na análise entre PB-SEA, PB-SEA α IL-10 e PB-SEA rIL-10 (dentro do grupo) por seta a frente das barras que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

→ A seta vermelha indica aumento em relação ao controle PB-SEA em cada grupo clínico

← A seta azul indica diminuição em relação ao controle PB-SEA em cada grupo clínico.

O controle dos experimentos foi feito na presença de esferas de poliacrilamida não ligadas ao antígeno de SEA (PB), correspondendo às médias representados na tabela abaixo:

Controle	PB	PB + α IL-10	PB + rIL-10
NI	44,5 \pm 4,3	46,7 \pm 3,6	42,3 \pm 5,1
INT	41,5 \pm 3,7	43,8 \pm 5,6	39,8 \pm 4,2
HS	39,7 \pm 4,1	40,5 \pm 4,5	39,1 \pm 4,4

Tabela 3 - Análise de células CD3⁺ após cultura de granuloma *in vitro* (Controle PB) com PBMC de indivíduos NI, INT e HS.

Bloqueio da IL-10 aumenta o percentual de linfócitos CD4⁺ totais e co-expressando os marcadores HLA-DR, CD28, CD18 e CD62L nos indivíduos INT em cultura de granuloma *in vitro*

Considerando o aumento do percentual de linfócitos T CD3⁺ totais no grupo INT, nas culturas PB-SEA + anti-IL-10, foi de nosso interesse avaliar o efeito desses anticorpos no percentual da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ e nos percentuais dessas células que co-expressaram os marcadores HLA-DR, CD28, CD18 e CD62L nos grupos investigados, após o bloqueio da IL-10 em culturas estimuladas com SEA. Os resultados da Figura 22 estão separados por cada marcador (A=CD4⁺, B=CD4⁺HLA-DR⁺, C=CD4⁺CD28⁺, D=CD4⁺CD18 e E=CD4⁺CD62L⁺) avaliado nas células CD4⁺ de indivíduos dos grupos NI, INT e HS após cultura de granuloma *in vitro*.

A análise dos resultados após a adição de anticorpos anti-IL10 mostrou que somente o grupo INT apresentou aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) do percentual médio de linfócitos T CD4⁺ totais e co-expressando os marcadores investigados no estudo, quando comparados aos percentuais apresentados nas culturas PB-SEA (Figura 22). Após o bloqueio dessa citocina, não foram observadas alterações significativas nos grupos NI e HS, quando comparamos aos controles, sem a adição de anticorpos (PB-SEA).

Por outro lado, na presença da rIL-10, apenas o grupo HS apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) dos percentuais de células T CD4⁺ totais e co-expressando todos os marcadores avaliados, em relação aos controles, sem adição da citocina recombinante (Figuras 22 A, B, C, D, E). O grupo INT apresentou diminuição dos percentuais de células CD4⁺CD28⁺, CD4⁺CD62⁺ e diminuição da expressão do marcador CD18 em células CD4⁺, quando comparado às culturas PB-SEA, sem a adição de rIL-10. Enquanto, o grupo NI apresentou redução significativa dos percentuais do percentual de células T CD4⁺, CD4⁺CD28⁺ e do marcador CD18, quando comparamos à cultura PB-SEA, sem rIL-10.

A análise entre os grupos NI, INT e HS mostrou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) do percentual de células CD4⁺ no grupo HS, em relação aos grupos NI e INT na presença dos anticorpos anti-IL-10 (Figura 22A). Observamos,

ainda, que esse mesmo grupo apresentou percentual significativamente mais elevado ($p < 0,05$) de células $CD4^+ HLA-DR^+$ avaliadas na população de células $CD4^+$, tanto na presença, como na ausência da anti-IL-10, em relação aos grupos NI e INT (Figura 22B).

Já em relação à expressão do marcador CD18 em células $CD4^+$, apenas o grupo INT apresentou um aumento significativo ($p < 0,05$) em comparação aos grupos NI e HS (Figura 22D). Com relação às células $CD4^+CD62^+$ (Figura 22E), observou-se que na presença dos anticorpos anti-IL-10, os grupos INT e HS diferiram significativamente do grupo NI.

Quando analisamos os percentuais desse marcadores entre os grupos NI, INT e HS, nas culturas adicionadas com rIL-10, apenas o grupo INT apresentou diferenças estatisticamente significativas dos percentuais de células $CD4^+CD62^+$ e na expressão de CD18 em células $CD4^+$ ($p < 0,05$) em relação aos grupos NI e INT. Nenhum efeito dos anticorpos anti-IL-10 foi observado nas culturas PB.

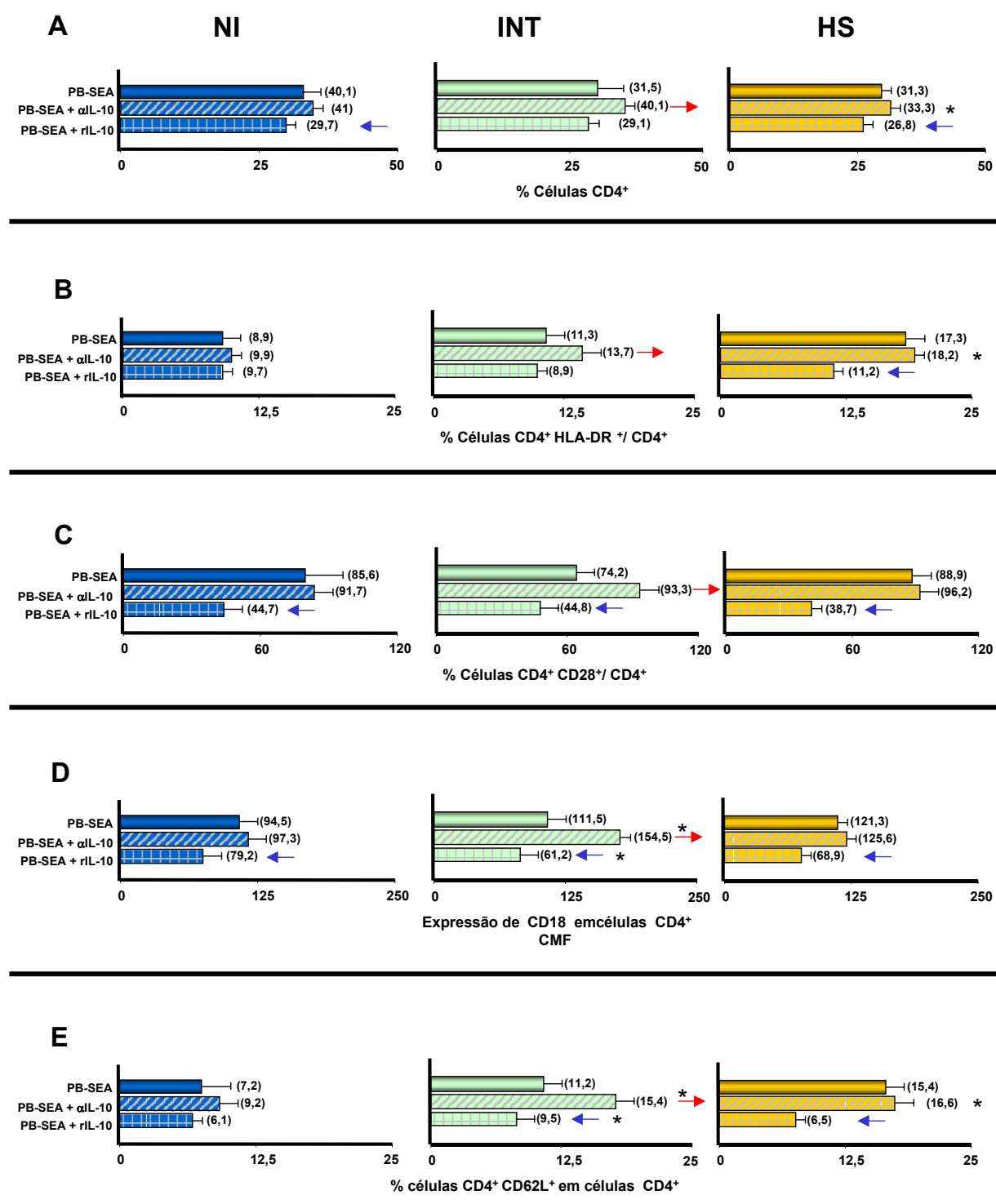


Figura 22 - Percentual médio de linfócitos T CD4+(A), CD4+ HLA-DR+(B), CD4+CD28+(C), CD4+CD18+(D) e CD4+CD62L+(E) obtidos após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS, na ausência e presença de anticorpos anti-IL-10 e/ou rIL-10. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD4 marcados com o fluorocromo FITC e anticorpos anti-HLA-DR, anti-CD28, anti-CD18 e anti-CD62L marcados com PE segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais ± desvios padrão. As diferenças

estatísticas na análise entre os grupos NI, INT e HS estão indicadas por um asterisco a frente da(s) barra(s) do(s) grupo(s) que apresentou(aram) diferença(s) estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle (NI) e na análise entre PB-SEA, PB-SEA α IL-10 e PB-SEA rIL-10 (dentro de cada grupo), por seta a frente das barras significativamente diferentes ($p < 0,05$).

→ A seta vermelha indica aumento em relação ao controle PB-SEA em cada grupo clínico.

← A seta azul indica diminuição em relação ao controle PB-SEA em cada grupo clínico.

O controle dos experimentos foi feito na presença de esferas de poliácridamida não ligadas ao antígeno de SEA (PB) representado na tabela abaixo:

Marcador	Controle	PB	PB + α IL-10	PB + rIL-10-10
CD4	NI	34,6 \pm 11,1	41,0 \pm 15,7	*29,7 \pm 11,1
	INT	31,5 \pm 9,9	35,1 \pm 18,5	29,1 \pm 15,8
	HS	31,3 \pm 16,3	33,1 \pm 14,8	*26,8 \pm 10,9
HLA-DR	NI	5,9 \pm 4,2	7,1 \pm 4,5	6,5 \pm 3,4
	INT	8,3 \pm 4,9	9,6 \pm 7,2	13,5 \pm 7,1
	HS	10,3 \pm 5,2	11,2 \pm 6,4	11,2 \pm 4,1
CD28	NI	66,1 \pm 25,1	73,2 \pm 44,1	* 54,7 \pm 6,7
	INT	64,5 \pm 25,1	61,8 \pm 16,2	*41,2 \pm 17,1
	HS	69,2 \pm 27,2	71,2 \pm 25,4	38,7 \pm 18,1
CD18	NI	79,1 \pm 45	83,2 \pm 42	*51,2 \pm 24
	INT	79,1 \pm 51	74,5 \pm 32	*58,1 \pm 21
	HS	83,7 \pm 47	87,1 \pm 34	*61,1 \pm 41
CD62	NI	5,6 \pm 4,5	5,9 \pm 4,9	4,3 \pm 4,2
	INT	6,8 \pm 2,9	9,6 \pm 3,1	8,1 \pm 4,9
	HS	7,8 \pm 3,9	8,6 \pm 5,7	7,1 \pm 4,1

* $P < 0,05$ – Diferenças significativas em relação ao controle PB.

Tabela 4 - Análise de linfócitos T CD4⁺, CD4⁺HLA-DR⁺, CD4⁺CD28⁺, (CMF) CD4⁺CD18⁺, CD4⁺CD62L⁺ após cultura de granuloma *in vitro* (Controle PB) com PBMC de indivíduos NI, INT e HS.

O bloqueio da IL-10 altera apenas o percentual de linfócitos de CD8⁺CD62L⁺ e do marcador CD18 em células CD8⁺ de indivíduos INT no granuloma *in vitro*”

A análise dos resultados apresentados na Figura 23 mostra o efeito da adição de anticorpos anti-IL-10 ou rIL-10 no percentual da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ e nos percentuais dessa subpopulação expressando os marcadores HLA-DR, CD28, CD18 e CD62L, nos grupos NI, INT e HS.

Esta análise mostrou que o bloqueio da IL-10 alterou o percentual de linfócitos de CD8⁺CD62L⁺ e do marcador CD18 em células CD8⁺ no grupo INT. Os grupos NI e HS não apresentaram diferenças significativas para nenhum dos marcadores investigados na presença da anti-IL10, quando comparado aos controles PB-SEA, sem anticorpos.

Na presença da rIL-10 o grupo HS apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) dos percentuais para todos os marcadores avaliados quando comparado à cultura sem adição da citocina recombinante. Já em relação ao grupo INT observamos que, com exceção dos percentuais de células CD8⁺CD62⁺ os demais marcadores co-expressos em células CD8⁺ apresentaram diminuição significativa ($p < 0,05$) dos percentuais. Por sua vez o grupo NI apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) do percentual de células CD8⁺ e CD18, na presença de rIL-10 em relação à cultura PB-SEA, sem adição de citocina recombinante.

A análise entre os grupos clínicos mostrou que na presença da anti-IL-10, o grupo HS apresentou diminuição do percentual de células T CD8⁺ em relação aos grupos NI e INT (Figura 23A). Os dados apresentados nas Figuras 23B e 23E mostraram que os indivíduos HS apresentaram elevação significativa ($p < 0,05$) de CD8⁺ HLA-DR⁺ e CD8⁺ CD62L⁺ em relação ao grupo NI, enquanto indivíduos do grupo INT apresentaram aumento do percentual de CD8⁺ CD62L⁺ e CD8⁺ CD28⁺ em relação aos indivíduos NI (Figuras 23E e 23C).

Quando comparamos os grupos clínicos adicionados com rIL-10 observamos que o grupo HS apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) dos percentuais para todos marcadores analisados, exceto para CD8⁺ HLA-DR⁺ (Figura 23B) em relação ao grupo NI.

Não foram observadas diferenças significativas nas culturas PB quando adicionadas ou não de anticorpos e/ou citocina recombinante.

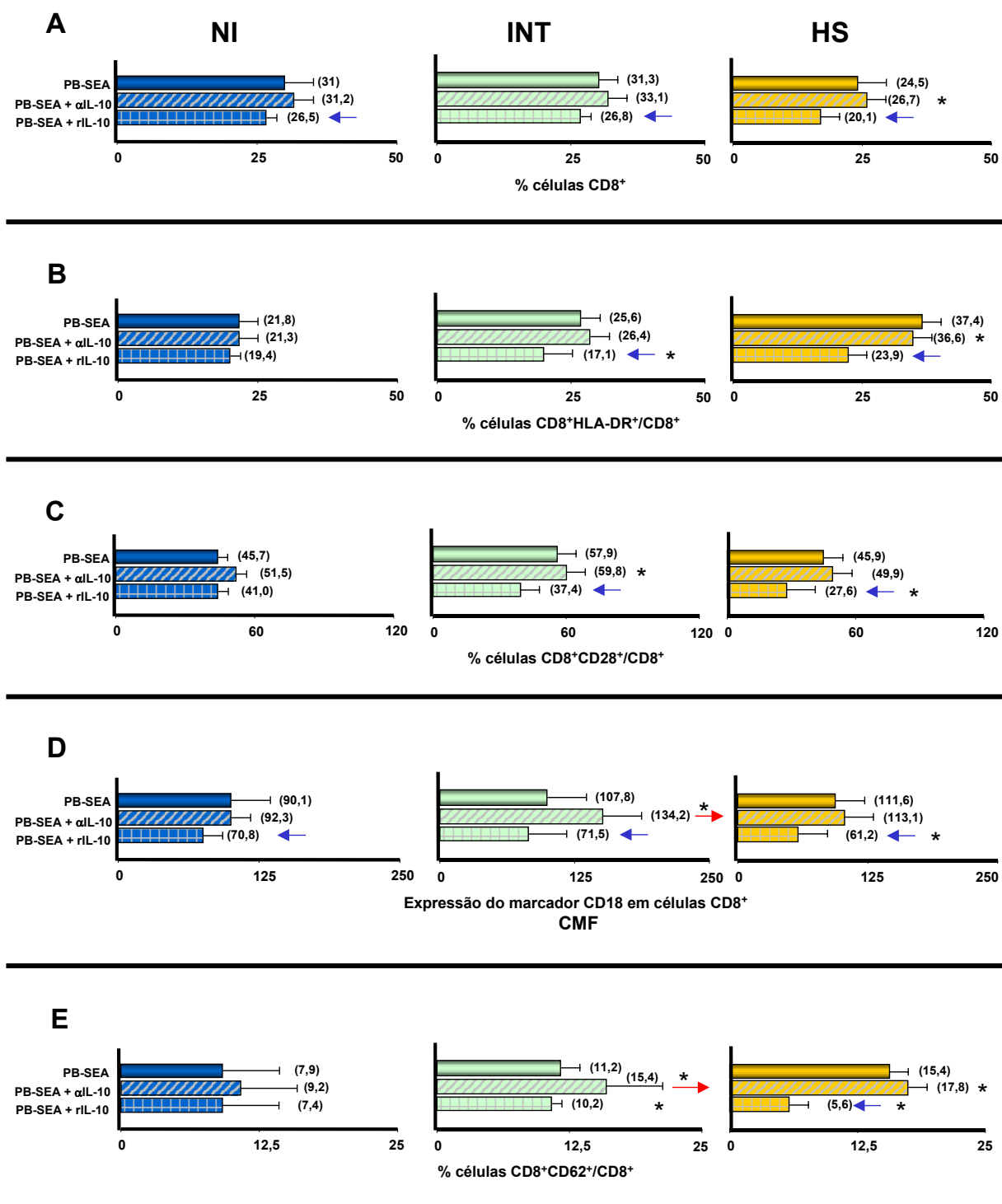


Figura 23 - Percentual médio de linfócitos T CD8⁺(A), CD8⁺ HLA-DR⁺(B), CD8⁺CD28⁺(C), CD8⁺CD18⁺(D) e CD8⁺CD62L⁺(E) obtidos após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS, na ausência e presença de anticorpos anti-IL-10 e/ou rIL-10. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD8 marcados com o fluorocromo FITC e anticorpos anti-HLA-DR, anti-CD28, anti-CD18 e anti-CD62L marcados com PE segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais ± desvios padrão. As diferenças estatísticas na análise entre os grupos NI, INT e HS estão indicadas por um *

asterisco a frente da(s) barra(s) do(s) grupo(s) que apresentou(aram) diferença(s) estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle (NI) e na análise entre PB-SEA, PB-SEA α IL-10 e PB-SEA rIL-10 (dentro de cada grupo), por seta a frente das barras significativamente diferentes ($p < 0,05$).

