



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DOS LINFÓCITOS NOS DIFERENTES  
GRAUS DE FIBROSE PERIportal SECUNDÁRIA À  
ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

**Andréia de Sousa Rocha Barreto**

**Dissertação de Mestrado**

**Salvador (Bahia), 2013**

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

B273 Barreto, Andréia de Sousa Rocha

Avaliação Fenótipica dos Linfócitos nos diferentes graus de fibrose periportal secundária a esquistossomose mansoni Salvador – BA / Andréia de Sousa Rocha Barreto. – Salvador, 2013.

87 f.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Ilma Araújo.

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Luciana Santos Cardoso

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

1. Esquistossomose. 2. Patogênese. 3. Fibrose periportal. I. Araújo, Maria Ilma. II. Cardoso, Luciana Santos. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 616.995.122



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**



**AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DOS LINFÓCITOS NOS DIFERENTES  
GRAUS DE FIBROSE PERIportal SECUNDÁRIA À  
ESQUISTOSSOMOSE MANSONI**

**Andréia de Sousa Rocha Barreto**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Ilma Araújo**

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra. Luciana Santos Cardoso**

**Dissertação apresentada ao colegiado do  
Programa de Pós-graduação em Ciências  
da Saúde, da Faculdade de Medicina da  
Universidade Federal da Bahia, como pré-  
requisito obrigatório para obtenção do grau  
de Mestre em Ciências da Saúde.**

**Salvador (Bahia), 2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**

Fundada em 18 de Fevereiro de 1808 \*

**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Largo do Terreiro de Jesus, s/n – Pelourinho**

**40026-010 Salvador, Bahia, Brasil**

Telfax: (55) (71) 3283-5582 – 3283-5567

[www.fameb.ufba.br](http://www.fameb.ufba.br)

[pos.saude@ufba.br](mailto:pos.saude@ufba.br)



**ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA  
DE DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE  
MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.**

1 Aos 14 dias do mês de março de 2013, no horário das 09:00 horas, nas dependências do  
2 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da  
3 Universidade Federal da Bahia, deu-se início à sessão pública para arguição e defesa da  
4 dissertação intitulada "AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DOS LINFÓCITOS NOS DIFERENTES  
5 GRAUS DE FIBROSE PERIportal SECUNDÁRIA À ESQUISTOSSOMOSE MANSONI"  
6 apresentada pela pós-graduanda **Andréia de Sousa Rocha Barreto**. A Comissão Examinadora  
7 aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, conforme o que  
8 estabelecem o Regulamento Geral dos Cursos de Pós-Graduação da Universidade Federal da  
9 Bahia e o Regimento do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de  
10 Medicina da Bahia, foi composta por: Profa. Dra. Maria Olívia Ramos Bacellar, Doutora em  
11 Imunologia - UFBA (Presidente); Prof. Dr. Artur Gomes Dias Lima, Doutor em Biologia  
12 Parasitária – FIOCRUZ; Profa. Dra. Karina Conceição Gomes Machado de Araújo, Doutora em  
13 Saúde Pública – UFS e Profa. Dra. Maria Ilma Araújo, Doutora em Biologia Celular e  
14 Molecular – UFBA (suplente). Após a apresentação da dissertação, a Comissão Examinadora  
15 realizou a arguição que foi respondida *satisfatoriamente* (satisfatoriamente ou  
16 insatisfatoriamente) pela mestrand. A dissertação apresentada foi considerada  
17 *aprovada* (aprovada ou reprovada). E, para constar do processo de conclusão de  
18 curso e de colação de grau<sup>1</sup>, a Comissão Examinadora lavrou a presente Ata que é assinada por  
19 todos os seus membros. A Comissão Examinadora aprova a dissertação:

20  Com recomendações que devem ser incorporadas à versão final da dissertação.

21  Sem recomendações de modificações da versão final.

22 **Será dado prazo máximo de 60 (sessenta) dias para entrega da versão final de modo a ser**  
23 **concluído o processo de outorga do título de mestre.**

24 Assinaturas dos Membros da Banca Examinadora:

25 *M. Bacellar*

26 Maria Olívia Ramos Bacellar (Presidente)

27 *Artur Gomes Dias Lima*

28 Artur Gomes Dias Lima

29 *Karina Conceição Gomes Machado de Araújo*

30 Karina Conceição Gomes Machado de Araújo

31 *Maria Ilma Araújo*

32 Maria Ilma Araújo (Suplente)

33 Ata Aprovada na Sessão do dia 14/03/2013

34  
35 <sup>1</sup> A emissão do diploma e do histórico escolar está condicionada à entrega, na Secretaria Acadêmica do  
36 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, de quatro exemplares impressos da dissertação,  
37 acompanhados de 4 versões completas em meio eletrônico (formato pdf) no **prazo máximo de 60 dias**.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### **MEMBROS TITULARES:**

- Maria Olívia Amado Ramos Bacellar - Doutora em Imunologia, Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e pesquisadora associada do Serviço de Imunologia da UFBA.

- Karina Conceição Gomes Machado de Araújo - Doutora em Saúde Pública, Professora de Anatomia Humana e Neuroanatomia da Universidade Federal de Sergipe (UFSE) - Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária (PROBP/UFS).

- Artur Gomes Dias Lima - Doutor em Biologia Parasitária, Professor Titular e membro efetivo do Comitê de Ética em Pesquisa e do Comitê de Iniciação Científica da Universidade Estadual da Bahia (UNEB) e Professor Adjunto da Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP).

### **MEMBROS SUPLENTE**

Maria Ilma Araujo- (Professora - orientadora) - Doutora em Imunologia, Professora do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA), pesquisadora associada do Serviço de Imunologia da UFBA e Professora Adjunta da Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP).

.

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

- *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq*
- *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais - INCT-DT*
- *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES  
(bolsa de estudos)*

*“Quero, um dia, dizer às pessoas que nada foi em vão...  
Que o amor existe, que vale a pena se doar às amizades e às pessoas, que a  
vida é bela sim e que eu sempre dei o melhor de mim...  
e que valeu a pena”.*

*(Mario Quintana)*

*Dedico a Deus todo poderoso,  
A minha mãe símbolo de amor eterno e muita dedicação, ao meu querido irmão  
pelo apoio e carinho constantes e a meu pai (in memoriam) pelos ensinamentos  
baseados em respeito e honestidade, deixados como herança.*

## AGRADECIMENTOS

**A minha querida orientadora Prof<sup>a</sup>. Maria Ilma Araújo**, um exemplo de pessoa e pesquisadora, possuidora de um conhecimento admirável, respeito aos valores humanos e humildade, são algumas de suas qualidades, apaixonada pelo que faz, não mede esforços para ensinar e ajudar ao próximo, me deu uma oportunidade de crescimento profissional, sinto orgulho de ser sua aluna, serei eternamente grata por tudo. UM MUITO OBRIGADO.

**A Prof<sup>a</sup> Co-orientadora Luciana Santos Cardoso** pela colaboração nas análises dos experimentos em citometria de fluxo e confecção dos gráficos, essenciais para a conclusão do meu trabalho.

**Ao colega Adriano Queiroz**, que deu início a tudo, quando me informou do processo seletivo. UM MUITO OBRIGADO

**Aos colegas do Laboratório de Alergia e Helminíase Giuseppe Tittoni, Rafael Jabar, Aline Báfica, Ricardo Riccio, Jamile Fernandes, Diego Mota, Maria Cecília, Gilvaneide Lima e Luciane Lima** pelos bons momentos de convivência e apoio ao projeto.

**Ao colega Robson Souza**, aliás, mais do que colega: **um amigo**, que me acompanhou durante toda a construção da escrita deste trabalho, pelas palavras de positivismo, nunca me deixou desistir, pelos momentos de alegria e risos, sou imensamente grata. UM MUITO OBRIGADO

**As colegas de turma Juliana, Viviane, Silvana e Graça** pela maravilhosa convivência, foi fundamental para meu sucesso.

**Em especial a minha colega de turma e amiga Rubia**, que desde as aulas, sempre esteve ao meu lado, me ajudando com as dificuldades nas disciplinas, inclusive aos sábados e domingos no laboratório do Serviço de Imunologia (SIM) quando nos reuníamos para estudar e também pela colaboração na formatação do trabalho. UM MUITO OBRIGADO.

**Aos colegas, funcionários e professores do Serviço de Imunologia – HUPES**, pela agradável convivência ao longo destes dois anos e meio.

**Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – PPgCS**, Pela qualidade dos professores, infra-estrutura, pesquisadores e funcionários.

**A Secretaria do PPgCS, Ana Cibele Barbosa** - pela atenção, responsabilidade e disponibilidade das informações tão necessárias para a conclusão do curso.

**As comunidades de Água Preta – Gandu/Bahia e Conde/Bahia** – Que apesar das dificuldades socioeconômicas, contribuíram muito para a realização deste trabalho. Em especial a Agente de Saúde local Irene (Gandú), Ada, Luciana e Aline (Conde).

**Aos pacientes**, pois sem eles a pesquisa não teria sentido.

**A todos os professores do programa, e em especial** aos professores Silvano Neto, Paulo Machado, Olivia Bacelar, Jamarly Oliveira Filho, Albert Schriefer e Ricardo Riccio pela contribuição científica na minha vida acadêmica.

**A bibliotecária da Faculdade de Medicina da UFBA**, Cida Neves, por ter colaborado com a ficha catalográfica.

**Aos Órgãos Financiadores**, fundamentais para a realização deste trabalho.

**Ao Professor Edgar Carvalho**, Coordenador do Serviço de Imunologia do HUPES, pelo excelente trabalho desenvolvido, nos proporcionando um ambiente diverso, em várias áreas de conhecimento científico.

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| INDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS  | 10 |
| INDICE DE FIGURAS  | 12 |
| INDICE DE TABELAS  | 13 |
| <b>I. RESUMO</b>   | 14 |
| <b>II. OBJETIVOS</b>   | 15 |
| II. 1 Objetivo Geral   | 15 |
| II. 2 Objetivo Específicos   | 15 |
| <b>III. INTRODUÇÃO</b>   | 16 |
| <b>IV. REFERENCIAL TEÓRICO</b>   | 18 |
| IV.1 Aspectos epidemiológicos da Esquistossomose.  | 18 |
| IV.2 Transmissão e formas clínicas da Esquistossomose.   | 19 |
| IV.3 Imunopatogênese na esquistossomose.   | 21 |
| <b>V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS</b>   | 25 |
| V.1 Área endêmica em Esquistossomose   | 25 |
| V.2 Desenho de estudo e caracterização da população  | 27 |
| <b>V.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO</b>   | 28 |
| <b>V.4 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO</b>   | 28 |
| <b>V.5 METODOLOGIA</b>   | 28 |
| V.5.1 Exame parasitológico de fezes  | 28 |
| V.5.2 Avaliação do grau de fibrose periportal - Ultrassonografia (USG) de abdome superior e classificação do grau de fibrose periportal. | 29 |
| V.5.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)  | 29 |
| V.5.4 Marcação dos fenótipos de linfócitos - <i>Ex vivo</i>  | 30 |
| V.5.5 Fluxograma   | 31 |
| <b>V.6 ANÁLISES DOS DADOS</b>  | 32 |
| <b>V.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS DA PESQUISA</b>  | 32 |
| <b>VI. ARTIGO</b>  | 33 |
| <b>VII. RESULTADOS</b>   | 58 |

|  |    |
|--|----|
| <b>VIII. RESUMO DOS RESULTADOS</b>     | 65 |
| <b>IX. DISCUSSÃO</b>                   | 66 |
| <b>X. CONCLUSÃO</b>                    | 73 |
| <b>XI. SUMMARY</b>                     | 74 |
| <b>XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> | 75 |