→ A seta vermelha indica aumento em relação ao controle PB-SEA em cada grupo clínico.

← A seta azul indica diminuição em relação ao controle PB-SEA em cada grupo clínico.

O controle dos experimentos foi feito na presença de esferas de poliacrilamida não ligadas ao antígeno de SEA (PB) representado na tabela abaixo:

Marcador	Controle	PB	PB + α IL-10	PB + rIL-10-10
CD8	NI	26,2 ± 4,6	27,8 ± 4,7	24,1 ± 4,1
	INT	28,1 ± 4,9	29,1 ± 5,7	23,1 ± 5,4
	HS	24,9 ± 6,1	24,5 ± 4,2	22,2 ± 6,9
HLA-DR	NI	19,2 ± 4,1	18,9 ± 3,9	19,6 ± 6,5
	INT	22,1 ± 5,9	22,6 ± 5,2	18,1 ± 7,1
	HS	30,6 ± 7,2	31,4 ± 4,4	26,9 ± 8,1
CD28	NI	42,1 ± 5,1	41,2 ± 4,9	39,8 ± 6,7
	INT	44,5 ± 5,1	47,8 ± 6,2	38,9 ± 7,1
	HS	30,6 ± 7,2	31,4 ± 4,4	26,9 ± 8,1
CD18	NI	71,1 ± 35	78,2 ± 49	71,2 ± 42
	INT	82,1 ± 51	84,5 ± 42	66,1 ± 51
	HS	89,7 ± 42	92,1 ± 44	70,1 ± 41
CD62	NI	5,6 ± 4,5	6,9 ± 4,9	5,1 ± 4,5
	INT	10,5 ± 5,3	11,6 ± 4,1	9,8 ± 4,9
	HS	11,7 ± 3,4	9,8 ± 5,7	6,8 ± 4,6

Tabela 5 - Análise de linfócitos T CD8⁺, CD8⁺HLA-DR⁺, CD8⁺CD28⁺, (CMF) CD8⁺CD18⁺, CD8⁺CD62L⁺ após cultura de granuloma *in vitro* (Controle PB) com PBMC de indivíduos NI, INT e HS.

O bloqueio da IL-10 em cultura foi capaz de alterar somente células B CD19⁺ CD86⁺ no granuloma *in vitro*

Os resultados dos percentuais de células apresentadoras de antígenos CD19⁺(A) e dos marcadores CD86(B) e CD80(C) co-expressos pelas células B CD19⁺, após o bloqueio ou adição de IL-10, estão representados na Figura 24.

A análise desses resultados mostrou que, na presença de anticorpos anti-IL10, houve uma alteração significativa ($p < 0,05$) apenas nos percentuais de células CD19⁺, no grupo NI, e de células CD19⁺CD86⁺, no grupo INT.

Quando analisamos o percentual das células CD19⁺, CD19⁺CD80⁺ e CD19⁺CD86⁺, adicionadas com rIL-10, observamos a diminuição significativa ($p < 0,05$) do percentual dessas células nos grupos de indivíduos infectados INT e HS em relação aos controles PB-SEA. O grupo NI apresentou alterações significativas somente de células CD19⁺CD80⁺ quando comparado ao controle PB-SEA.

A análise entre os grupos mostrou que o grupo INT apresentou alterações significativas ($p < 0,05$) nos percentuais de células CD19⁺ e B CD19⁺CD86⁺ em relação ao grupo NI, na presença dos anticorpos anti-IL10 (Figura 24B). O mesmo efeito foi verificado nos percentuais de células CD19⁺ no grupo HS em relação ao grupo NI. Os grupos INT e HS foram os que apresentaram diminuição significativa nos percentuais de células CD19⁺, CD19⁺CD86⁺ e CD19⁺CD80⁺ na presença da rIL-10. O percentual de células CD19⁺ e CD19⁺CD80⁺ nas culturas PB com rIL-10 diminuíram significativamente em relação ao controle.

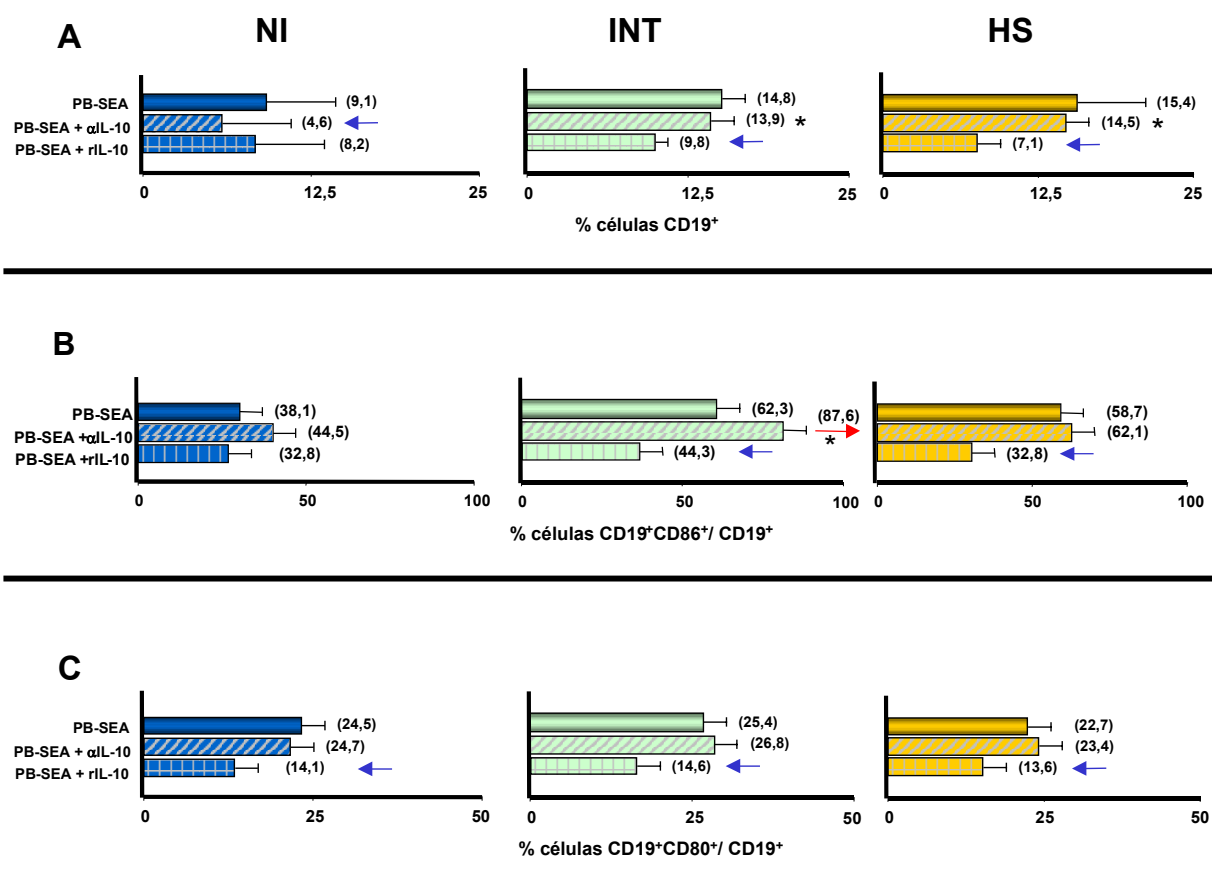


Figura 24 - Percentual médio de células B CD19⁺ (A), CD19⁺CD86⁺ (B) e CD19⁺CD80⁺ (C) obtidos após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS, na ausência e presença de anticorpos anti-IL-10 e/ou rIL-10. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 marcados com o fluorocromo FITC e anticorpos anti-CD86 e anti-CD80 marcados com PE segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais ± desvios padrão. As diferenças estatísticas na análise entre os grupos NI, INT e HS estão indicadas por asterisco a frente da(s) barra(s) do(s) grupo(s) que apresentou(aram) diferença(s) estatisticamente significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle (NI) e na análise entre PB-SEA, PB-SEA + αIL-10 e PB-SEA + rIL-10 (dentro de cada grupo), por seta a frente das barras significativamente diferentes ($p < 0,05$).

→ A seta vermelha indica aumento em relação ao controle PB-SEA em cada grupo clínico.

← A seta azul indica diminuição em relação ao controle PB-SEA em cada grupo clínico.

O controle dos experimentos foi feito na presença de esferas de poliacrilamida não ligadas ao antígeno de SEA (PB) representado na tabela abaixo:

Marcador	Controle	PB	PB + α IL-10	PB + rIL-10-10
CD19	NI	7,6 \pm 4,6	5,4 \pm 1,2	*3,1 \pm 1,6
	INT	9,7 \pm 4,7	11,2 \pm 4,4	*2,8 \pm 0,8
	HS	11,2 \pm 5,1	11,9 \pm 3,2	*3,9 \pm 0,9
CD80	NI	18,7 \pm 8,1	19,8 \pm 8,9	*12,8 \pm 3,5
	INT	20,1 \pm 4,7	21,4 \pm 6,1	*11,2 \pm 4,1
	HS	18,8 \pm 7,7	21,2 \pm 8,4	*13,6 \pm 5,2
CD86	NI	38,9 \pm 6,8	35,4 \pm 9,9	33,2 \pm 6,7
	INT	41,2 \pm 11,1	37,8 \pm 8,2	32,8 \pm 9,1
	HS	45,8 \pm 7,1	41,9 \pm 6,5	33,9 \pm 3,1

p<0.05 – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle PB.

Tabela 6 - Análise de células B CD19⁺, CD19⁺CD86⁺, CD19⁺CD80⁺ após cultura de granuloma *in vitro* (Controle PB) com PBMC de indivíduos NI, INT e HS.

O Bloqueio da IL-10 diminui significativamente o Percentual de células CD14⁺, mas não altera o percentual dos marcadores co-expressos nessa população celular em cultura PBMC no granuloma *in vitro*

Os resultados, apresentados na Figura 25, mostraram um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no percentual de células CD14⁺ nos grupos INT e NI, em culturas PB-SEA adicionadas com anticorpos anti-IL-10, quando comparados aos controles sem anticorpos. Observamos, ainda, que esse efeito não ocorreu na cultura com PBMCs de indivíduos HS. Em relação às células CD14⁺ CD86⁺, CD14⁺ CD80⁺ e CD14⁺ CD54⁺ a análise dos dados não nos revelou nenhuma alteração significativa no percentual dessas células na presença da anti-IL-10, nos três grupos investigados.

Entretanto, na presença de rIL-10, observamos que os grupos HS e NI apresentaram diminuição significativa no percentual de células CD14⁺, CD14⁺ CD80⁺ e CD14⁺ CD86⁺. Já no grupo INT esse efeito ocorreu em células CD14⁺ CD86⁺ CD14⁺ CD54⁺.

A análise entre os grupos de pacientes mostrou que somente o grupo HS diferiu dos demais, uma vez que apresentou percentuais de células CD14⁺ e CD14⁺ CD80⁺ significativamente menores ($p < 0,05$), na presença de anticorpos anti-IL10, em relação aos grupos NI e INT. Os grupos não diferiram em relação aos marcadores investigados na presença de rIL-10.

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, nas culturas PB.

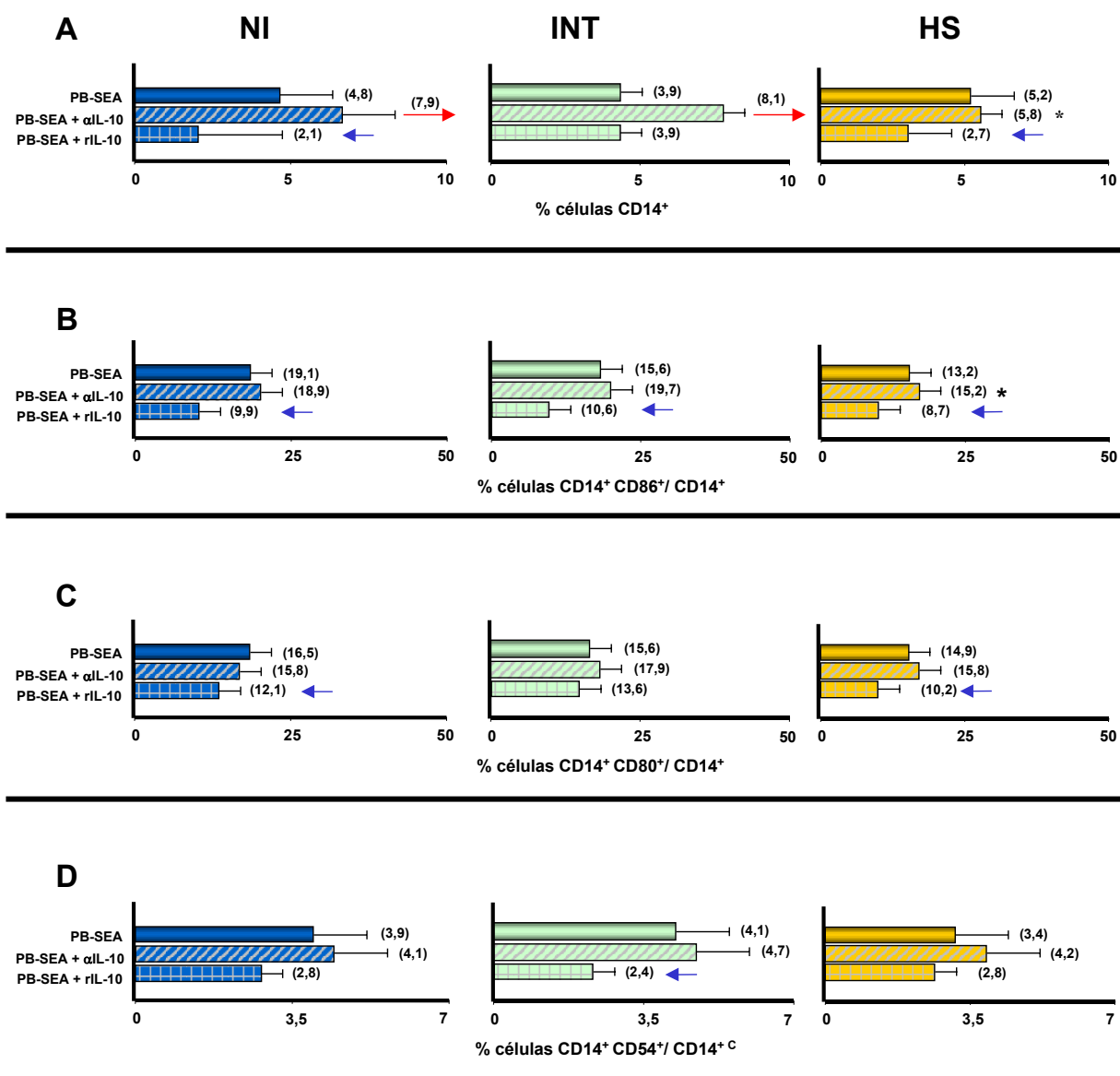


Figura 25 - Percentual médio de células CD14⁺ (A) , CD14⁺CD86⁺ (B), CD14⁺CD80⁺ (C) e CD14⁺CD54⁺ (D) obtidos após cultura de granuloma *in vitro* com PBMC de indivíduos NI, INT e HS, na ausência e presença de anticorpos anti-IL-10 e/ou rIL-10. As populações celulares foram identificadas utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CD19 marcados com o fluorocromo FITC e anticorpos anti-CD86, anti-CD80 e anti-CD54 marcados com PE segundo protocolo de imunofenotipagem descrito em M&M. Os resultados são expressos como média dos valores percentuais ± desvios padrão. . As diferenças estatísticas na análise entre os grupos NI, INT e HS estão indicadas por um asterisco a frente da(s) barra(s) do(s) grupo(s) que apresentou(aram) diferença(s) estatisticamente significativas (p<0,05) em relação ao controle (NI) INT e na análise entre PB-SEA , PB-SEA α IL-10 e PB-SEA rIL-10 (dentro de cada grupo), por seta a frente das barras significativamente diferentes (p<0,05).