**XIII. ANEXOS**

**Anexo 1- Ficha ultra-sonográfica**

**Anexo 2- Parecer do Comitê de Ética**

**Anexo 3- Termo de Consentimento livre e esclarecido**

**Anexo 4- Termo de Consentimento livre e esclarecido para menores de 18 anos**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|               |   |
|---------------|---|
| <b>B7-1</b>   | Ligante da molécula co-estimulatória CD28, expresso na superfície de linfócitos B, macrófagos/ monócitos (CD80) |
| <b>B7-2</b>   | Ligante da molécula co-estimulatória CD28, expresso na superfície de linfócitos B, macrófagos/ monócitos (CD86) |
| <b>BSA</b>    | Albumina Bovina Sérica  |
| <b>CAA</b>    | Células Apresentadoras de Antígenos   |
| <b>CD3</b>    | Marcador de superfície para linfócitos T  |
| <b>CD4</b>    | Co-receptor para moléculas do complexo de histocompatibilidade principal de classe II.                          |
| <b>CD8</b>    | Co-receptor para MHC de classe I.   |
| <b>CD25</b>   | Marcador de ativação em leucócitos  |
| <b>CD28</b>   | Molécula co-estimuladora de linfócitos  |
| <b>CD69</b>   | Molécula associada à ativação de linfócitos   |
| <b>CTLA-4</b> | Antígeno 4 de linfócito T Citotóxico. Molécula associada à inibição linfocitária                                |
| <b>CMSP</b>   | Células mononucleares do sangue periférico  |
| <b>FI</b>     | Fibrose Incipiente  |
| <b>FMG</b>    | Fibrose Moderada a Grave  |
| <b>FITC</b>   | Isotiocianato de fluoresceína   |
| <b>Foxp3</b>  | Fator de transcrição de células T regulatórias  |
| <b>FSC</b>    | Tamanho da célula (do inglês <i>Forward Scatter</i> )   |
| <b>MHC II</b> | Complexo Principal de Histocompatibilidade II   |
| <b>MS</b>     | Ministério da Saúde   |
| <b>OMS</b>    | Organização Mundial de Saúde  |
| <b>PBS</b>    | Tampão Fosfato Salínico   |
| <b>PE</b>     | Ficoeritrina  |
| <b>PeCy7</b>  | Estreptavidina  |
| <b>PercP</b>  | Proteína Clorofila Piridinina   |
| <b>SF</b>     | Sem Fibrose   |
| <b>SSC</b>    | Granulosidade da célula (do inglês <i>Side Scatter</i> )  |
| <b>SVS</b>    | Secretaria de Vigilância em Saúde   |

|             |   |
|-------------|---|
| <b>TCR</b>  | Receptor de Células T   |
| <b>Th1</b>  | Linfócito T auxiliar 1  |
| <b>Th2</b>  | Linfócito T auxiliar 2  |
| <b>Treg</b> | Células T reguladoras   |
| <b>WHO</b>  | Organização Mundial de Saúde (do inglês: <i>World Health Organization</i> ) |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .                                | 20 |
| Figura 2. Granuloma hepático (A) e granuloma com fibrose (B) na Esquistossomose mansoni. | 22 |
| Figura 3. Sinapse imunológica para apresentação de antígenos e ativação das células T    | 24 |
| Figura 4. Mapa da localidade de Gandu  | 26 |
| Figura 5. Habitantes de Água Preta utilizando a água do rio                              | 27 |
| Figura 6. Frequência da população de linfócitos  | 30 |

## ÍNDICE DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1. Caracterização dos indivíduos infectados pelo <i>S. mansoni</i> . | 58 |
|---|----|

## I. RESUMO

A esquistossomose assume o segundo lugar em importância clínica e epidemiológica dentre as doenças parasitárias no mundo. A resposta imune do hospedeiro é considerada essencial na proteção e na patogênese da doença. A fase crônica é caracterizada pela produção de citocinas Th2, sendo as mesmas associadas ao desenvolvimento de fibrose periportal. Pouco se sabe sobre o fenotipo e o grau de ativação dos diferentes subtipos de células T no processo de fibrose. **Objetivo:** avaliar o fenótipo e o grau de ativação dos linfócitos T em pacientes esquistossomóticos com fibrose periportal. **Método:** Estudo de corte transversal, realizado no povoado de Água Preta, Gandu-Bahia, incluindo 37 indivíduos com fibrose periportal determinado por ultrassonografia. Quinze deles apresentavam fibrose incipiente, sete apresentavam fibrose moderada a grave e quinze não apresentavam fibrose. Células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por gradiente de Ficcol-hypaque e a frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e a expressão dos marcadores de superfície CD28, CD69, CD25 e CTLA-4 foram determinadas por citometria de fluxo. **Resultados:** Não houve diferença significativa na frequência das células TCD4<sup>+</sup> entre os pacientes com diferentes graus de fibrose periportal, entretanto, os indivíduos com fibrose moderada e grave apresentaram uma frequência menor de células TCD8<sup>+</sup>, comparados aos indivíduos sem fibrose ou com fibrose incipiente. A frequência de células TCD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup>, bem como de células TCD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> foi maior no grupo de pacientes com fibrose incipiente, em comparação com aqueles sem fibrose. Em relação à frequência das células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>Low</sup>, não houve diferença significativa entre os grupos de pacientes, entretanto, os indivíduos com fibrose moderada a grave apresentaram uma menor frequência de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> comparados àqueles sem fibrose ou com fibrose incipiente. A frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> em indivíduos com fibrose moderada a grave foi também menor em relação aos indivíduos sem fibrose ou com fibrose incipiente. **Conclusão:** A alta frequência de células T ativadas nos pacientes com fibrose indica que estas células devem participar do processo de formação da fibrose periportal. Adicionalmente, a menor frequência de células T com o perfil regulatório nos pacientes com fibrose moderada a grave reforça a hipótese de uma falta de regulação da resposta imune nestes pacientes.

**Palavras-chave:** Esquistossomose, patogênese, fibrose periportal, linfócitos T.

## II. OBJETIVOS

### II. 1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o fenótipo e o grau de ativação dos linfócitos T em pacientes com diferentes graus de fibrose periportal secundária a esquistossomose.

### II. 2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Em indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal secundária à esquistossomose, avaliar:

II. 2.1 A frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>

II. 2.2 O grau de ativação das células T, através da expressão dos marcadores de superfície celular CD28, CD69, CD25 e CD152 (CTLA-4).

## II INTRODUÇÃO

A esquistossomose acomete cerca de 200 milhões de pessoas no mundo, sendo que no Brasil existem aproximadamente 25 milhões de indivíduos que vivem em áreas de risco e cerca de 4 a 6 milhões de infectados, sendo o país de maior número de pessoas infectadas das Américas (Lambertucci, 2010). A espécie encontrada no Brasil é o *Schistosoma mansoni*. Os vermes adultos do parasito habitam o sistema porto-mesentérico humano, onde põem os ovos nos capilares intestinais, que podem ganhar a circulação porto-hepática e alcançar os espaços porta, levando à formação de granulomas. Estes são caracterizados pela reação inflamatória aos antígenos do ovo, seguida da produção de colágeno, podendo evoluir para forma grave da doença. Cerca de 5 a 10% dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* evoluem para a forma grave, caracterizada por fibrose periportal e hipertensão portal, ascite e varizes esofágicas e gástricas, que podem complicar com hemorragias digestivas e morte (Bina 1997; Henri, Chevillard et al. 2002; Bina and Prata 2003).