→ A seta vermelha indica aumento em relação ao controle PB-SEA em cada grupo clínico.

← A seta azul indica diminuição em relação ao controle PB-SEA em cada grupo clínico.

O controle dos experimentos foi feito na presença de esferas de poliácridamida não ligadas ao antígeno de SEA (PB) representado na tabela abaixo:

Marcador	Controle	PB	PB + α IL-10	PB + rIL-10-10
CD14	NI	5,1 ± 2,1	3,8 ± 1,2	3,4 ± 1,8
	INT	5,6 ± 4,1	3,9 ± 3,1	4,1 ± 1,8
	HS	4,9 ± 2,9	3,3 ± 1,1	3,6 ± 1,9
CD80	NI	12,3 ± 6,1	13,4 ± 7,6	10,2 ± 3,5
	INT	11,2 ± 7,7	12,8 ± 6,9	11,7 ± 5,1
	HS	10,8 ± 7,4	11,6 ± 8,6	9,9 ± 5,6
CD86	NI	17,8 ± 6,8	16,7 ± 4,9	*10,2 ± 3,1
	INT	18,1 ± 9,1	19,6 ± 6,2	*11,3 ± 3,1
	HS	15,9 ± 5,2	15,1 ± 3,5	9,8 ± 3,1
CD54	NI	2,8 ± 1,8	2,1 ± 1,5	2,1 ± 1,2
	INT	3,2 ± 1,1	3,4 ± 2,2	2,3 ± 1,1
	HS	2,7 ± 1,3	2,9 ± 1,5	1,9 ± 0,7

p<0.05 – Diferença estatisticamente significativa em relação ao controle PB.

Tabela 7 - Análise de células CD14⁺, CD14⁺CD86⁺, CD14⁺CD80⁺ CD14⁺CD54⁺ após cultura de granuloma *in vitro* (Controle PB) com PBMC de indivíduos NI, INT e HS.

6 - DISCUSSÃO

A formação do granuloma em torno de ovos de *S. mansoni* é o evento central no desenvolvimento da patologia associada à infecção esquistossomótica aguda e crônica, embora já tenha sido evidenciado a participação de antígenos derivados de outros estádios do parasita tanto no desenvolvimento da patologia quanto na resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni* (ELLNER *et al.*, 1981 e BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 1992; JACOBS *et al.*, 1997).

Em animais experimentalmente infectados, durante o progresso da infecção da fase aguda para a crônica, tem-se demonstrado que há uma diminuição no tamanho dos granulomas recém formados em torno dos ovos, bem como modificações em seus componentes celulares (ANDRADE & WARREN, 1964). Este fenômeno foi demonstrado como sendo a expressão de uma reação dependente principalmente de linfócitos T e foi denominado modulação do granuloma. Essa diminuição no tamanho do granuloma parece ser benéfica para o hospedeiro e tem sido considerada fundamental para o equilíbrio hospedeiro-parasita (DOMINGOS & WARREN, 1968; BOROS *et al.* 1975).

Na esquistossomose mansoni humana, a alteração do tamanho e do aspecto do granuloma foram descritos durante a evolução da fase aguda para a crônica (RASO & NEVES, 1965; 1978). No entanto, a maioria dos estudos referentes à imunorregulação ou modulação da resposta imune em pacientes, envolve principalmente avaliações da reatividade de células do sangue periférico na presença de antígenos do parasita (COLLEY, 1981; NASH *et al.*, 1982; GAZZINELLI *et al.*, 1983). Através da utilização desse sistema, já se demonstrou o envolvimento de células T supressoras (COLLEY *et al.*, 1977), células mononucleares da linhagem macrófaga aderentes ao plástico (OTTESEN *et al.*, 1979; TODD *et al.*, 1979; ROCKLIN *et al.*, 1980) e componentes do soro (OTESSEN & POINDEXTER, 1980) na imunomodulação da resposta de pacientes portadores de esquistossomose crônica.

Através do modelo de formação do granuloma *in vitro* com esferas de poliacrilamida sensibilizadas com antígenos de ovo de *S. mansoni*, demonstrou-se a modulação da reação granulomatosa na fase crônica intestinal (DOUGHTY *et al.*, 1987). Aliás, esse modelo foi utilizado posteriormente com sucesso, para demonstrar o envolvimento de anticorpos idiotípicos, imunocomplexos,

prostaglandinas e mais recentemente o papel do óxido nítrico (NO) na regulação do granuloma *in vitro* (PARRA *et al.*, 1988, 1991; GOES *et al.*, 1991; GOES *et al.*, 1994; REZENDE *et al.*, 1993; OLIVEIRA *et al.*, 1999; NEVES *et al.*, 1999).

Outros estudos recentes, mostraram a viabilidade da utilização de esferas sensibilizadas com antígenos de *S. mansoni*, como excelente substrato para estudos imunohistoquímicos para detecção de fibrose em infecção experimental. JACOBS e colaboradores (1999) demonstraram a presença de colágeno do tipo I, IV e também de fibronectina, laminina e entactina em granulomas formados a partir de esferas de sefarose injetadas em camundongos não imunizados (normais).

Utilizando-se o modelo de formação de granuloma *in vitro* foram encontradas evidências sobre especificidade antigênica nas reações de formação e modulação do granuloma, mostrando que esferas de poliacrilamida sensibilizadas com antígenos de ovo de *S. mansoni* eram significativamente mais reativas do que esferas ligadas ao antígeno PPD (DOUGHTY *et al.*, 1987; PARRA *et al.*, 1991). Resultados anteriores obtidos em nosso Laboratório mostraram que a formação do granuloma *in vitro* permitiu a avaliação de fenômenos tais como a aderência, migração e transformação blástica de células mononucleares de sangue periférico (FALCÃO *et al.* 1998). Nesse estudo, demonstrou-se, claramente, perfis distintos de resposta granulomatosa para pacientes portadores das diferentes formas clínicas da esquistossomose. Os resultados sugeriram ainda a importância da IL-10 na fase crônica assintomática da doença, mostrando um aumento da reatividade granulomatosa quando essa citocina era bloqueada.

Considerando-se os estudos já descritos, que mostraram a viabilidade da utilização do modelo de granuloma *in vitro* para a investigação de vários mecanismos envolvidos na modulação da resposta imune e a aplicabilidade da citometria de fluxo para avaliação do fenótipo celular, o objetivo deste estudo foi analisar o perfil fenotípico de PBMCs de pacientes na fase crônica da esquistossomose, portadores das diferentes formas clínicas da infecção antes e após cultura de granuloma *in vitro*. Foram avaliados três grupos de indivíduos, o grupo de pacientes portadores da forma clínica intestinal (INT), que apresenta resposta celular modulada aos antígenos de ovo (SEA), o grupo de pacientes portadores da forma clínica hepatoesplênica (HS) que apresenta alta reatividade celular em ensaios de proliferação celular e elevada reação granulomatosa *in vitro*,

como já demonstrado na literatura (GAZZINELLI *et al.*, 1985; FALCÃO *et al.* 1998) e o grupo de indivíduos não infectados (NI).

A análise dos dados foi realizada comparando-se, numa primeira etapa, o perfil de PBMC avaliado no contexto *ex vivo* com aqueles obtidos após cultura *in vitro*, a fim de avaliarmos possíveis alterações nas populações celulares, na expressão de moléculas de co-estimulação e de adesão, induzidas pela formação do granuloma *in vitro*. Em seguida, foi feita uma análise da expressão desses marcadores celulares na população de PBMC em cultura, na presença de anticorpos anti-IL-10 ou de IL-10 recombinante, com objetivo de investigarmos o efeito do bloqueio da IL-10 ou da adição da rIL-10 exógena na formação e no fenótipo celular do granuloma *in vitro*.

Dessa forma, os dados apresentados nesta tese serão discutidos a seguir avaliando-se, primeiramente, as subpopulações de linfócitos T e os marcadores de co-estimulação e/ou adesão co-expressos por essas células, seguido da análise de células apresentadoras de antígenos CD19⁺ e CD14⁺ e os marcadores co-expressos nessas células.

A análise dos resultados apresentados na Figura 2 mostrou que após a formação do granuloma *in vitro* houve uma redução do percentual de linfócitos CD3⁺ no grupo INT, não tendo sido observadas alterações significativas nos indivíduos HS e NI. É interessante notar que após o bloqueio da IL-10 o percentual das células CD3⁺, no grupo INT, se elevou sugerindo um maior recrutamento dessa população celular para a formação do granuloma (Figura 2 e 21A). Não foram observadas alterações significativas nos percentuais dessa população de células nos grupos NI e HS, quando a IL-10 foi bloqueada.

É interessante mencionar que no contexto do granuloma *in vitro*, em que observou-se a influência da IL-10 nas alterações do percentual de células CD3⁺ na fase crônica intestinal, esse efeito não parece ocorrer isoladamente, uma vez que dados da literatura tem sugerido a interação entre a secreção de IL-10 e outros mecanismos envolvidos na modulação resposta imune, tais como quimiocinas e o óxido nítrico (NO) (BERKMAN *et al.*, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 1999). Essas observações já descritas na literatura foram muito bem reproduzidas através do modelo de granuloma *in vitro* (OLIVEIRA *et al.*, 1999; RESENDE *et al.*, 1999; NEVES *et al.*, 1999). Alguns estudos tem sugerido que a IL-10 poderia exercer seu efeito atuando em sinergia com outros mecanismos, possivelmente, modulando moléculas

envolvidas nas interações celulares no microambiente do granuloma e conseqüentemente levando à diminuição do mesmo. OLIVEIRA e colaboradores, (1999) sugeriram que a IL-10 e o NO parecem apresentar efeito sinérgico, baseado na observação de que a adição de L-NAME (L-N-Arginina metil ester), um inibidor da síntese de NO às culturas de granulomas era capaz de diminuir também a produção de IL-10 e aumentar a expressão de MPI-1 α , um potente fator quimiotático para células T ativadas. Vale salientar que, tanto os efeitos sobre a modulação da IL-10, pela adição de L-NAME, observados por OLIVEIRA e colaboradores (1999), como a diminuição do percentual de linfócitos CD3⁺ observado em nossos experimentos ocorreram, em sua maioria, nas culturas estimuladas com SEA, sugerindo um papel antígeno-específico dessa resposta. Esses estudos nos levam à hipótese de que a diminuição no percentual de células T totais no microambiente do granuloma *in vitro* observado em nossos experimentos poderia estar associado ao papel da IL-10 influenciando, possivelmente, a modulação de outros fatores envolvidos nas interações celulares que ocorrem na reação granulomatosa, tais como moléculas associadas ao TCR, MHC classe II e outras moléculas acessórias.

Nossas observações vão ao encontro de outros dados obtidos em nosso Laboratório, que mostraram que após a estimulação *in vitro* com SEA, há um aumento da apoptose de células CD3⁺ de pacientes INT (CARNEIRO-SANTOS, *et al*, 2000, no prelo) que poderia estar associado a diminuição dessa população após a formação do granuloma *in vitro*, induzida provavelmente pela IL-10. O estudo de CARNEIRO-SANTOS e colaboradores (2000, no prelo) mostrou, ainda, que células de pacientes INT cultivadas com SEA+rIL-10 apresentam um percentual significativamente maior de apoptose em relação aos outros grupos investigados. Esse tipo de análise é importante, uma vez aborda duas perguntas relacionadas à capacidade de produção de citocina e da célula em responder ao estímulo. Cabe ressaltar que em nosso estudo, a adição de rIL-10 às culturas estimuladas com SEA, foi capaz de reduzir significativamente os percentuais de linfócitos CD3⁺ em todos grupos investigados, mas essa observação foi mais evidente no grupo HS, sugerindo a viabilidade do receptor das células para essa citocina e que a ausência da IL-10 endógena poderia ser uma explicação possível para falta de modulação observada no grupo HS (Figura 22A).

Considerando-se que, após o bloqueio da IL-10, o percentual da população de linfócitos CD3⁺ elevou-se apenas no grupo INT, foi de nosso interesse investigar como essas alterações se manifestavam em subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Como mostrado na Figura 22A, observamos uma diminuição na subpopulação células CD4⁺ no grupo INT nas culturas de granuloma *in vitro* sugerindo que a diminuição desta população celular poderia ser responsável pela redução no percentual de linfócitos T CD3⁺ totais, uma vez que não foram observadas alterações significativas da população de células CD8⁺ (Figura 8) antes e após a formação do granuloma *in vitro*. CARNEIRO-SANTOS e colaboradores (2000, no prelo) mostraram que, exatamente, as células CD4⁺ apresentaram maior percentual de apoptose. É provável que a diminuição dos percentuais de células CD4⁺ esteja, dentre outros mecanismos, sob o controle da IL-10, uma vez que o bloqueio dessa citocina elevou o percentual dessas células em cultura (Figura 23). A IL-10, poderia estar modulando a expressão de alguns receptores específicos, levando à diminuição das interações celulares na reação granulomatosa, que poderia, inclusive, desencadear o processo de morte celular.

O estudo de MARTINS-FILHO e colaboradores (1997) mostra uma relação direta entre a ativação de linfócitos CD4⁺ e altos padrões de reatividade imunológica *in vitro* nas formas clínicas severas da esquistossomose mansoni. Esses autores mostraram que em PBMC de indivíduos HS compensados, há um aumento no percentual de células CD4⁺, consistente com os elevados níveis de reatividade celular *in vitro* já descritos para este grupo de pacientes (COLLEY *et al.*, 1986). Na fase crônica intestinal, esses mesmos autores observaram menor percentual de células CD4⁺ ativadas (HLA-DR⁺) no sangue periférico. Nossas observações, *ex vivo*, (Figura 4) foram similares às desse estudo. Nossos resultados mostraram que, após a formação do granuloma, a diminuição do percentual de CD4⁺ expressando HLA-DR foi muito mais evidente no grupo INT. O estabelecimento da fase crônica intestinal pode estar associada a uma redução no percentual de células CD4⁺ ativadas, que relaciona-se diretamente a uma elevação da produção de IL-10 produzida por PBMC estimuladas *in vitro* (Figura 22B). Os baixos níveis de IL-10 (MALAQUIAS *et al.*, 1997; FALCÃO *et al.*, 1998) observados em culturas de células de pacientes HS podem estar relacionados à manutenção do percentual de linfócitos T CD4⁺, que permanece inalterado, e a alta reatividade celular antígeno-específica

nos ensaios de reatividade celular *in vitro* (GAZZINELLI *et al.*, 1985). A análise conjunta desses resultados nos permite sugerir que uma elevação na produção de IL-10 durante a fase crônica intestinal poderia levar a uma modulação na ativação de linfócitos T CD4⁺, sendo um evento importante para a redução da patologia na esquistossomose mansoni.

No modelo de granuloma *in vitro*, nossos resultados mostraram que o bloqueio da IL-10 foi capaz de elevar não somente os percentuais de moléculas de ativação como HLA-DR expressa por células CD4, mas também outras moléculas de co-estimulação de células T, associados ao MHC classe II, como CD28, expresso por linfócitos T e outros tipos celulares (Figura 22C) e moléculas de adesão, também expressos por células T, envolvidos em interações celulares, tais como a L-selectina (CD62) (Figura 22E).

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a molécula CD28, além de exercer um papel na co-estimulação, como um segundo sinal para ativação de células T, evidenciado pela elevação do percentual de células CD4⁺CD28⁺/CD4⁺ nos grupos clínicos avaliados no contexto *ex vivo* (Figura 5), parece estar envolvida, ainda, na manutenção das interações celulares na reação granulomatosa *in vitro*. Os resultados obtidos com PBMCs de indivíduos INT reforçam essa hipótese, visto que neste grupo de pacientes onde observamos a menor média no índice de granuloma *in vitro*, há uma diminuição significativa da razão CD4⁺CD28⁺/CD4⁺ após cultura, quando comparado ao grupo NI e ao HS (Figura 5). Essa diminuição não parece ter ocorrido devido à diminuição do percentual de células CD4⁺ totais. Os dados mostraram que o percentual de células CD4⁺CD28⁺/CD4⁺ elevou-se nas culturas estimuladas com SEA após o bloqueio da IL-10 apenas no grupo INT (Figura 22C), assim como foi observado para a subpopulação CD4⁺ (Figura 22A), sugerindo que a IL-10 possa estar influenciando a modulação desse receptor expresso por células CD4 no grupo INT, esta alteração não ocorreu nos outros grupos de indivíduos estudados. É importante ressaltar que dados preliminares de nosso Laboratório tem demonstrado um padrão inverso de expressão do gene para IL-10 e CD28 avaliado através de RT-PCR, mostrando que nos indivíduos que expressaram o gene para IL-10, a banda detectada para CD28 foi menos intensa que a de IL-10. Em contrapartida, nos indivíduos HS portadores da forma severa da infecção a banda detectada para CD28 foi bem mais intensa do que a de IL10. Outros estudos em

nosso laboratório tem sugerido, cada vez mais fortemente, um papel modulador importante para IL-10 na resposta inflamatória. Outros experimentos preliminares de nosso Laboratório tem demonstrado que animais IL-10 $-/-$ na fase crônica da infecção apresentam percentuais elevados de células obtidas de baço e linfonodo $CD4^+ CD28^+$, quando comparado ao percentual dessa população celular nos animais controle (camundongos C 57 B/6). A comparação dos percentuais de células $CD4^+ CD28^+$ na população $CD4^+$ de camundongos IL-10 $-/-$ na fase crônica (20 semanas de infecção) com o percentual dessas células em animais IL-10 $-/-$, na fase aguda (10 semanas) mostrou que os animais na fase crônica apresentavam percentuais significativamente maiores dessa população celular. Em contraste, quando utilizamos células de camundongos IFN- γ $-/-$, observamos o oposto, ou seja, os animais na fase crônica, apresentam percentuais mais reduzidos de células $CD4^+ CD28^+/CD4^+$ quando comparado aos animais controles do tipo selvagem (WT 129) e aos animais IFN- γ $-/-$, na fase aguda da infecção. Esses dados vão ao encontro de nossas observações obtidas com PBMC de pacientes. Vale salientar que num sistema, sem a interferência da citocina de interesse foram reproduzidas observações concordantes com os dados obtidos de pacientes INT.

A resposta de células T aos antígenos e as atividades efetoras de leucócitos requerem moléculas de superfície para mediar as interações célula-célula e célula-matriz, bem como fornecer sinais co-estimuladores adicionais. Nossos resultados não mostraram diferenças na expressão do marcador CD18 (LFA-1) (Figura 6) por células $CD4^+$ antes e após a formação do granuloma em nenhum dos grupos investigados. É interessante notar que após a formação do granuloma, nas culturas estimuladas com SEA, o grupo HS apresentou maior expressão de CD18 em células $CD4^+$, quando comparado aos grupos NI e INT, e essa expressão não foi alterada pela adição de anticorpos anti-IL-10, em contraste com o observado para o grupo INT (Figura 22D).

A interação de LFA-1/ICAM-1 (ligante de LFA-1) parece ser importante na formação e manutenção granuloma, uma vez que essa molécula é expressa em níveis elevados durante a forma grave da infecção. Isto poderia ser um dos mecanismos para explicar a ocorrência de uma intensa inflamação em pacientes HS. Vale ressaltar ainda que, na falta do gene de ICAM-1 parece ocorrer a compensação por outras moléculas ligantes, como no caso de VCAM-1 e a formação do granuloma

poderia ser preservada (RITTER & MCKERROW , 1996). Como mencionamos anteriormente, o bloqueio da IL-10 não foi capaz de alterar a expressão de células CD18⁺ no grupo HS. É possível que outras citocinas possam estar modulando o efeito da IL-10 nessa forma clínica da infecção. Nesse sentido, vale mencionar que na esquistossomose experimental, a adição de anticorpos monoclonais anti-LFA-1, anti-ICAM-1 e anti-VLA-4 é capaz de reduzir, de forma contundente, a resposta de linfoproliferação na fase aguda e crônica (LANGLEY & BOROS , 1995), bem como modular o tamanho do granuloma e a produção de IL-2 e IL-4, (LUKACS & BOROS, 1993; WYNN *et al.*, 1993; RATHORE *et al.*, 1996), que como se sabe, são citocinas cruciais na formação e manutenção da reação granulomatosa na fase crônica hepatoesplênica (FALCÃO *et al.*, 1998). Essas observações em conjunto aos dados apresentados nesta tese nos permitem inferir sobre a existência de uma associação direta entre alta expressão de moléculas de adesão na fase crônica hepatoesplênica e a produção de citocinas envolvidas na formação e manutenção da resposta granulomatosa, como a IL-4 (FALCÃO, tese de mestrado, 1994).

Outros estudos, no homem, têm demonstrado a importância desses receptores de adesão na indução de outras doenças, como vasculite, uma injúria grave do tecido que, nos casos graves pode levar à gangrena. LOCKWOOD e colaboradores (1999) mostraram que pacientes portadores da forma severa da doença, tratados com anticorpos monoclonais anti-CD18, apresentaram rápida melhora clínica. Esses achados e os nossos resultados reforçam a hipótese de que esses receptores tem papel importante no desenvolvimento de formas mais graves de doenças. Na esquistossomose, provavelmente a não modulação desses receptores pode ser correlacionada à alta reatividade celular observada no grupo de pacientes HS (COLLEY *et al.*, 1986). No entanto, os mecanismos que induzem a migração de células, que expressam receptores específicos para o sítio de inflamação, nas doenças graves, são os mesmos. Vários estudos mostram que tanto as células T presentes no granuloma esquistossomótico , como as derivadas de granuloma induzido por *Mycobacterium avium* expressam moléculas de adesão tais como LFA-1, ICAM-1, L-selectina^{low} , CD44^{high} e VLA-4 (SANDOR *et al.* 1995; SACCO *et al.*, 1996). Dessa maneira, tanto a resposta imune do tipo 1 induzida pelo *M. avium*, quanto a do tipo 2 induzida por *S. mansoni* podem apresentar o mesmo fenótipo de moléculas de adesão.

As selectinas são glicoproteínas dependentes de Ca^{2+} , sabe-se que estão envolvidas na migração de linfócitos, mediando eventos de adesão (JOHNSTON *et al.*, 1989; BUHRER *et al.* 1990; SPRINGER *et al.* 1990). As mesmas observações foram feitas, quando avaliamos o percentual de células $\text{CD4}^+ \text{CD62L}^+$ de indivíduos HS. Na análise antes e após a formação do granuloma, o grupo HS apresentou percentuais mais elevados de L-selectina, quando comparados aos dos outros grupos investigados (Figura 7). Assim como ocorreu com a expressão de CD18 por células CD4^+ analisada pelo canal médio de fluorescência, o percentual de células $\text{CD4}^+ \text{CD62}^+ / \text{CD4}^+$ também não foi alterado pela adição de anticorpos anti-IL-10 neste grupo de pacientes (Figura 22E). Em contrapartida, o percentual de células $\text{CD4}^+ \text{CD62}^+ / \text{CD4}^+$ no grupo INT foi significativamente elevado após o bloqueio da IL-10. A análise após cultura mostrou que esse percentual foi significativamente reduzido em relação ao contexto *ex vivo* (Figura 12 e 22E). Os dados obtidos neste estudo contrastam com os de LEJOLY-BOISSEAU e colaboradores (1996) que demonstraram que pacientes portadores da forma clínica intestinal da esquistossomose apresentam elevados níveis séricos de L-selectina, quando comparados a pacientes portadores da forma severa da doença. Por outro lado, nossos resultados sugerem que a elevação do percentual de células CD4^+ , que co-expressam L-selectina no granuloma, observada no grupo HS, poderia estar relacionada a uma intensa resposta inflamatória e a alta reatividade celular nesta forma clínica e, conseqüentemente, estaria associada à gravidade da esquistossomose, como ocorre em outras doenças em que associou-se níveis elevados de ICAM-1 à severidade da cirrose biliar (THOMSON *et al.*, 1993).

A hipótese de que essa intensa resposta inflamatória esteja associada à ausência de IL10 poderia ser explicada, provavelmente, considerando-se o fato de que a IL-10 é produzida por vários tipos celulares tais como células T, B, macrófagos. A IL-10 produzida por qualquer um dos tipos celulares poderia exercer seu efeito regulando a produção dessa citocina por outras células ou mesmo por mecanismos de auto-regulação. Na esquistossomose experimental, o ligante para a molécula selectina, o LewisX (CD15) (trissacáride contido no oligossacáride lacto-N-fucopentose-LNFP-III) é capaz de induzir células B esplênicas de camundongos infectados pelo *S. mansoni* a produzir IL-10 e prostaglandinas (PGE_2) e desse modo, modular células T a produzir essa e outras citocinas do tipo 1 (VELUPILLAI & HARN

1994). Pode ser que na forma grave da esquistossomose mansoni humana possa estar ocorrendo também a modulação da atividade de uma população produtora de IL-10 por outras populações celulares ou a IL-10 esteja sendo produzida em quantidades insuficientes que não influenciariam a modulação de moléculas envolvidas nas interações celulares levando ao aumento da reação inflamatória. Vale lembrar que na forma HS da esquistossomose, as PBMCs de pacientes portadores desta forma clínica são produtoras de níveis elevados de IL-4, que também é capaz de modular os efeitos da IL-10 (FALCÃO, tese de mestrado, 1994), assim como outras fontes não T e não B foram implicadas (mastócitos e basófilos) como produtoras de IL-4 (WILLIAN *et al.*, 1993; SABIN & PEARCE, 1995; MOSMANN & SAD, 1996).

É importante notar que a análise da subpopulação de linfócitos T CD8⁺, nos grupos investigados em nosso estudo, corroborou com as evidências já descritas na literatura que mostram que pacientes HS apresentam diminuição do percentual dessas células quando as PBMC foram avaliadas *ex vivo* (MARTINS-FILHO *et al.*, 1997). De fato, nossos resultados mostraram que essa diminuição foi mantida mesmo após a formação do granuloma (Figura 9). O bloqueio da IL-10 nas culturas não foi capaz de alterar o percentual de células CD8⁺ em nenhum dos grupos investigados (Figura 23A). Embora os estudos de CARNEIRO-SANTOS (2000, no prelo) tenham mostrado que células CD8⁺ de pacientes INT apresentam percentuais significativos de apoptose induzida pelo SEA, os dados obtidos neste estudo não reforçam a hipótese de que a IL-10 seja o mecanismo específico responsável por esse evento, que como sugerido pela autora poderia ser dependente diretamente da interação célula/antígenos de ovos do parasita.

Dados da literatura mostram que a ativação de linfócitos T CD8⁺ durante a infecção pelo *S. mansoni* pode ser considerada como um mecanismo de ativação colateral que se desenvolve com a evolução da doença para a fase crônica. MARTINS-FILHO e colaboradores (1999) mostraram que o estabelecimento da fase crônica está associada a uma elevação no percentual de células T CD8⁺ ativadas, independente da forma clínica apresentada pelo paciente. No entanto, nossos resultados obtidos com PBMC de pacientes, após cultura, mostraram que a elevação significativa dessa população ativada estava restrita apenas à forma HS (Figura 23B). Essa observação é concordante com os achados de MARTINS-FILHO e

colaboradores (1999) que mostraram que em outros compartimentos, como o baço, existe uma elevação de células $CD8^+HLA-DR^+$. DIETRICH e colaboradores (1991) sugeriram que os mecanismos de ativação celular podem estar relacionados a persistência da estimulação antigênica e que citocinas inflamatórias secretadas por vários tipos celulares podem estimular a expressão de moléculas de MHC de classe II em subpopulações $CD4^+$ e $CD8^+$. É interessante notar que a IL-10 parece não exercer nenhum efeito sobre a ativação de populações $CD8^+$ na fase crônica (Figura 23B), uma vez que o bloqueio dessa citocina não alterou o percentual dessa população em nenhum dos grupos investigados. No caso específico da forma clínica HS, existe a hipótese de que citocinas pró-inflamatórias poderiam estar contribuindo para manutenção dessa ativação, como por exemplo, $TNF-\alpha$, que, como se sabe, estimula os produtos do MHC de classe II.

Estudos de MARTINS-FILHO e colaboradores (1999) tem mostrado que existe uma relação direta entre a redução no percentual de linfócitos T $CD8^+CD28^+$ e o desenvolvimento da forma grave da esquistossomose. Isso pôde ser evidenciado quando analisamos o percentual de células T $CD8^+CD28^+$ na população de células $CD8^+$ de indivíduos INT e HS. De fato, obtivemos resultados similares aos já descritos na literatura, onde há uma diminuição nos percentuais dessas células no grupo HS antes e após cultura, quando comparado ao grupo INT (Figura 10). Todavia, esse percentual não diferiu do observado para o grupo NI. O bloqueio da IL-10 nas culturas PB-SEA (Figura 23C) não alterou o percentual $CD8^+CD28^+$ no grupo HS. MARTINS-FILHO e colaboradores (1999) sugeriram que a perda de CD28 por linfócitos T $CD8^+$ pode ser um fator central para explicar a deficiência em mecanismos moduladores da resposta imune em pacientes HS. Os resultados de MARTINS-FILHO e colaboradores (1999) e os dados apresentados nesta tese nos permitem sugerir que a molécula CD28 poderia ser modulada por mecanismos distintos em subpopulações $CD4^+$ e $CD8^+$, uma vez que nossos resultados mostraram que o percentual de células $CD4^+CD28^+$ na população $CD4^+$ de pacientes INT elevou-se quando a IL-10 foi bloqueada, enquanto o mesmo não ocorreu com células de pacientes HS. Essa observação nos permite inferir, ainda, que a indução de mecanismos de modulação distintos da molécula CD28 poderiam estar diretamente relacionados ao desenvolvimento das formas clínicas distintas na esquistossomose.

A análise *ex vivo* de moléculas de adesão expressas por células CD8⁺ apresentadas nesse estudo mostrou que somente o grupo HS apresentou maior expressão de CD18. Após a formação do granuloma, observamos (Figura 11) que além dos indivíduos HS, o grupo INT também apresentou um aumento da expressão desse marcador, em relação ao controle NI. No entanto, a análise dos resultados mostrou que a adição de anti-IL-10 foi capaz de alterar, de forma contundente, a expressão de CD18 apenas no grupo INT (Figura 23D). A rIL-10 nas culturas PB-SEA reduziu significativamente a expressão de CD18 por células CD8⁺ nos grupos HS e INT sugerindo a viabilidade do receptor dessas células e a capacidade em responder ao estímulo. É importante ressaltar que a expressão de CD18 por células CD4⁺ foi significativamente mais elevada do que por CD8⁺ quando IL-10 foi bloqueada reforçando a hipótese de que a perda desse receptor na fase crônica pode ser dependente de mecanismos distintos nas duas subpopulações.

Observações semelhantes foram obtidas em relação à análise dos percentuais de células CD8⁺ co-expressando L-selectina (CD62) no grupo HS. A análise antes e após cultura mostrou que este grupo apresentou percentuais significativamente mais elevados de células CD8⁺ CD62⁺, quando comparado ao grupo NI (Figura 13), que não foram alterados pelo bloqueio da IL-10. É importante salientar que o aumento do percentual de células CD8⁺CD62⁺ no grupo HS, é coerente com dados obtidos em modelo experimental, que mostraram, através de análise fenotípica, que camundongos com síndrome de hiperesplenomegalia devido à infecção pelo *S. mansoni* expressavam muito mais L-selectina (CD62L) que os animais com infecção moderada (FREEMAN *et al.* 1996).

No que diz respeito à análise de L-selectina por células CD8 no grupo INT, os dados mostraram um aumento significativo do percentual de células CD8⁺CD62⁺/CD8⁺ após o bloqueio da IL-10 no grupo INT (Figura 23E). Esses achados sugerem que a IL-10 parece exercer seu efeito sobre algumas moléculas específicas expressas por células CD8 no grupo INT, uma vez que o bloqueio da citocina não alterou o percentual de células co-expressando todos os marcadores neste grupo.

Considerando-se a importância das células B no processamento e apresentação de antígenos para células T no granuloma e que a reação granulomatosa *in vitro* é antígeno-específica, foi de nosso interesse avaliar se

ocorreriam alterações no percentual dessas células no granuloma *in vitro*. As células CD19⁺ totais que co-expressam receptores ligantes que participam do processo de interação celular foram analisados antes e após cultura. Trabalhos anteriores mostram claramente, que células CD19⁺ no sangue periférico de pacientes portadores das formas clínicas crônicas da esquistossomose apresentam uma elevação gradual desta população celular associada a gravidade da doença (MARTINS-FILHO *et al.*, 1997). Os dados obtidos neste estudo também mostraram que indivíduos na fase crônica apresentaram percentuais mais elevados de células B CD19⁺, quando comparados ao grupo NI, na análise *ex vivo*. Esses resultados refletem a elevação gradual dessas células observada por esses autores (Figura 13). Após a formação do granuloma, não foram observadas diferenças entre os dois grupos de pacientes infectados. O bloqueio da IL-10 não alterou o percentual dessa população de células nos grupos clínicos (Figura 24A) sugerindo que a presença de células B no microambiente do granuloma poderia estar diretamente relacionada ao desenvolvimento e manutenção da patologia esquistossomótica, provavelmente, devido a estimulação por glicoproteínas de antígenos derivados do ovo, como LNFP-III e outros açúcares relacionados que são capazes de induzir a proliferação de células B, como ocorre na esquistossomose experimental (VELUPILLAI & HARN (1994). É importante mencionar que, embora o granuloma esquistossomótico esteja relacionado a uma reação de hipersensibilidade mediada principalmente por linfócitos T, não se exclui a existência de mecanismos paralelos que determinariam a ativação de células B. Desse modo, a resposta imune granulomatosa poderia ser melhor compreendida como o somatório dos eventos celulares e humorais.

A análise do percentual de células B CD80⁺ (B7-1) na população de células B totais não mostrou alterações importantes em seu percentual, tanto antes como após a cultura de granuloma entre os grupos analisados (Figura 24C). Vale ressaltar que, embora a IL-10 não tenha sido capaz de alterar o percentual de células CD19⁺ CD80⁺ (Figura 24C) e de células CD14⁺ CD80⁺ (Figura 25A), utilizando o modelo de granuloma *in vitro*, VELUPILLAI e colaboradores (1994) sugeriram o contrário, mostrando que a IL-10 produzida por células B de camundongo era capaz de modular moléculas do MHC classe II, B7-1 e B7-2 expresso por macrófagos. Esses dados são concordantes com a hipótese de que a população de células B, provavelmente, não é auto-regulada e a IL-10 produzida por

outros tipos celulares não é capaz de regular a população de células B. O resultado da adição de rIL-10 às culturas de granuloma de pacientes HS e INT reforçam essa hipótese.