O desenvolvimento de fibrose periportal é um processo lento, que depende de fatores genéticos, ambientais, carga parasitária e também da resposta imunológica dos indivíduos infectados. O papel das citocinas produzidas por células T tem sido bastante estudado, mas o perfil destas células e o grau de ativação deve também influenciar na formação do granuloma e evolução para fibrose.

No início dos anos 1970, ocorreram as primeiras descrições da existência de células especializadas na regulação da resposta imune, algumas células TCD4<sup>+</sup> que expressavam a cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2 (CD25) com capacidade de suprimir o desenvolvimento de doenças autoimune, bem como células T que expressavam a molécula CD152, também conhecida como CTLA-4, um receptor de proteína de baixa regulação, que é encontrado nas superfícies das células T (Cruvinel 2008). Entretanto, pouco se sabe ainda sobre a participação dos diferentes tipos de células T e sobre o grau de

ativação dessas células, no processo de formação da fibrose. Faz-se necessário, portanto, o estudo do fenótipo das células T em pacientes com fibrose periportal secundária a esquistossomose.

## IV. REFERENCIAL TEÓRICO

### IV.1 Aspectos epidemiológicos da esquistossomose

A esquistossomose é a segunda doença parasitária em termos de importância sócio-econômica e de saúde pública em áreas tropicais e subtropicais. É uma doença crônica e debilitante causada por parasitos do gênero *Schistosoma*, que afeta cerca de 230 milhões de pessoas em todo o mundo. A doença tem sido citada em 77 países. Sendo que o maior risco de infecção ocorre em 52 países. Através de uma parceria da Organização Mundial da Saúde e o setor privado em defesa da utilização do Praziquantel, conseguiram a implementação quimioterápica preventiva em pelo menos 28 países no ano de 2010, desta forma, o número de indivíduos tratados para esquistossomose subiu de 12,4 milhões em 2006, para 33,5 milhões em 2010. São conhecidas como as principais formas da esquistossomose a forma intestinal, a forma hepatointestinal e hepatoesplênica causadas pelos gêneros: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma guianensis* e afins, e *S. intercalatum* e a forma urogenital, causada pelo gênero *Schistosoma haematobium* (Prata 1984; WHO and Health 2013).

Segundo dados da Secretaria de Vigilância Epidemiológica do Ministério da Saúde, o Brasil é o país com maior número de áreas endêmicas da América do Sul, possuindo 19 unidades federadas, e entre estas, o Nordeste, apresenta maior casuística da doença. O estado da Bahia é a segunda maior área endêmica, com média de 165,8 internações/ano e 40,2 óbitos/ano notificados em 65% (271/417) dos seus municípios (Brasil and Saúde 2010). Embora tenha ocorrido uma diminuição da esquistossomose no Brasil nos últimos anos, as doenças parasitárias ainda são relevantes causas de morbimortalidade, causando grande impacto social, e estão associadas a condições habitacionais e de higiene e bem como, condições nutricionais, deste modo considera-se relevante um estudo mais minucioso sobre o problema (Vidal, 2011).

## IV. 2 Transmissão e formas clínicas da esquistossomose

O ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni* é complexo, dividido em duas fases: uma que ocorre no hospedeiro definitivo (vertebrado: homem) e outra no hospedeiro intermediário (invertebrado: caramujo). Depois que atravessam a mucosa intestinal e serem evacuados com as fezes, os ovos; que alcançam coleções hídricas em tempo hábil e sob condições climáticas e ambientais favoráveis, eclodem e liberam suas larvas chamadas miracídios. Estas nadam em círculos durante algumas horas até encontrar moluscos aquáticos, o hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria*. Após a penetração no molusco, o miracídio perde parte de suas estruturas, e após 48 horas - ocorre uma transformação morfológica, resultando em esporocisto, e este, no interior do corpo do molusco, sofre completa reorganização estrutural por descamação do seu epitélio ciliado. Após novo processo de diferenciação forma-se a segunda geração de esporocistos ou da fase larvária seguinte denominada rédia, esporocistos secundários ou esporocistos filhos, e finalmente surge a fase infectante denominada cercária (Figura 1). Na pele do homem, a penetração se completa por uma ação lítica e mecânica originada pelos movimentos intensos da larva, ocorrendo num tempo aproximado de 15 minutos, onde nesta fase a cercária perde sua cauda, após atravessar a pele, e passa a ser chamada de esquistossômulo (Katz, 2003; Ministério da Saúde/SVS, 2009).

O esquistossômulo representa a fase juvenil do verme adulto (macho ou fêmea) e completa seu desenvolvimento, quando alcança, no organismo do hospedeiro vertebrado, o meio adequado para seu completo amadurecimento. Os vermes adultos do *S. mansoni* migram para as veias mesentéricas, e liberam grande número de ovos por dia. Partes destes ficam retidas a microvasculatura do fígado onde induzem uma grande resposta inflamatória e granulomatosa, que pode evoluir para fibrose, hipertensão portal, desenvolvimento de varizes esofágicas e gástricas, e bem como, sangramentos graves que podem levar a óbito (Wynn 2007; Oliveira. C.D., 2009).

Clinicamente a esquistossomose pode ser classificada em fase aguda e crônica. A esquistossomose aguda ou febre de Katayama, ocorre após cerca de três a sete semanas da exposição ao helminto e caracteriza-se por anorexia, dor abdominal, febre e cefaleia, e em menor frequência tosse seca, diarreias, náuseas e vômitos. Ainda pode-se notar ao exame clínico aumento do tamanho do fígado e baço. Esta fase é difícil de ser identificada, porém, com a liberação dos ovos nas fezes, evidencia-se a doença em sua fase aguda (Lambertucci, 2010).