Em contraste com as observações sobre a expressão de B7-1 por células B, a análise de B7-2 (CD86) mostrou que o percentual de células $CD19^+CD86^+/CD19^+$ foi significativamente mais elevado antes e após a formação do granuloma (Figura 14), quando comparada a de B7-1 ($CD80^+$) (Figura 15). Observamos que os pacientes na fase crônica apresentaram uma elevação da razão $CD19^+CD86^+/CD19^+$ (Figura 24), quando comparados ao grupo NI. Em contraste, a razão $CD19^+CD80^+/CD19^+$ (Figura 24C) não diferiu daquela observada para o grupo controle, antes e após o granuloma formado em nenhum dos grupos estudados.

Na presença dos anticorpos anti-IL10, a diferença no percentual dessas moléculas foi muito mais evidente na forma INT, sugerindo um papel dessa citocina na regulação da molécula B7-2 (Figura 24C). Embora, o aumento de células B totais possa estar diretamente relacionado ao desenvolvimento da patologia esquistossomótica, a modulação de B7-2 nessa população celular na forma assintomática da infecção parece estar sob o controle da IL-10.

Diversos trabalhos mostram a existência de interações complexas entre células e moléculas acessórias e relacionam o envolvimento de citocinas no direcionamento de respostas do tipo 1 e 2 (FLORES-VILLANUEVA *et al.* 1994; FREEMAN *et al.*, 1995; FREEMAN *et al.*, 1996; KING *et al.*, 1996; JACOBS *et al.*, 1998; HERNANDEZ *et al.* 1999; GREENWALD *et al.*, 1999; KEANE-MYERS *et al.*, 1997). Nossos resultados são coerentes com os dados obtidos por esses autores (FREEMAN *et al.*, 1995; KEANE-MYERS *et al.*, 1997; GREENWALD *et al.*, 1999) que mostram um direcionamento das respostas do tipo 2 associada à modulação da expressão de B7-2, uma vez que o bloqueio da IL-10 era capaz de induzir um aumento significativo do percentual médio de B7-2 em células $CD19^+$, em nosso sistema (Figura 25B). KING e colaboradores (1996) sugeriram que na esquistossomose experimental, esse efeito sobre o direcionamento de respostas do tipo 2 pode ocorrer também no ligante de B7. Observações similares foram feitas por HERNANDEZ e colaboradores (1999) que mostraram uma diminuição significativa da proliferação de células de animais B7-2 $-/-$ infectados pelo *S.mansoni*. Esse

estudo mostrou ainda, que as células T produziram apenas IFN- γ , não tendo sido detectada a produção de IL-4 ou IL-10, um padrão completamente oposto ao apresentado pelos animais controle. Por outro lado, GREENWALD e colaboradores (1999) mostraram que em animais B7-2^{-/-}, há um aumento da mensagem para IL-4, IL-5 e IL-13, durante o curso da infecção com *Heligmosoides polygyrus*, um nematódeo que parasita camundongos. Esses mesmos autores mostraram ainda que B7-2 parece não ser requerido durante o início das respostas de células T, sendo por outro lado de vital importância para a sustentação das respostas do tipo 2 nos estágios tardios dessa infecção (por volta do 14^o dia).

Na esquistossomose mansoni, vários trabalhos da literatura mostram que a interação B7-2/CD28 tem papel fundamental na indução da ativação de células T auxiliaadoras nos granulomas de fase aguda, enquanto, na fase crônica, o baixo nível de expressão de B7-2 pelas células T auxiliaadoras poderia levar a um estado de anergia celular (RATHORE *et al.* 1996b). A modulação da molécula B7-2 e de produtos do MHC de classe II pela IL-10 resulta na diminuição da hipersensibilidade tardia e conseqüentemente do granuloma (FLORES-VILLANUEVA *et al.* 1994).

Outros estudos reforçaram a hipótese de que B7-2 poderia direcionar respostas do tipo 2. O tratamento com anticorpos anti-B7-2 bloquearam as respostas do tipo 2 na infecção pelo *S. mansoni* (SUBRAMANIAN *et. al.*, 1997) e por *L. major* (BROWN *et. al.*, 1997), enquanto as respostas para *heligmosoides polygyrus* foram inibidas pela administração combinada de anticorpos anti- B7-2 e anti-B7-1. Os dados da literatura e os apresentados neste trabalho nos levam a inferir que a expressão das moléculas co-estimuladoras B7-2 e B7-1 estão sob o controle de citocinas reguladoras. Acreditamos que esse controle poderia ser, diretamente, dependente do balanço entre os inúmeros fatores solúveis produzidos durante a resposta imune, que levaria tanto ao tipo 1, quanto ao tipo 2 com fenótipos diferenciados de moléculas de co-estimuladoras. Deve-se ressaltar, no entanto, que o direcionamento e controle da resposta imune parece ser dependente dos tipos de patógenos e do microambiente em que estão inseridos.

A imunomodulação verificada na esquistossomose é um processo complexo, finamente orquestrado pelo balanço entre uma série de mecanismos reguladores presentes no sítio do granuloma. Dentro deste contexto, macrófagos ativados poderiam secretar fatores solúveis e expressar moléculas que mediarão a

extensão da reação granulomatosa. Desse modo, justifica-se a avaliação dos percentuais de células CD14⁺ totais e/ou co-expressando receptores envolvidos em interações celulares no granuloma *in vitro*. Os resultados apresentados nesta tese mostraram uma diminuição do percentual de células CD14⁺ no grupo INT, quando comparado ao grupo NI (Figura 17), após cultura. No contexto *ex vivo*, não foram observadas diferenças entre os grupos, de acordo com os achados de MARTINS-FILHO e colaboradores (tese de doutorado, 1997). É interessante notar que os percentuais de células CD14⁺ após cultura foram compatíveis com os observados *ex vivo*, que usualmente apresentam níveis mais baixos, sugerindo não ter havido perda do receptor em cultura. A IL-10 parece exercer controle sobre essa população celular, uma vez que o bloqueio elevou significativamente os percentuais de células CD14⁺, nos grupos INT e NI (Figura 25A). Várias considerações poderiam ser feitas em relação a não detecção de diferenças entre os percentuais de células CD14⁺ apresentados pelo dois grupos. Uma delas seria de que a diminuição dos percentuais dessa população celular observada nos dois grupos não estaria diretamente relacionada ao desenvolvimento da patologia da infecção, estando baseada no sistema *in vitro* utilizado, no qual as células aderentes em cultura podem não ter sido totalmente removidas para análise por citometria de fluxo após a formação do granuloma no grupo infectado. De qualquer forma, isso não parece viável diante da observação de que a razão CD14⁺CD86⁺/CD14⁺ também não diferiu entre os grupos, na ausência ou presença dos anticorpos anti-IL-10 (Figura 25B). Embora tenha sido observada uma diminuição do percentual de células CD14⁺ expressando CD86 (B7-2) no grupo INT (Figura 18), esse fato parece não ter ocorrido devido a um efeito da IL-10 endógena produzida por outras células, embora, deva-se considerar que a IL-10 por ser uma citocina reguladora da função de macrófagos, poderia diminuir a apresentação de antígeno via inibição da expressão de MHC classe II e de moléculas co-estimuladoras por efeitos auto-reguladores. Entretanto, a adição da rIL-10 às culturas reduziu significativamente o percentual de células CD14⁺CD86⁺/CD14⁺ em os todos os grupos, sugerindo que essa citocina produzida pelos vários tipos celulares presentes no granuloma *in vitro* pode não ter sido suficiente para modular a molécula B7-2 expressa por macrófagos. O mesmo pôde ser observado em relação à expressão de B7-1 (CD80) por células

CD14⁺, onde os percentuais de CD14⁺CD80⁺/CD14⁺ não foram alterados após o bloqueio da IL-10 (Figura 25C).

Por sua vez, nossos resultados mostraram que a modulação da molécula ICAM-1 (CD54) parece estar sob o controle de outros mecanismos reguladores na fase crônica intestinal (Figura 25D), uma vez que a razão de células CD14⁺CD54⁺/CD14⁺ foi bem menor do que a das moléculas B7-1 e B7-2 expressas por essa mesma população e não foi alterado na presença de anti-IL-10. A redução no percentual dessas células poderia estar relacionada a uma série de fatores, dentre os quais à diminuição da expressão do ligante de ICAM-1 por células T, que foi observado no grupo INT, levando a uma interação ineficiente. Um outro fator poderia ser o excesso do LFA-1, ligante dessa molécula durante o processo de interação, ou seja, as APCs poderiam neste caso, compartilhar ICAM-1 com o próprio ligante, e uma vez ocorrendo isto, essas células poderiam não expressar níveis suficientes dessa molécula na superfície da célula para uma co-estimulação eficiente, bloqueando assim a interação celular (VAN SEVENTER *et al.*, 1990; KUHLMAN *et al.*, 1991).

Por outro lado, deve se ressaltar que os indivíduos do grupo HS não apresentaram nenhuma alteração no percentual de células CD14⁺ e /ou expressando qualquer um dos marcadores avaliados, após o bloqueio da IL-10. Esses dados nos levam a inferir sobre a existência de outros fatores que poderiam estar regulando o efeito da IL-10 nesta forma clínica, tais como TNF- α , que como se sabe, modula citocinas do tipo 2. Vale ressaltar que essa citocina tem sido implicada como um importante fator mediador na patologia de várias doenças infecciosas ou inflamatórias, uma vez que o tratamento com anticorpos anti-TNF- α tem um efeito protetor nas manifestações clínicas de doenças graves (GRAU *et al.* 1987; SAUKKONEN *et al.*, 1990).

7 – RESUMO DOS RESULTADOS E CONCLUSÃO

Os dados que apresentaram maior relevância no contexto que levaria à diminuição ou aumento da patologia estão relacionados nos diagramas a seguir:

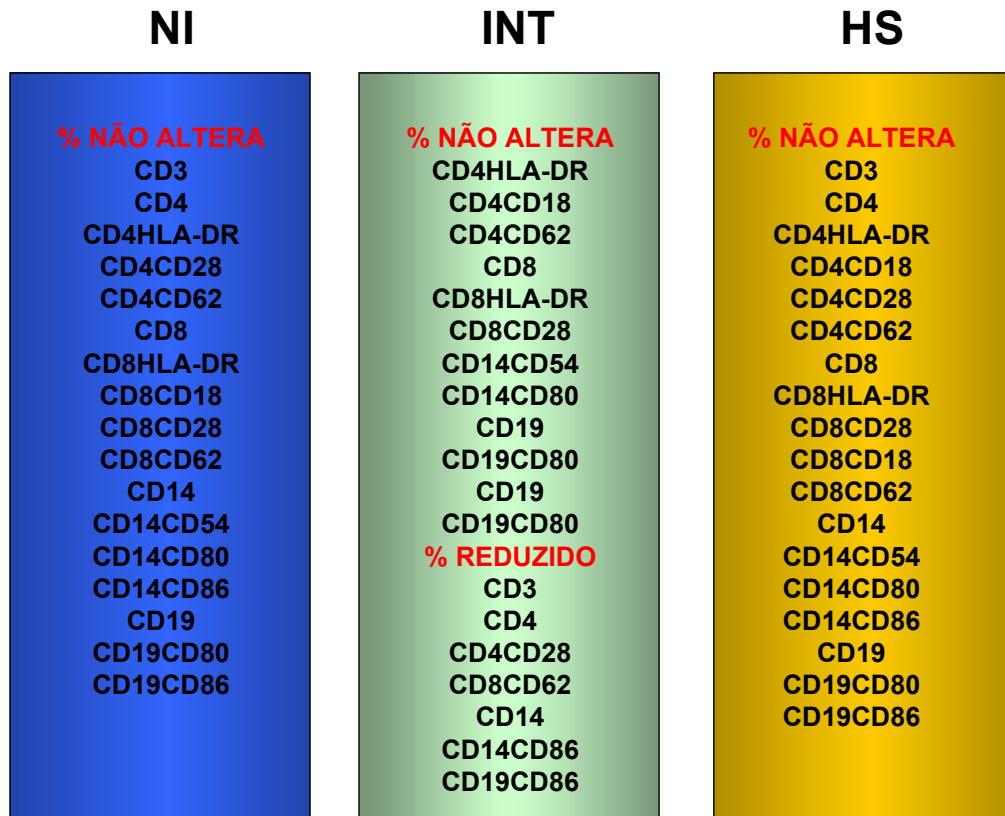


Diagrama 1 - Estudo comparativo do fenótipo de populações e subpopulações celulares avaliadas após cultura de granuloma *in vitro* em relação à análise *ex vivo*

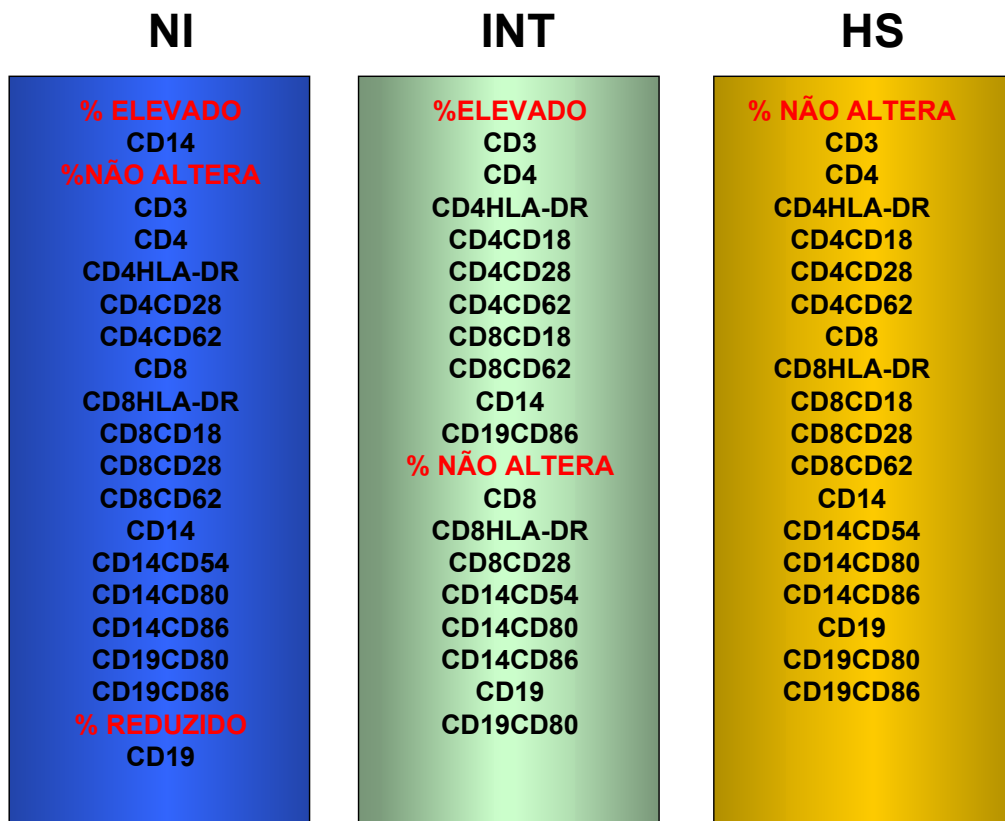


Diagrama 2 - Estudo comparativo do efeito do bloqueio da IL-10 em relação a PB-SEA.

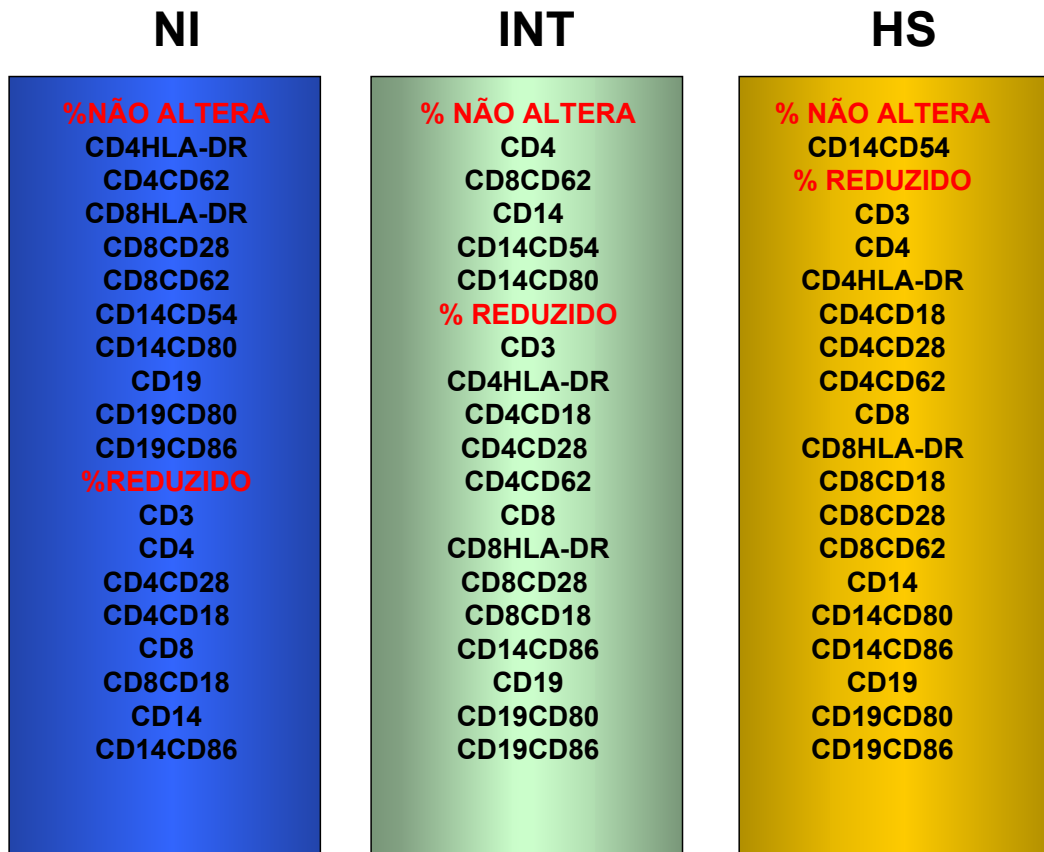


Diagrama 3 - Estudo comparativo do efeito da rIL10 em relação a PB-SEA .