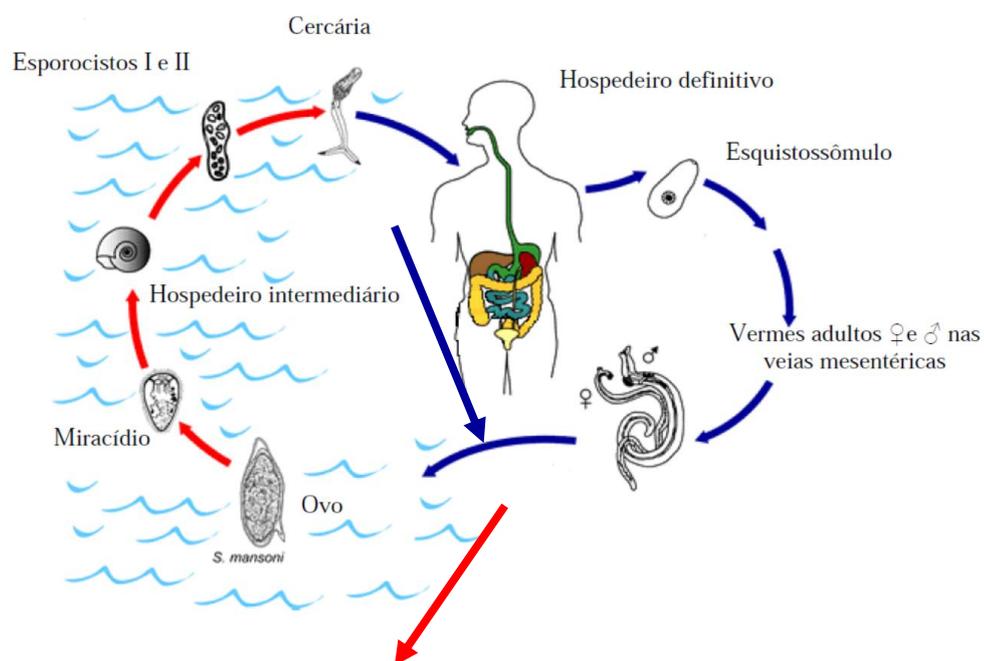


Figura 1 – Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*  
Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/> (CDC and Prevention 2013)

A partir da 3<sup>a</sup>. a 7<sup>a</sup>. semanas após a infecção, a doença começa a cronificar, podendo evoluir por muitos anos. Surgem sintomas de evolução da patologia com acometimento de vários órgãos, com níveis extremos de gravidade, a exemplo do comprometimento pulmonar, com sintomas e alterações radiológicas que podem ser variáveis. A migração dos ovos do sistema porta, passa pelos pulmões que podem ser acometidos pela migração de ovos do sistema porta para o sistema arterial e pulmonar (através de anastomoses porto-sistêmicas). O comprometimento do parênquima pulmonar é caracterizado principalmente pela formação de reação granulomatosa aos

ovos do *S. mansoni*. Os granulomas não têm sede preferencial, podem ser encontrados em todos os segmentos pulmonares e pleura (Oliveira, C.D., 2009).

As formas crônicas são divididas em: Tipo I ou intestinal, que pode ser assintomática, com episódios de diarréias repetidas, muco-sanguinolentas, com dor ou desconforto abdominal. Tipo II ou forma hepatointestinal, que pode cursar com diarréia, epigastria, hepatomegalia, podendo ser detectadas nodulações à palpação do fígado, a do Tipo III ou forma hepatoesplênica compensada, com evidente hepatoesplenomegalia, hipertensão portal com formação de varizes de esôfago. A tipo IV ou forma hepatoesplênica descompensada é considerada uma das formas mais graves, o fígado se mostra volumoso ou contraído devido a fibrose, há um aumento do baço com formação de ascite, varizes de esôfago, hematêmese, anemia e desnutrição (Ministério da Saúde/SVS, 2009).

#### **IV. 3 Imunopatogênese da esquistossomose**

A resposta imune aos helmintos ocorre de forma múltipla, devido ao metabolismo diverso destes parasitas. No período compreendido entre a 3ª e 5ª semanas da infecção o hospedeiro é exposto a migração de parasitas imaturos, a resposta dominante é do tipo Th1. Os parasitas amadurecem, acasalam e começam a produzir ovos e na semana 5-6, a resposta se altera acentuadamente, o componente Th1 diminui, ou seja, está associada com o aparecimento de uma forte resposta Th2, resposta esta, induzida pelos antígenos do ovo e pela capacidade do *S. mansoni* de utilizar alguns mecanismos de escape, como a assimilação de antígenos do hospedeiro, em seu tegumento, o que permite a sua sobrevivência por vários anos no hospedeiro (MacDonald, Patton et al. 2002; Machado 2004).

A fase aguda da esquistossomose ocorre entre trinta e sessenta dias após a penetração das cercarias durante o contato com fontes hídricas naturais e de água doce contaminada. Esta fase caracteriza-se por astenia, mialgia, febre contínua com duração variando de três a quarenta dias, calafrios e perda

de peso (Carvalho, Coelho et al. 2008). Está associada ao percurso realizado pelos esquistossômulos nos pulmões e com a ativação da resposta imunológica ao verme adulto, e pós ovoposição e liberação de antígenos do ovo. A fase aguda é sintomática, e dificilmente demonstrada em indivíduos residentes em área endêmica, todavia, é mais comum em pessoas que pela primeira vez, foram expostas a infecção (Lambertucci 1993; Lambertucci, Rayes et al. 1997; de Jesus, Silva et al. 2002; Wynn 2004).

A fibrose é definida pelo crescimento excessivo com cicatrização do tecido e é atribuída ao excesso de deposição de componentes de matriz extracelular, incluindo colágeno (Wynn 2008). Ela representa o resultado final das reações inflamatórias crônicas induzidas, no caso da esquistossomose, por uma variedade de estímulos provenientes dos antígenos dos ovos do parasita, que resulta na formação do granuloma em torno dos ovos (Figura 2 A). A fibrose tecidual (cicatriz) é uma das principais causas de morbidade e mortalidade da esquistossomose. Consequência de uma interação entre as secreções liberadas pelo miracídio e a resposta do hospedeiro. Esta fibrose pode ser representada por pequenas áreas focais de inflamação crônica e excesso de matriz extracelular (Figura 2 B), distribuídas no sistema porta intra-hepático (Andrade, 2009).

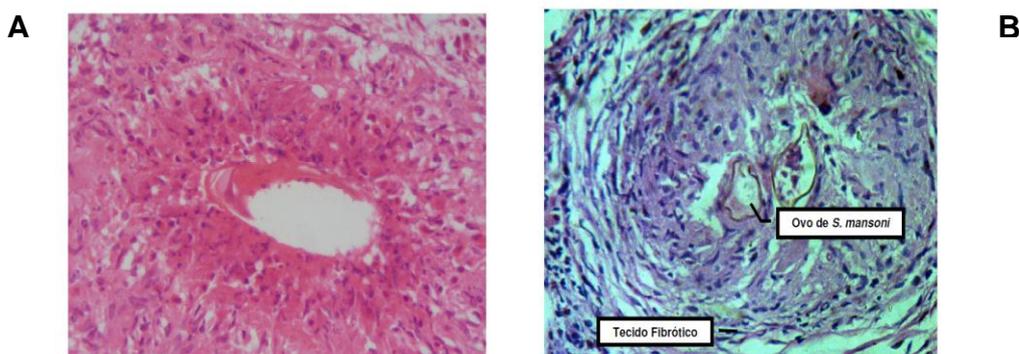


FIGURA 2 – Granuloma hepático (A) e granuloma com fibrose (B) na Esquistossomose mansoni. Fonte:Gentilmente cedido pelo professor Moyses Sadigursky – Serviço de Patologia – HUPES–UFBA.

O processo inflamatório pode evoluir para fibrose grave, diminuindo o fluxo sanguíneo e levando a hipertensão portal, tendo como consequência a

hepatoesplenomegalia, formação de varizes esofágicas e gástricas que podem evoluir para hemorragia e até mesmo ao óbito. (Wynn 2004; Baptista and Andrade 2005; Wynn 2007). O exame ultrassonográfico é considerado uma importante ferramenta na avaliação das formas clínicas da esquistossomose, sendo utilizado em áreas endêmicas para doença (Cerri, Alves et al. 1984; Abdel-Wahab, Esmat et al. 1992). Existe uma padronização dos protocolos da ultrassonografia, tendo sido utilizado neste estudo o método desenvolvido pelo *Cairo Working Group* em 1992. Nesta classificação leva-se em conta o grau de fibrose periportal, medido pela espessura da veia porta, sendo que uma nova classificação tem sido utilizada, na qual além da medida da espessura dos espaços periportais, foi adicionada uma análise qualitativa para graduar a fibrose periportal, comparando-se padrões de acometimento da fibrose (Niamey Working Group, 2000).

De um modo geral, as respostas imunológicas são iniciadas quando células TCD4<sup>+</sup> ou TCD8<sup>+</sup> virgens maduras encontram uma célula apresentadora de antígeno adequadamente ativada, apresentando o ligante peptídico. Elas são ativadas após o reconhecimento do peptídeo específico do patógeno que é apresentado por uma célula apresentadora no contexto do MHC de classe I, no caso das células TCD8<sup>+</sup> ou classe II, no caso das células TCD4<sup>+</sup>. Para que ocorra a ativação celular é também necessário que as células apresentadoras de antígenos expressem moléculas co-estimulatórias, a exemplo da CD28, que se liga ao CD80 e CD86 na célula apresentadora. A molécula CTLA-4 também expressa em linfócitos pode competir com a CD28 pela ligação ao CD80 e CD86 limitando a resposta imune (Figura 3) (Shape & Freeman, 2002 ; Tsuyuki, Tsuyuki et al. 1997). Estas células, uma vez reconhecendo o antígeno, podem se diferenciar nos subtipos classicamente descritos, Th1 e Th2, mas também em Th17 e T reguladora (Treg), tendo essa última atividade inibitória da resposta imune (Bluestone and Abbas 2003; Cruvinel 2008; Fossiez et al. 1996).

A resposta regulatória exercida por essas células pode decorrer da síntese de citocinas a exemplo da IL-10 e TGF- $\beta$ , mas também através da

expressão CTLA-4, que removem as moléculas CD80 e CD86 presentes na superfície das células apresentadoras, internalizando-as e degradando-as nas vesículas lisossomais. Ao perder CD80/CD86, essas células apresentadoras tornam-se incapazes de fornecer o sinal co-estimulatório às células T efetoras via CD28. Neste contexto, células T reguladoras que expressam a cadeia alfa do receptor de IL-2 ( $CD4^+CD25^+$ ) apresentaram grande capacidade de capturar CD80/CD86, surgindo aí, mais um possível modelo de atuação destas células, no qual o CTLA-4 é principal moderador (Qureshi,2011; Zhang et al. 2000).

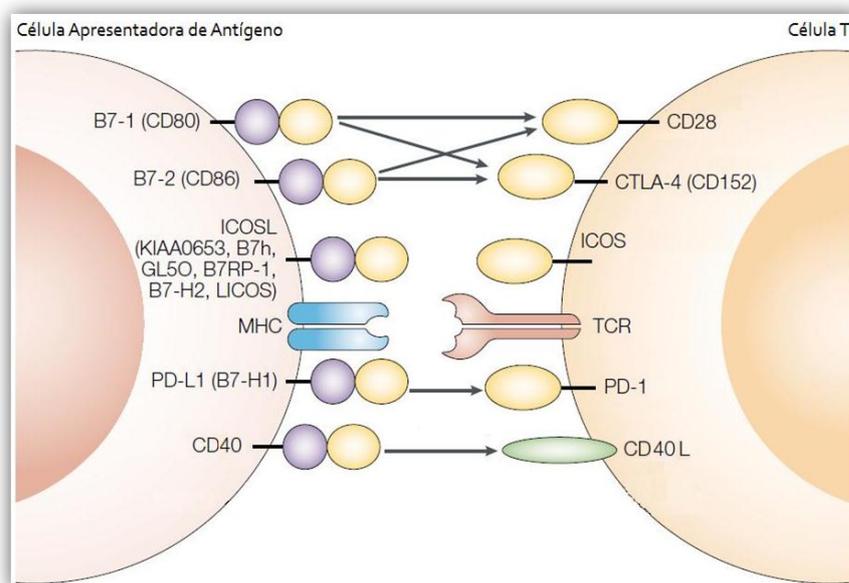


Figura 3 - Sinapse imunológica para apresentação de antígenos e ativação das células .  
Fonte: Shape & Freeman, 2002 (adaptado).