Como conclusão geral, a IL-10 tem papel importante no controle da morbidade da esquistossomose e parece exercer o seu efeito através da modulação de populações celulares e importantes receptores envolvidos no desenvolvimento da patologia da infecção

8 - COMENTÁRIOS E PERSPECTIVAS

Os resultados apresentados nesta tese mostraram a importância de se estudar os mecanismos de regulação da resposta imune na fase crônica da esquistossomose. Através do modelo de granuloma *in vitro*, os dados gerados nos permitiram analisar o perfil fenotípico de PBMC de pacientes portadores de diferentes formas clínicas da esquistossomose antes e após a cultura nos grupos infectados pelo *S. mansoni* e não infectados. Os dados apresentados permitiram inferir sobre a participação da IL-10 na modulação de populações de linfócitos T após a cultura. Nossos resultados mostraram que a IL-10 altera, preferencialmente, as populações de linfócitos CD4 em pacientes INT. Esses dados sugeriram, ainda, que em pacientes HS, os receptores co-expressos pela subpopulação CD4 parecem exercer um papel importante nas interações celulares, principalmente os de ativação celular como HLA-DR, que estariam diretamente relacionados ao aumento e manutenção da resposta inflamatória. Isto pode ser evidenciado pela ausência de qualquer alteração após o bloqueio da IL-10 nas populações celulares presentes no granuloma *in vitro*. É importante notar que ação da IL-10 sobre a modulação do percentual de moléculas co-expressas pela maioria das populações celulares analisadas neste estudo reforçam a hipótese de especificidade antigênica da IL-10, visto que ela não foi capaz de alterar o percentual de nenhuma população celular investigada no grupo NI.

As informações geradas neste estudo permitem ampliar nossas perspectivas para estudos futuros, utilizando o modelo *in vitro* para investigar a contribuição efetiva dessas populações celulares e de moléculas acessórias envolvidas nas interações celulares no granuloma *in vitro*. Uma das abordagens futuras avaliar consiste na seleção de populações celulares no granuloma *in vitro* e do bloqueio das moléculas acessórias investigadas em nosso estudo com anticorpos monoclonais. Uma outra abordagem, consiste em continuar a utilização de animais “knockout” para o estudo de outras moléculas acessórias, uma vez que nossos dados preliminares, utilizando o modelo de granuloma *in vitro*, reproduziram observações concordantes com as obtidas, através da análise de PBMC de pacientes portadores de infecção pelo *S. mansoni*.

9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amiri, P.; Haak-Frendscho, M.; Robbins, K, McKerrow, J.H. Stewart, T & Jardieu, P. Anti-immunoglobulin E treatment decreases worm burden and egg production in *Schistosoma mansoni* infected normal and interferon-gamma “knockout” mice. **J. Exp. Med.** V 180, p 43, (1994).

Andrade, Z.A. & Warren, K.S. Mild Prolonged Schistosomiasis In Mice: Alterations In Host Response With Time And The Development Of Portal Fibrosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 58: 53, (1964).

Andrade, Z.A. & Van Marck, E.A.E. Schistosomal glomerular disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v 79. P499. (1984).

Araújo, M.I.; Bacellar, O.; Ribeiro de Jesus, A. & Carvalho, E.M. The absence of gamma-interferon production to *S. mansoni* antigens in patients with schistosomiasis. **Bras. J. Med. Biol. Res.** v. 27, p 1619, (1994).

Araújo, M.I., Ribeiro de Jesus, A.; Bacellar, O.; Sabin, E. & Carvalho, E.M. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur. J. Immunol.** V 27, p.1399. (1996).

Bahia-Oliveira, L.M.G., Gazzinelli, G., Eloi-Santos, S.M. Et Al. Differential Cellular Reactivity To Adult Worm Antigens Of Patients With Different Clinical Forms Of Schistosomiasis Mansoni. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 86: 47, (1992).

Barros-Coelho, R. Patologia Da Esquistossomose Mansônica. 1. Comportamento Do Ovo De *Schistosoma Mansoni*. **Publ. Avulsas Inst. Aggeu Magalhães**, 4: 61, (1955).

Bentley, A.G., Doughty, B.L. & Phillips, S.M. Ultrastructural Analysis Of The Cellular Response To *Schistosoma Mansoni*. I. The *In vitro* Granuloma. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 31: 1168, (1982).

- Berkman, N. Jhon, M.; Roesems, G.; Jose, P.J. Barnes, P. J. & Chung, K.F. Inhibition of macrophage inflammatory protein-1^a expression by IL-10. **J. Immunol.** 155, 4412-4418. (1995).
- Bleijs, D.A., de Waal-Malefyt, R., Figdor, C.G., van Kooyk, Y.. **Eur. J. Immunol.** Jul, 29(7):2248-58. (1999).
- Bogliolo, L. Patologia. **Rev. Brasil. Malariol. Doen. Trop.**, 9 (2-3): 359, (1959).
- Boros, D.L. Immunoregulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni **Ann. N.Y. Acad. Sci. USA.** V 465, p 313. (1986).
- Boros, D.L.. Immunopathology Of *Schistosoma* Infection. **Clin.Microb.Ver.** 2,250. (1989).
- Boros, D.L. & Lukacs, N.W. The Role Of Egg Antigens, Cytokines In Granuloma Formation In Murine Schistosomiasis Mansoni. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, (1993).
- Boros, D.L., Pelley, R.P. & Warren, K.S. Spontaneous Modulation Of Granulomatous Hypersensitivity In Schistosomiasis Mansoni. **J. Immunol.**, 114: 1437, 1975.
- Borrielo F.M.P.; Sethma, S.D.; Boyd, A.N.; Schweizer, E.a.; Tivol, d.; Jacoby, T.B; Strom, E.M.; Simpsom, G.J.; Freeman & Sharpe. B7-1 and B7-2 have overlapping critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation. **Immunity**, 6-303.(1997).
- Bout, D., Santoro, F., Carlier, J.C., Bina, J.C. & Capron, A. Circulating Immune Complexes In Schistosomiasis. **Immunology**, 33: 17, (1977).
- Brown, J. A.; Titus, R.G.; Nabavi. N, & Glimcher, L.H. Blockade Of Cd86 Ameliorates *Leishmania Major* Infection By Downregulating The Th2 Response. **J. Infect. Disease.** 174:1303. (1997)

Bryam, J.E. & Von Lichtenberg, F. Altered Schistosome Granuloma Formation In Nude Mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 26: 944, (1977).

Butterworth, A.E., Remold, H.G., Houba, V., David, J.R., Franks, D., Dacid, P.H. & Sturrock, R.F. Antibody-Dependent Eosinophil-Mediated Damage To ⁵¹Cr-Labeled Schistosomula Of *Schistosoma Mansoni*: Mediation By Igg, And Inhibition By Antigen-Antibody Complexes. **J. Immunol.**, 118: 2230, (1977).

Butterworth, A.E., Bensted-Smith, R., Capron, A., Capron, M., Dalton, P.R., Dunne, D.W., Grzych, J.M., Kariuki, H.C., Khalife, J., Koech, D., Mugambi, M., Ouma, J.H., Arap Siokonk, T.K. & Sturrock, R.F. Immunity In Human Schistosomiasis: Prevention By Blocking Antibodies Of The Expression Of Immunity In Young Children. **Parasitology**, 94: 281, (1987).

Brown, D.R., Swier, K.; Moskowitz, N.H.; Naujolas, M.F.; Locksley, R.M & Reiner, S.I. T helper differentiation in the absence of invariant chain . **J.Experim. Med.** 185, 31 (1997).

Buhrer, C.; Berlin, C.; Thiele, H.G.; Hamann, A.. Lymphocyte activation and expression of the human leukocyte-endothelial cell adhesion molecule-1 (Leu8/TQ1 antigen). **Immunology** 71:442-448. (1990).

Burra, P.; Hubscher, S.G.; Shaw, J.; Elias, E.; Adams, D.H.;. Is the intercellular adhesion molecule /leukocyte function associated antigen-1 pathway of leukocyte adhesion involved in the tissue damage of alcoholic hepatitis? **GUT**. 33: 268-271. (1992),

Carneiro-Santos, Martins-Filho, O.; Alves-Oliveira, O.; Silveira, A. M.S.; Coura-Filho, P, Viana, I.R.C.; Wilson, R.A. & Corrêa-Oliveira, R. Apoptosis, a mechanism of immunoregulation during human schistosomiasis mansoni. (2000). No prelo.

Cheever, A.W., De Witt, W.B. & Warren, K.S. Repeated Infection And Treatment Of Mice With *Schistosoma Mansoni*: Functional, Anatomic And Immunologic Observations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 14: 239, (1965).

Cheever, A.W., Xu, Y., Macedonia, J.G., Cox, T., Hieny, S. & Sher, A. A Quantitative Post-Mortem Study Of Schistosomiasis Mansoni In Man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 17: 38, (1968).

Cheever, A.W., Finkelman, F.D., Caspar, P., Heiny, S., Macedonia, J.G. & Sher, A. Treatment With Anti-IL-2 Antibodies Reduces Hepathic Pathology And Eosinophilia In *Schistosoma Mansoni*-Infected Mice While Selectively Inhibiting T Cell IL-5 Production. **J. Immunol.**, 148 (10): 3244, (1992).

Cheever, A.W. ; Williams, M.E.; Wynn, T.^a Finkelman, F.D.; Seder, R.A.; Cox, T.M.; Hieny, S.; Caspar, P. & Sher, ^a 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.** V.153, p 753, (1994).

Cheever, A.W., Lewis, F.A., Wynn T.A. ***Schistosoma mansoni***: Unisexual Infections Sensitize Mice For Granuloma Formation Around Intravenously Injected Eggs. **Parasitol. Res.** 83: 57-59. (1997).

Chensue, S.W. & Boros, D.L. Modulation Of Granulomatous Hypersensitivity. I. Characterization Of T Lymphocytes Involved In The Adoptive Suppression Of Granuloma Formation In *Schistosoma Mansoni* Infected Mice. **J. Immunol.**, 123: 1409, (1979).

Chensue, S.W., Terebuh, P.D., Warmington, K.S., Hershey, S.D., Evanoff, H.L., Kunkel, S.L. & Higashi, G.I. Role Of IL-4 And Ifn-Gamma In *Schistosoma Mansoni* Egg-Induced Hipersensitivity Granuloma Formation. **J. Immunol.**, 148: 900, (1992).

Chensue, S.W.; Warminton, K.S.; Hershey, S.D. Terebuh, P.D, Othman, M, & Kunkel, S.L. Evolving T cell responses in murine schistosomiasis: Th2 cells mediate

secondary granulomatous hypersensitivity and are regulated by CD8⁺ T cells *in vivo*. **J. Immunol.** V. 151, p. 1391. (1993).

Cher & Mosmann, Two types of helper T cell clone II Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **J.Immunol.** v. 138, p 3688, (1987).

Coelho, M.V. O Parasito *Schistosoma Mansoni*. In **Esquistossomose Mansoni** (Cunha, A.S., Ed.), P. 1, 12 Ed., Editora Xavier, Sp, (1970).

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.**, 120: 1225, (1978).

Colley, D.G., Hieny, S.E., Bartholomew, R.K. & Cook, J.A. Immune Response During Human Schistosomiasis Mansoni. Iii. Regulatory Effect Of Patient Sera On Human Lymphocytes Blastogenic Responses To Schistosomal Antigen Preparations. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 26: 917, (1977^a).

Colley, D.G., Cook, J.A., Freeman, G.L.Jr., Bartholomew, R.K. & Jordan, P. Immune Response During Human Schistosomiasis Mansoni. I. *In vitro* Lymphocyte Blastogenic Response To Heterogeneous Antigenic Preparations From Schistosome Eggs, Worm And Cercariae. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, 53: 420, (1977b).

Colley, D.G., Garcia, A.A., Lambertucci, J.R., Parra, J.C., Katz, N., Rocha, R.S. & Gazzinelli, G. Immune Responses During Human Schistosomiasis. Xii. Differential Responsiveness In Patients With Hepatosplenic Disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 35: 793, (1986).

Corrêa-Oliveira, R., Pearce, E.J., Oliveira, G.C., Golgher, D.B., Katz, N., Bahia, L.G., Carvalho, O.S. & Gazzinelli, G. The Human Immune Response To Defined Immunogens of *Schistosoma Mansoni*: Elevated Antibody Levels To Paramyosin In Stoll-Negative Individuals From Two Endemic Areas In Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 83: 1205, (1989).

Coulson, P.S. Smythiers, L.E, Betts, C. Mabbot, N.A. Sternberg, J.M. Wei X.G. Liew, F.Y. Nitric oxide produced in the lungs of mice immunized with the radiation-attenuated schistosome vaccine is not the major agent causing challenge parasite elimination. **Immunology**, 93 55-63. (1998).

Damian, R.T. Immunity In Schistosomiasis: A Holistic View. **Contemp. Top. Immunobiol.**, 12: 359, (1984).

Diedrichs, M.M.; Epplen, J.T.& Schendel, D.J. Enhanced expression of HLA-class II molecules on activated human T lymphocytes following treatment with tumor necrosis alpha. **Hum. Immunol.** 31(4):286, (1991).

Doenhoff & Long, Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in mouse. IV. The inability of T-cell-deprived mice to resist reinfection and other *in vivo* studies on the resistance. (1979).

Domingos, E.O. & Warren, K.S. The Inhibition Of Granuloma Formation Around *S.Mansoni* Eggs. li. Thimectomy. **Amer. J. Pathol.**, 51: 757, (1967).

Domingos, E.O. & Warren, K.W. Pathology and pathophysiology of the small intestine in the murine schistosomiasis *Schistosoma mansoni*, including a review of the literature. **Gastroenterology**, v 56, p231. (1969).

Doughty, B.L. & Phillips, S.M. Delayed Hypersensitivity Granuloma Formation Around *Schistosoma Mansoni* Eggs *In vitro*. I. Definition Of The Model. **J. Immunol.**, 128: 30, (1982^a).

Doughty, B.L. & Phillips, S.M. Delayed Hypersensitivity Granuloma Formation And Modulation Around *Schistosoma Mansoni* Eggs *In vitro*. li. Regulatory T Cell Subsets. **J. Immunol.**, 128: 37, (1982^b).

Doughty, B.L., Ottesen, E.A., Nash, T.E. & Phillips, S.M. Delayed Hypersensitivity Granuloma Formation Around *S. Mansoni* Eggs *In vitro*. Iii. Granuloma Formation And Modulation In Human Schistosomiasis Mansoni. **J. Immunol.**, 133: 993, (1984).

Doughty, B.L., Goes, A.M., Parra, J.C., Rocha, R.S., Katz, N., Colley, D.G. & Gazzinelli, G. Granulomatous Hypersensitivity To *Schistosoma Mansoni* Egg Antigens In Human Schistosomiasis. I. Granuloma Formation And Modulation Around Polyacrylamide Antigen-Conjugated Beads. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 82 (4): 47, (1987).

Ellner, J.J., Olds, R.G., Osman, S.G., El Kholly, A. & Mahmoud, A.F. Dichotomies In The Reactivity To Worm Antigen In Human Schistosomiasis Mansoni. **J. Immunol.**, 126: 309, (1981).

Ellner, J.J., Olds, R.G., Kamel, R., Osman, E.G., El Kholly, A. & Mahmoud, A.F. Suppressor Splenic T Lymphocytes In Human Hepatosplenic Schistosomiasis Mansoni. **J. Immunol.**, 125: 308, (1980).

Eloi-Santos, S.M.; Novato-Silva, E.; Maselli, V.M.; Gazzinelli, G.; Colley, D.G.; & Corrêa Oliveira, R. Idiotypic sensitization in utero in children born to mothers with schistosomiasis and chagas disease . **J. Clin. Invest.** 84: 1028, (1989).