Em relação a participação das citocinas na patogênese da esquistossomose, estudos demonstraram o envolvimento das citocinas do padrão Th2, IL-4, IL-5 e IL-13 na formação do granuloma e evolução para fibrose hepática (De Jesus, Miranda et al. 2000; Chiaramonte, Cheever et al. 2001).

Fallon e colaboradores (2000), utilizando modelos murinos transgênicos ou deficientes das citocinas IL-4 e IL-13 demonstraram que a IL-4 determina o desenvolvimento da resposta granulomatosa, enquanto a IL-13 constitui a citocina pró-fibrótica associada ao desenvolvimento da fibrose hepática

induzida pelo *S. mansoni* (Fallon, Richardson et al. 2000). Além dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>, vários tipos celulares, tais como, eosinófilos, basófilos, mastócitos e células *natural killer* (NK) representam fontes importantes de IL-4 (Borish and Steinke 2003). Tanto em eosinófilos quanto em basófilos, esta citocina é armazenada sobre a forma pré-formada de peptídeos-associados a grânulos e podem ser rapidamente liberadas em respostas inflamatórias do tipo Th2. A IL-4 atua estimulando a expressão de moléculas de MHC de classe II, B7, CD40, IgM de superfície e a expressão de receptores de baixa afinidade (CD23) em células B, contribuindo para a capacidade de apresentação de antígenos por essas células, além de promover a mudança de produção de isotipos de anticorpos IgM para IgE (Romagnani, 1990). A IL-5 é também considerada um dos mais importantes mediadores da reação granulomatosa na esquistossomose, uma vez que participa do processo de maturação e aumento da sobrevivência dos eosinófilos inibindo o seu processo de apoptose. A IL-5 atua também, como quimiotático para eosinófilos que migrando para o granuloma estimula a secreção de mediadores associados ao processo de citotoxicidade e dano tecidual (Rumbley, Sugaya et al. 1999; Contigli, C., D. N. Silva-Teixeira, et al. 1999).

Enquanto que o papel das citocinas na formação do granuloma e desenvolvimento da fibrose periportal têm sido bastante avaliados, pouco se sabe sobre as funções das moléculas associadas à ativação celular e sobre a regulação da resposta imune no processo de fibrose. Neste estudo foi então avaliado o fenótipo e o grau de ativação dos linfócitos T em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* apresentando diferentes graus de fibrose periportal. A nossa hipótese foi que o processo de formação da fibrose periportal na esquistossomose está associado a uma diminuição da regulação das células T.



seguido por *Trichuris trichiura*, *Ascaris lumbricoides*, Ancilostomídeos e *Strongyloides stercoralis* cujas frequências foram, respectivamente, 43,4%, 37,4%, 33,7% e 3,5% (Souza, Cardoso et al. 2012).



Figura 5 - Habitantes de Água Preta utilizando a água do rio, única fonte hídrica da região.

## V.2 Desenho do estudo e caracterização da população

Trata-se de um estudo de corte transversal, parte de um projeto que avaliou a frequência de fibrose periportal na área endêmica de Água Preta, município de Gandu-Bahia. O cálculo do tamanho amostral para o estudo da resposta imune foi realizado assumindo uma diferença média de um desvio padrão entre os grupos e o poder de 0.80 para se obter diferenças significativas com IC de 95%, sendo necessário no mínimo 15 pacientes por grupo.

Foram analisados quinze pacientes com o grau 0 (sem fibrose), quinze pacientes com grau I (fibrose incipiente) e apenas sete com fibrose graus II e III (fibrose moderada e grave), pela dificuldade em se encontrar pacientes em graus avançados de fibrose na região do estudo.

### **V.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Foram selecionados os primeiros 15 indivíduos infectados pelo *S. mansoni* de ambos os sexos, entre 10 e 70 anos de idade, com fibrose periportal e com fibrose incipiente que atenderam ao recrutamento para participar do estudo. Todos os pacientes com fibrose moderada a grave identificados na área, na faixa etária entre 10 e 70 anos foram convidados e aceitaram participar do estudo.

### **V.4 CRITÉRIOS DE NÃO INCLUSÃO**

Não foram admitidos no estudo indivíduos com idade inferior a 10 anos e superior a 70 anos, pela possibilidade de alteração da resposta imune em faixas extremas de idade. Mulheres grávidas, indivíduos alcoólatras e portadores de doenças que pudessem interferir com os resultados da avaliação da resposta imune, a exemplo das hepatites B e C, diabetes melitus, HIV e HTLV também não foram incluídos no estudo.

### **V.5 METODOLOGIA**

#### **V.5.1 Exame parasitológico de fezes**

Os indivíduos selecionados tiveram amostras de fezes analisadas através da técnica de sedimentação espontânea - Hoffmann-Pons-Janer ou método de Lutz, para a determinação da infecção parasitária e através da técnica de Kato-Katz (Katz, Coelho et al, 1970), para a determinação da carga parasitária dos helmintos.

### **V.5.2 Avaliação do grau de fibrose periportal através da Ultrassonografia (USG) de abdome superior e classificação do grau de fibrose periportal**