Essner ,R. Rhoades, K, McBride, W. H. Morton, D.L. & Economou, J.S. IL-4 downregulates IL-1 and TNF gene expression on human monocyte. **J. Immunol.** V. 142, p 3857, (1989).

Falcão, P.L.; Malaquias, L.C.C; Martins-Filho,O.A.; Silveira, A.M.; Passos, V.M.; Prata, A.; Gazzinelli, G.; Coffmann, R.L. & Corrêa-Oliveira, R. Human schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the *in vitro* granuloma formation. **Parasite Immunol.** 20(10), 447-454. (1998).

Falcão, PL. Tese de mestrado. Esquistossomose mansoni humana: análise do papel da IL-10 e IL-4 na formação do granuloma e proliferação celular *in vitro*.1994.

Fiorentino, D.F., Bond, M.A. & Mossman, T.R. Two Types Of T Helper Cell. Iv. Th2 Clones Secrete A Factor That Inhibit Cytokine Production By Th1 Clones. **J. Exp. Med.**, 170: 2081, (1989).

Flores-Villanueva, P.O; Reiser, H. & Stadecker, M.J. Regulation Of T-Helper Cell Responses In Experimental Murine Schistosomiasis By Il-10. Effect On Expression Of B7 And B7-2 Costimulatory Molecules By Macrophages. **J. Ofimmunoogy.** 153, 5190. (1994).

Freeman, G.J.; Boussiotis, V. A.; Anumanthan, A.; Bernstein, G.M.; Ke. X.Y.; Renert, P.D.; Gray, G.S.; Grinben, J.G.& Nadler, L.M.. B7-1 And B7-2 Do Not Deliver Identical Costimulatory Signals, Since B7-2 But Not B7-1 Preferentially Costimulates The Initial Production Of Il-4. **Immunity** 2:523. (1995).

Freeman, G.J.; Montesano, M.^a Secor, W.E. Colley, D.G.; Howard, M.J. Bosshardt, SC. Immunopathogenesis and immunoregulation in scgistosomiais. Distinct chronic pathologic syndromes in CBA/J mice. **Ann. N.Y. Acad. Ascii.** Oct.25; 797:151-65. (1996).

Gajewiski, T.F. & Fitch, F.W. Anti-Proliferative Effect Of Ifn-Gamma In Immune Regulation. I. Ifn-Gamma Inhibits The Proliferation Of Th2 But Not Th1 Murine Htl Clone. **J. Immunol.**, 140: 4245, (1988)

Galea-Lauri, J.; Darling, D, Gan, S.U.; Krivochtchapov, L.; Kuiper, M.; Gaken, J.; Souberbiele, B. Farzanech, F. Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. **J.Immunol.** Jul.1, 163(1):62-70. (1999).

Gazzinelli, G., Katz, N., Rocha, R.S. & Colley, D.G. Immune Response During Human Schistosomiasis Mansoni. X. Production And Standardization Of An Antigen-Induced Mitogenic Activity By Peripheral Mononuclear Cells From Treated, But Not Active Cases Of Schistosomiasis. **J. Immunol.**, 130: 2891, (1983).

Gazzinelli, G., Lambertucci, J.R., Katz, N., Rocha, R.S., Lima, M.S. & Colley, D.G. Immune Response During Human Schistosomiasis Mansoni. Xi. Immunologic Status Of Patients With Acute Infections And After Treatment. **J. Immunol.**, 135: 2121, (1985).

Gazzinelli, G., Montesano, M.A., Corrêa-Oliveira, R., Lima, M.S., Katz, N., Rocha, R.S. & Colley, D.G. Immune Response In Different Clinical Groups Of Schistosomiasis Patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 82 (Suppl. Iv): 95- (1988).

Goes, A.M., Rezende, S.A., Gazzinelli, G. & Doughty, B.L. Granulomatous Hypersensitivity To *Schistosoma Mansoni* Egg Antigens In Human Schistosomiasis. Iv. A Role For Prostaglandin-Induced Inhibition Of *In vitro* Granuloma Formation. **Parasite Immunol.**, 16: 11, (1994).

Goes, A.M., Gazzinelli, G., Rocha, R.S., Katz, N. & Doughty, B.L. Granulomatous Hypersensitivity To *Schistosoma Mansoni* Egg Antigens In Human Schistosomiasis. Iii. *In vitro* Granuloma Modulation Induced By Immune Complexes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 44 (4): 434, (1991).

Grau, G.E.; Fajardo, L.F.; Piguet, P.I.; Allet, B.; Lambert, P.H. & Vassolli, P. Tumor necrosis factor alpha (cachectin) as an essential mediator in murine cerebral malaria. **Science**, v, p.210, (1987).

Greenwald, R.J.; Urban, J.F.; Ekkens, M.J.; Chen, S.J.; Nguyen, D.; Fang, H., Finkelman, F.D.; Sharpe, A.H. & Gause, W.C. B7-2 Is Required For The Progression But Not The Initiation Of The Type 2 Immune Response To A Gastrointestinal Nematode Parasite. **The Journal Of Immunol.**, 162: 4133-4139 (1999).

Gryzch, J.M., Pearce, E.J., Cheever, A.W., Caulada, Z.A., Caspar, P., Hieny, S., Lewis, A. & Sher, A. Egg Deposition Is A Major Stimulus For The Production Of Th2 Cytokines In Murine Schistosomiasis Mansoni. **J. Immunol.**, 146: 1322, (1991).

Groux, H.; Bigler, M.; de Vries, J.E. & Roncaroo, M.G. Interleukin 10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. **J. Exp. Med.** 184, 19 (1996).

Harrison, R. A.; Bickle, Q. & Doenhoff, M.J. Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. Evidence that the mechanism which mediate resistance during early patent infections may lack immunological specificity. **Parasitology** v. 84, p.93. (1982)

Hart, P.H.; Vitte, G.F. Burgues, D.R.; Whitty, G.A.; Piccoli, D.S. & Hamilton, J. H. Potential anti-inflammatory effects of interleukin 4: Suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin 1 and prostaglandin E2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** V86, p3803, (1989).

Hernandez, H.J.; Sharpe, A.H. & Stadecker, M.J. Experimental murine schistosomiasis in the absence of B7 costimulatory molecules: reversal of elicited T cell cytokine profile and partial inhibition of egg granuloma formation. **J. Immunology.** Mar 1;162(5):2884-9 (1999).

Jacobs W., Bogers J. Deelder A., Wery M., Van Marck. Adult ***Schistosoma mansoni*** Worms Posively Modulate Soluble Egg Antigen-Induced Hepatic Granuloma Formation In Vivo: Stereological Analysis And Immunophenotyping Of Extra-Cellular Matrix Proteins, Adhesion Molecules And Chemokines. **Am J. Pathol.** 150: 2033-2045 (1997b).

Jacobs, W.; Van de Vijver K., Deelder, A., Van Marck, E. Morphometrical and immunopathological dissection of the hepatic schistosoma haematobium granuloma in the murine host. **Parasite.** Dec;5(4):299-306. (1998).

Jacobs W., Bogers J. Deelder A., Wery M., Van Marck, E. Schistosomal granuloma modulation. III, *Schistosoma haematobium* worms accelerate *S. mansoni* soluble egg antigen-induced hepatic granuloma formation *in vivo*. **Parasitol. Res.** Nov, 85(11):905-9. (1999).

James, S.L. & Sher, A. Cell mediated immune response to schistosomiasis. **Curr Topics Immunobiol.** V 143, p. 4208 (1990).

Johnston, G.I.; Cook, R.G.; McEver, T.P.. Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. **Cell.** 56:1033-1044. (1989).

Jordan, P. & Werbe, G. **Human Schistosomiasis.** Springfield. Illinois: Charles C. Thomas, (1969).

Katz, N., Chaves, A. & Pellegrino, J. A Single Device For Quantitative Stool Thick-Smear Technique In Schistosomiasis Mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,** 14: 397, (1972).

Keane-Myers, A.; Gause, W.C.; Linsley, P.S.; Chen, S.J.& Wills-Karp,M. B7-Cd28/Ctla-4 Costimulatory Pathways Are Required For The Development O T Helper Cell 2-Mediated Allergic Responses To Inhaled Antigens. **J. Immunol.** 158:2042. (1997).

King, C.L.; Xianli, J. June,C.H. Abe, R.; Lee, K.P.Cd29-Deficientmicegenerate Na Impaired Th2 Response To Schistosoma Mansoni Infection **Eur. J. Immunol.** Oct,26(1010: 2448-55. (1996).

Kuhlman, P.; Moy, V.T.; Lollo, B.A.; Brian, A.A. The accessory function of murine intercellular adhesion molecule-1 in T lymphocyte activation. Contributions of adhesion and co-activation. **J. Immunol.** 146: 1773-1782. (1991).

Lammie, P.J., Linette, G.P. & Phillips, S.M. Characterization Of *Schistosoma Mansoni* Antigen-Reactive T Cell Clones That Form Granulomas *In vitro*. **J. Immunol.**, 134: 4170, (1985).

Langley J.G. & Boros, D.L. T-lymphocyte responsiveness in murine schistosomiasis mansoni is dependent upon the adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1, lymphocyte function-associated antigen, and very late antigen-4 **Infect. Immun.** Oct,63(10):3980-6. (1995).

Lejoly-Boisseau H.; Blann, A.D.; Seigneur, M.; Tribouley-Duret, J.; Tribouley j.; Boisseau M.R.. Endothelium activation related increase of soluble adhesion molecule-1 in human schistosomiasis. Lack of correlation with serology. **Europ. J.Clin. Invest.** 26:522-523. (1996).

Leptak , L.L & Mckerrow, J,H. Schistosome Egg Granulomas And Hepatic Expression Of Tnf- α Are Dependent On Immune Priming During Parasite Maturation **J. Immunol.** 158: 301-307. (1997).

Lima, M.S., Gazzinelli, G., Rocha, R.S., Katz, N. & Colley, D.G. Demonstration Of Leukocyte Inhibitory Factor In Human Schistosomiasis Mansoni And Its Evaluation From Patients In An Endemic Setting. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, 37: 351, (1985).

Lima, M.S., Gazzinelli, G., Nascimento, E., Parra, J.C., Montesano, M.A. & Colley, D.G. Immune Responses During Human Schistosomiasis Mansoni. Evidence For Antidiotypic T Lymphocyte Responsiveness. **J. Clin. Invest.**, 78: 983, 1986.

Lockwood, C.M.; Elliot, J.D.; Bretman,L.; Hale,G.; Rabello,P.; Frewin, M., Ringler, D. Merrill, C.; Waldmann, H. Anti-adhesionmoleculetherapy as aninterventional strategy for autoimmune inflamation. **Clin. Immunol nov.**, 93(2):-106. (1999).

Lukacs, N.W.; & Boros, D.L. Lymphokine regulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. **Clin. Immunol. Immunopathol.** 68: 57-63. (1993).

Lowry, D.A., Roseburg, A.L. & Randall, R.J. Protein Measurement With The Folin Phenol Reagent. **J. Biol. Chem.**, 193: 265, (1951).

Maddison, S.E., Slemenda, S.B., Tsang, V.C.W. & Pollard, R.A. Serodiagnosis Of *Schistosoma Mansoni* With Microsomal Adult Worm Antigen (Mama) In An Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Using A Standard Curve Developed With A Reference Serum Pool. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 35: 484, (1985).

Madison & Kagan, Adoptive transfer of protective immunity in experimental schistosomiasis. **J. Parasitol.** V 65, p 515, (1979).

Malaquias, L.C.C.; Falcão. P.L.; Silveira, ^aM.S.; Gazzinelli, G.; Prata, A.; Coffmann, R.L.; Pzziolo, V.R.; & Corrêa-Oliveira, R. Cytokine regulation of human response to *Schistosoma mansoni*: I. Analysis of the role of IL-4, IL-5, and IL-10 on peripheral blood mononuclear cells responses. **Scand. J. Immunol.** 46, 304-311. (1997).

Martins-Filho, O.A.; Dutra, W.º; Freeman, G. L. Silveira, A. S.Rabelo-Telles,A. L. Colley ,D.G.; Prata, A.; Gazzinelli, G.Corrêa-Oliveira, R. & Parra ,J. F.C. Flow Cytometric Study Of Blood Leukocyte In Clinical Forms Of Human Schistosomiasis .**Scand. J. Immunol.** 46, 304-311. (1997).

Martins-Filho, O.A. Cunha-Melo, J.R.; Lambertucci, J.R.; Silveira, A. S Colley ,D.G.; Gazzinelli, G. & Corrêa-Oliveira,R. Clinical Forms Of Human Schistosoma Mansoni Infection Are Associated With Differential Activation Of T-Cell Subsets And Costimulatory Molecules. **Dig. Dis Sci** . Mar; 44 (3): 570-7 (1999).

Martins-Filho, O.A. Tese de doutorado. Análise de parâmetros fenotípicos celulares na esquistossomose mansoni humana. 1997.

Mathew, R.C., Ragheb, S. & Boros, D.L. Recombinant Il-1 Therapy Reverses Diminished Granulomatous Responsiveness In Anti-L3t4-Treated, *Schistosoma Mansoni*-Infected Mice. **J. Immunol.**, 144 (11): 4356, (1990).

Montesano, M.A., Lima, M.S., Corrêa-Oliveira, R., Gazzinelli, G. & Colli, D.G. Immune Responses During Human Schistosomiasis Mansoni. Xvi. Idiotypic

Differences In Antibody Preparations From Patients With Different Clinical Forms Of Infection. **J. Immunol.**, 142 (7): 2501, (1989).

Montesano, M.A., Colley, D.G.; Freeman, G.L. & Secor, W.E. Neonatal exposure to idiotype induces *Schistosoma mansoni* egg antigen-specific cellular and humoral immun responses. **J. Immunol.** 163: 898-905. (1999).

Mosmann, T.R. & Coffman, R.L. Th1 And Th2 Cells: Different Patterns Of Lymphokine Secretion Lead To Different Functional Properties. **Ann. Rev. Immunol.**, 7: 145, (1989).

Mosmann, T.R. & Sad, S., The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. **Immunol. Today**, v. 17, p. 138, (1996).

Mountford, A.P.; Coulson, P.S.; Cheever, A.W.; Sher, A., Wilson, R.A. & Wynn, T.A. Interleukin-12 Can Directly Induce T-Helper 1 Responses In Interferon-Gamma (Ifn-Gamma) Receptor-Deficient Mice, But Requires Ifn-Gamma Signalling To Downregulate T-Helper 2 Responses. **Immunology** Aug.; 97(4):588-94. (1999).

Mountford, A.P.; Harrop, R. & Wilson, R.A.. Antigens Derived From Lung-Stage Larvae Of *Schistosoma Mansoni* Are Efficient Stimulators Of Proliferation And Gamma Interferon Secretion By Lymphocytes From Mice Vaccinated With Attenuated Larvae. **Infect. Immunity**. 63, 1980. (1995)

Nash, T.E., Cheever, A.W., Ottesen, E.A. & Cook, J.A. Schistosome Infections In Human: Perspectives And Recent Findings. **Ann. Intern. Med.**, 97: 740, (1982).

Natesan, M., Razi-Wolf, Z. & Reiser, H. Costimulation of IL-4 production by murine B7-1 and B7-2 molecules. **J. Immunol.** Apr., 15, 156(8):2783-91. (1996).

Neves, S.M.; Rezende, S.A.; & Goes A. M. Nitric oxide-mediated immune complex-induced prostaglandin E2 production by peripheral blood mononuclear cells of humans infected with *Schistosoma mansoni*. **Cellular Immunity** 195, 37-42 (1999).

Oliveira, D.M.; Silva-Teixeira, D.N., & Goes A.M. Evidence for Nitric Oxide on *in vitro* Granuloma Formation through Pivotal changes in MIP- α and IL-10 Release in Human Schistosomiasis. **Nitric Oxide** Vol 3, N 2, 162-171 (1999).

Ottesen, E.A. & Poindexter, R.W. Modulation Of Host Response In Human Schistosomiasis. li. Humoral Factors Which Inhibit Lymphocyte Proliferative Response To Parasite Antigens. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 29: 592, (1980).

Ottesen, E.A., Hiatt, 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. **Clin. Exp. Immunol.**, 33: 38, (1978).

Ottesen, E.A. Modulation Of The Host Response In Human Schistosomiasis. I. Adherent Suppressor Cells That Inhibit Lymphocyte Proliferative Responses To Parasite Antigens. **J. Immunol.**, 123: 1639, (1979).

Pacheco & Lenzi. Systemic Modulation Of peripheral Eosinophilia (Air Pouch Model) In Schistosoma mansoni Infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Suppl 2:165-72. (1997).

Parra, J.C. *Regulação Idiotípica Na Esquistossomose Mansoni Humana*. Tese de Doutorado, Universidade Federal De Minas Gerais, Belo Horizonte, Mg, Pp. 191, (1988)

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. **J. Immunol.**, 140 (7): 2401, (1988).

Parra, J.C., Gazzinelli, G., Goes, A.M., Moyes, R.B., Rocha, R.S., Colley, D.G. & Doughty, B.L. Granulomatous Hypersensitivity To *Schistosoma Mansoni* Egg Antigens In Human Schistosomiasis. li. *In vitro* Granuloma Modulation Induced By Polyclonal Idiotypic Antibodies. **J. Immunol.**, 147 (11): 3949, (1991).

Pearce, E.J.; Caspar, P.; Gryzch, J.M.; Lewis, F.A.; Sher, A. Downregulation Of Th1 Cytokine Production Accompanies Induction Of Th2 Responses during Infection Of Th2 Response By A Parasitic Helminth, *Schistosoma Mansoni* **J. Immunol.** 157, 3046. (1991).

Pearce, E.J. & Simpson, A.J.G. Schistosomiasis Immune Response: Just A Little Is Enough (1992).

Pearce, E.J., Caspar, P., Grzych, J.M., Lewis, F.A. & Sher, A. Down Regulation Of Th1 Cytokine Production Accompanies Induction Of Th2 Responses By A Parasitic Helminth, *Schistosoma Mansoni*. **J. Exp. Med.**, 173: 159, (1991).

Pessoa, S.B.& Martins, A.V. **Parasitologia Médica**. 11 ed. Rio de Janeiro, Guanabara, (1982).

Phillips, S.M. Diconza, J.J.; Gold. & Reid, W.A. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse I. Thymic dependence of eosinophilia, granuloma formation and host morbidity **J. Immunol.** V. 118, p. 594, (1977).

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. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 29: 820, (1980).

Ralph P.; Nakoinz, I; Sampson-Johannes, A; Fong, S; Lowe, D; Min, H.Y.; & Lin, L. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and Tumor necrosis factor. **J. Immunol.** v. 148, p. 808, (1992)..

Raso, P. & Neves, J. Contribuição Ao Conhecimento Do Quadro Anatômico Do Fígado Na Forma Toxêmica Da Esquistossomose Mansoni Através De Punções Biópsias. **Anais. Fac. Med. Univ. Fed. Minas Gerais**, 22: 147, (1965).

Raso, P & Bogliolo, L. Esquistossomose mansoni. São Paulo. Universidade de São Paulo – Cap. 5 p.77, (1970).

Raso, P., Bernardes, R.C., Tafuri, W.L., Bogliolo, L. & Neves, J. As Dimensões Do Granuloma Causadas Pelos Ovos Do *Schistosoma Mansoni* No Fígado Humano. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 12 (1-6): 45, (1978).

Rathore, A.; Sacristan, C.; Ricklan, D.E., Flores-Villanueva, P.O.; Stadecker, M.J.. *In situ* analysis of B7-2 costimulatory, major histocompatibility complex class II, and adhesion molecule expression in schistosomal egg granulomas. **Am. J. Pathol.** 149: 187-194. (1996).

Rezende, S.A., Miranda, T.C., Ferreira, M.G. & Goes, A.M. *In vitro* Granuloma Modulation Induced By Immune Complexes In Human Schistosomiasis Mansoni. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, 26 (2): 207, (1993).

Rey, L. Parasitologia. Cap. *Schistosoma Mansoni* E Esquistossomose: A Doença, 351, (1991).

Ribeiro De Jesus, A.M., Almeida, R.P., Bacellar, O., Araujo, M.I., Demeure, C., Bina, J.C., Dessein, A.J. & Carvalho, E.M. Correlation Between Cell-Mediated Immunity And Degree Of Infection In Subjects Living In An Endemic Area Of Schistosomiasis. **Eur. J. Immunol.**, 23: 152, (1993).

Ritter D.M. & McKerrow, J.M Intercellular adhesion molecule 1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation. **Infect. Immun.** Nov, 64(11):4706-13. (1996).

Rocklin, R.E., Tracy, J.W. & El Kholly, A. Activation Of Antigen-Specific Suppressor Cells In Human Schistosomiasis Mansoni By Fractions Soluble Egg Antigens Nonadherent To Con A Sepharose. **J. Immunol.**, 127: 2314, (1981).

Rocklin, R.E., Brown, A.P., Warren, K.S., P; Pelley, R.P.; Houba, V.; Siongok, T.K., Ouma, J.; Sturrock, R.F. & Butterworth, A.E. Factor that modify the cellular immune response in patients infected by *schistosoma mansoni* . **J. Immunol.** V 125, p 1916, (1980).

Sabin, E.A. & Pearce, E.J. Early IL-4 production by nonCD4 cells at the site of antigen deposition predicts the development of a T helper cell response to schistosome mansoni eggs. **J. Immunol.**, v 155, p. 4944. (1995).

Sacco, R.E.; Jensen, R.J.; Thoen, C.O.; Sandor, M.; Weinstock, J.; Lynch, R.G.; Dailey, M.O. Cytokine secretion and adhesion molecule expression by granuloma T lymphocytes in *Mycobacterium avium* infection. (1996).

Sandor, M.; Sperling, A.I.; Cook, G.A.; Weinstock, J.V.; Lynch, R.G, Bluestone, J.A.. Two waves of gamma delta T cells expressing different V delta genes are recruited into schistosome-induced liver granulomas. **J. Immunol.** Jul.1, 155(1):275-84. (1995).

Saukkonen, K.; Sande, S.; Cioffe, C. Wolpe, S. Sherry, B.; Cerami, A.E.; Twomonen, E. The role of cytokines in the generation of inflammation and tissue damage in experimental gram positive meningitis . **J. Exp. Med.** v, 171, p349. (1990).

Savioli, L.; Renganathan, E.; Montresor, A., Davis, A. & Behbehani, K. .Controle Of Schistosomiasis – A Global Picture . **Parasitology Today.** 13(11), 444-448. (1997).
Secor, E.W, Reis, M.G.; Ramos, E.; PeixotoMatos, E; Reis, E.; Carmo, T.M; Harn, D.J. Soluble intercellular adhesion molecules in human schistosomiasis: correlations with disease severity and decreased responsiveness to egg antigens. (1994).

Sher, A. Smithiers, S.R. & Mackenzie, P. Passive transfer of acquired resistance to *Schistosoma mansoni* in laboratory mice. **Parasitology** v 70, 347, (1975).

Sher, A., Coffman, R.L., Hieny, S., Scott, P. & Cheever, A.W. Interleukin 5 Is Required For The Blood And Tissue Eosinophilia But Not Granuloma Formation

Induced By Infection With *Schistosoma Mansoni*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 87: 61, (1990).

Sher ,A.; Fiorentino, D.; Caspar, P.; Pearce, E. & Mosmann, T. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes corelates with downregulation of Th1 cytokine synnthesis in helminth infection. **J. Immunol.** V. 147, p2713, (1991).

Sher, A., Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., Clerici, M., Kullberg, M., Pearce, E.J., Berzofsky, J.A., Mosmann, T.R., James, S.L. & Morse, H.C. Role Of T-Cell Derived Cytokines In The Down Regulation Of Immune Responses In Parasitic And Retroviral Infection. **Immunol. Rev.**, 127: 183, (1992).

Sidner, R.A., Carter, C.E. & Colley, D.G. Modulation Of *Schistosoma Japonicum* Pulmonary Egg Granulomas With Monoclonal Antibodies. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 36: 361, (1987).

Smithiers , L.E.; Coulson, P.S. & Wilson R.^a Monoclonal antibody to IFN-gamma modifies pulmonary inflamtory responses and abrogates immunity to *schistosoma mansoni* vaccinated with attenuated cercariae. **Ann. Trop. Parasitol.** V. 653 (1992).

Springer, T.A. & Lasky, L.A. Cell Adhesion. Sticky sugars for selectins. **Nature.** 349: 196-197. (1991).

Stenger, R.J., Warren, K.S. & Johnson, E.A. An Ultrastructural Study Of Hepatic Granulomas And Schistosome Egg Shells In Murine Hepatosplenic Schistosomiasis Mansoni. **J. Immunol.** V. 149, p 3654, (1992).

Stevens , T.; Bossie, A. Sander, V. Fernandes-Borton, R. Coffman, R. & Mosmman, T. Subsets of antigen-specific helper T cells reulate isotype secretion by antigen-specific B cells **Nature** . v 334, p255. (1988).

Subramanian, G.J.W.; Kazura, E.; Pearlman, X., Jia, I.Mallhorta & Kin, C.L. B7-2 Requirement For Helminth-Induced Granuloma Formation And Cd4 Type 2 T Helper Cell Cytokine Expression. **J. Immunol.** 158: 5914. (1997).

Todd, C.W., Goodgame, R.W. & Colley, D.G. Immune Response During Human Schistosomiasis Mansonii. V. Suppression Of Schistosome Antigen Specific Lymphocyte Blastogenesis By Adherent/Phagocytic Cells. **J. Immunol.**, 122: 1440, (1979).

Thomson, A.W.; Satch, S.; Tamura, K.; Woo, J.; Gavaler, J.; van Theil, D.H. Circulating ICAM-1 in primary biliary cirrhosis: correlations with disease severity. **J. Immunol.** 150:306A. (1993).

Toto, P.; Feliciani, C.; Amerio, P.; Suzuki, H.; Wang, B.; Shivji, G.M.; Woodley, D, Sauder, D.N. Immune modulation in pemphigus vulgaris: role of CD28 and IL-10 **J. Immunol.** Jan 1, 164(1):522-9. (2000).

Ueda Y.; Levine, B.L.; Huang. M.L.; Freeman, G.J.; Nadler, L.M.; June, C.H. & Ward, S.G. Both CD28 ligands CD80(B7-1) and CD86(B7-2) activate phosphatidylinositol 3-Kinase, are wortmannin reveals heterogeneity in the regulation of T cell IL-2 secretion. **Int. Immunol.** Jun,7(6):957-66. (1995).

Van Marck, E.A.E., Socker, S., Grimaud, J.A., Kestens, L., Gigase, P.L.H. & Deelder, A.M. The Implantation Of Sepharose Beads In Mouse Livers As An Aid In The Study Of Hepatic Schistosomal Fibrosis. **Experientia**, 36: 1116, (1980).

Van Marck, E.A., Kestens L.; Stocker S., Grimaud, J.A. Gigase, P.L., Deelder, A.M. Fibrosis Around Schistosomal Egg Antigen-Coated Beads In The Liver Of Mice. **Contrib. Microbiol. Immunol.** 7: 251-259 (1983).

Van Seventer, G.A.; Shimizu, Y.; Horgan, K.J.; Shaw, S. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important co-stimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. **J. Immunol.** 144:4579-4586. (1990).

Vella, A.T. & Pearce, E.J. The Cd4⁺ Th2 Response Induced By *S. Mansoni* Eggs Rapidly Develops Through An Early, Transient Th0-Like Stage. **J. Immunol.**, 148: 2283, (1992).

Vellupilai & Harn. Oligosaccharide-Specific Induction Of Interleukin 10 Production By B220⁺ Cells From Schistosome-Infected Mice: A Mechanism For Regulation Of Cd4⁺ T-Cell Subsets. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 91, 18. (1994).

Viana, I.R.C., Sher, A., Carvalho, O.S., Massara, C.L., Eloi-Santos, S.M., Pearce, E.J., Colley, D.G., Gazzinelli, G. & Corrêa-Oliveira, R. Interferon- γ Production By Peripheral Blood Mononuclear Cells From Residents Of An Area Endemic For *Schistosoma Mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, (1994)

Von Lichtenberg, F. Host Response To Eggs Of *S. Mansoni*. I. Granuloma Formation In The Unsensitized Laboratory Mouse. **Am. J. Pathol.**, 41: 711, (1962).

Von Lichtenberg, F. Studies On Granuloma Formation. Iii. Antigen Sequestration And Destruction In The Schistosome Pseudotubercle. **Am. J. Pathol.**, 45: 75, (1964).

Ymashita T. & Boros, D.L. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine schistosomal *S. mansoni*. **J. Immunol.** V.149, p.3659, 1(1992).

Warren, K.S. Pipe-Stem Fibrosis Of The Liver. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 66: 948, (1972).

Warren, K.S. Hepatosplenic schistosomiasis *S. mansoni*: an immunologic disease. **Bull. N.Y. Acad. Med.** 51:545. (1975).

Warren, K.S., Domingos, E.O. & Cowan, R.B.T. Granuloma Formation Around Schistosome Eggs As A Manifestation Of Delayed Hypersensitivity. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 51: 735, (1967).

Wellhausen, S.R. & Boros, D.L. Characterization And Functional Analysis Of Inflammatory Lymphocytes Isolated From Liver Granuloma Of *S. Mansoni* Infected Mice. **Fed. Proc.**, 40: 1002, (1981).

World Health Organization – Schistosomiasis Control. Who/Ctd. (1998)

Williams, M.E.; Kullberg, M.C; Barbieri, S.; Caspar, P.; Berzofsky, J.A.; Seder, R.A. & Sher, A.. Fc ϵ receptor-positive cells are a major source of an antigen-induced interleukin-4 in spleens of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Eur. J. Immunol.** V.23, p 1910, (1993).

Willians, M.E.; Montenegro, S. Domingues, A.L.; Wynn, T. A.; Teixeira, K. Mahanty, S; Coutinho, A. & Sher, A. Leukocytes of patients with *schistosoma mansoni* respond with a Th2 pattern of cytokine production to mitogen or egg but with a Th0 pattern to worm antigen. **J. Inf. Dis.** V170, p, 946. (1994).

Wynn, T.A., Eltoun, I., Cheever, A.W., Lewis, F.A., Gause, W.C. & Sher, A. Analysis Of Cytokine Mrna Expression During Primary Granuloma Formation Induced By Eggs Of *Schistosoma Mansoni*. **J. Immunol.**, 151 (3): 1430, (1993).

Wynn T.A. Cheever, A.W. Jankovic, D.; Poindexter, R.W. gaspar, P. Lewis, F.A. & Sher, A. An IL-12-based vaccination method fo preventing fibrosis induced by schistosome infection **Nature**, v 376, p 594. (1995)

Wynn, T.A., Reynolds, A.; James, S.; Cheever, A.W., Caspar, P. Hieny, S.; Jankovic D, Strand, M. & Sher, A. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to schistosomes by augmenting both humoral and cell-mediated immune responses against the parasite. **J.Immunol.** Nov. 1,157(9):4068-78. (1996).

Yamashita, T. & Boros, D.L. Il-4 Influences Il-2 Production And Granulomatous Inflammation In Murine Schistosomiasis Mansoni. **J. Immunol.**, 149 (11): 3659, (1992).

Zwingenberger, K., Hohmann, A., Cardoso De Brito, M. & Ritter, M. Impaired Balance Of Interleukin-4 And Interferon-Gamma Production In Infections With *Schistosoma Mansoni* And Intestinal Nematodes. **Scand. J. Immunol.**, 34: 243,(1991).

Zwingenberger, K., Irschick, E., Siqueira-Vergetti, J.G., Correia-Dacal, A.R., Janssen-Rosseck, R., Bienzle, U., Huber, C. & Feldmeier, H. Release Of Interleukin 2 And Gamma Interferon By Peripheral Mononuclear Cells In Human *Schistosoma Mansoni* Infection Normalizes After Chemotherapy. **Scand. J. Immunol.**, 30: 463, (1989).

10 - APÊNDICE

O estudo do granuloma *in vitro* gerou os seguintes trabalhos no Laboratório de Imunologia Celular e Molecular do CPqRR/FIOCRUZ.

Falcão, P.L.; Malaquias, L.C.C; Martins-Filho,O.A.; Silveira, A.M.; Passos, V.M.; Prata, A.; Gazzinelli, G.; Coffmann, R.L. & Corrêa-Oliveira, R. Human schistosomal manson: IL-10 modulates the *in vitro* granuloma formation. **Parasite Immunol.** 20(10), 447-454. (1998).

Falcão, P.L.¹; Oliveira, G.C.¹; Busek, S.U.¹; Malaquias, L.C.C.³, Martins-Filho, O.A.¹, Teixeira-Carvalho, A¹. Silveira, A.M.S.³. ; Caldas, I.R.¹ Coura-Filho, P.^{1,2}, Prata, A⁴; Gazzinelli, G.¹ & Corrêa-Oliveira,R¹ Human Schistosomiasis Manson: The IL-10 Modulates *In vitro* Granuloma Formation Regulating Cd28, B7-1 And B7-2 Expression. (manuscritos em preparação)

Malaquias, L.C.C.; Falcão. P.L.; Silveira, A.M.S.; Gazzinelli, G.; Prata, A.; Coffmann, R.L.; Pizziolo, V.R.; & Corrêa-Oliveira, R. Cytokine regulation of human response to *Schistosoma mansoni*: I. Analysis of the role of IL-4, IL-5, and IL-10 on peripheral blood mononuclear cells responses. **Scand. J. Immunol.** 46, 304-311. (1997).

Pemberton, R.M., Malaquias, L.C.C., Falcão, P.L., Silveira, A.M.S., Rabello, A.L.T., Katz, N., Amorin, M., Moutford, A.P., Coffman, R.L., Corrêa-Oliveira, R. & Wilson, R.A. Cell mediated immunity to schistosome: Evaluation of mechanisms operating against lung stage parasites which might be exploited in a vacine. **Trop. Geo. Med.** v.46, p.255, (1994)

Corrêa-Oliveira, R. , Malaquias, L.C.C. , Falcão, P.L., Martins-Filho, O.A., Viana, I.R.C., Silveira, A.M.S., Fraga, L.A.O., Prata, A., Coffman, R.L., Lambertucci, J.R., Cunha-Melo, J.R. & Gazzinelli, G. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research.**