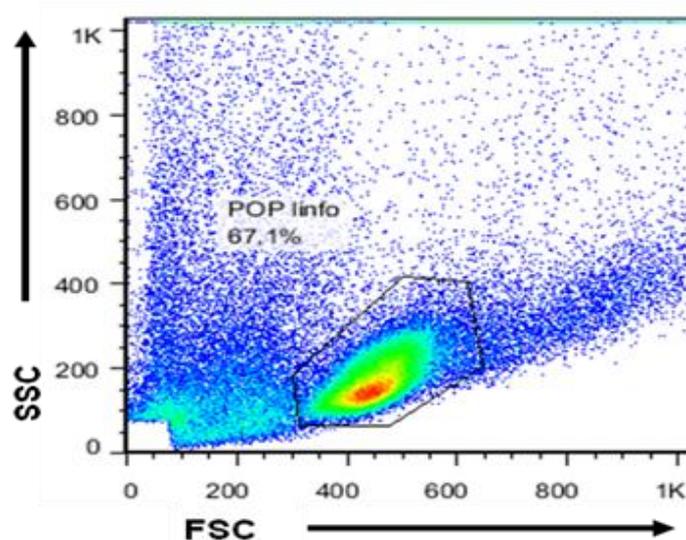
As ultrassonografias de abdome superior visando principalmente avaliar a existência de hepatomegalia e esplenomegalia, e o grau de fibrose periportal foram realizadas por um profissional especializado (Souza, Cardoso et al. 2012). Na determinação do grau de fibrose periportal, utilizaram-se critérios recomendados pela Organização Mundial da Saúde (Abdel-Wahab, Esmat et al. 1992; De Jesus, Miranda et al. 2000; Lambertucci 2010). Esta classificação leva em consideração o valor médio do diâmetro da veia porta dos quatro espaços periportais, após a primeira divisão dos ramos direito e esquerdo da veia porta, sendo considerado grau de fibrose zero (Grau 0) para valores menores do que 3,0mm, grau de fibrose I (Grau I) entre 3,0mm a 4,9mm; grau de fibrose II (Grau II) entre 5,0mm a 7,0mm; e grau de fibrose III (Grau III) se o diâmetro for superior a 7,0mm.

### **V.5.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)**

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir de amostra de 40 mL de sangue heparinizado de pacientes com os três grupos de fibrose periportal, diluído 1:2 em solução salina a 0.9%, e separadas por gradiente de densidade, o Ficoll-Hipaque™ Plus (GE healthcare, Biosciences AB Durham, NC, USA). As células mononucleares foram coletadas por aspiração, lavadas por três vezes com solução salina a 0.9% a 1290rpm por 10 minutos. As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas a uma concentração de  $1 \times 10^7$  células/mL em meio RPMI 1640, contendo 10% de soro humano AB inativado.

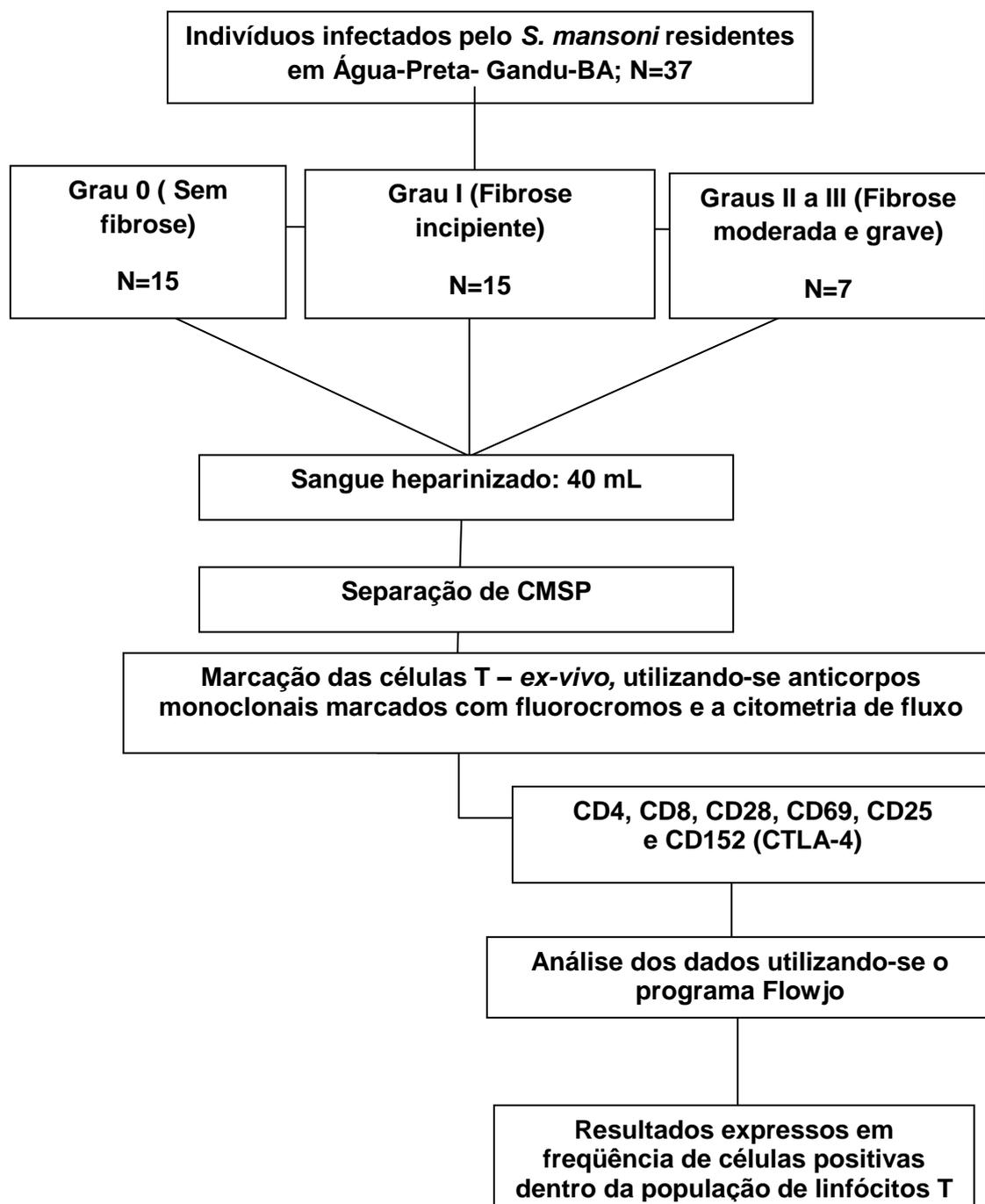
#### V.5.4 Marcação dos fenótipos de linfócitos – *Ex vivo*

As células CMSP foram marcadas com anticorpos monoclonais para os marcadores de superfície, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD28, anti-CD69 e CTLA-4 com os seguintes fluorocromos FITC (CD3, CD4, CD25), PercPCy5.5 (CD4, CD28), PercP (CD69), APC (CD4), PE (CD3, CTLA-4) e PeCy7 (CD8). Foram adicionadas 30  $\mu\text{L}$  da solução contendo  $3 \times 10^5$  células/mL em cada poço da placa de 96 poços. Em seguida foram acrescentados 20  $\mu\text{L}$  da solução com os anticorpos diluídos. As placas foram incubadas, protegidas da luz por 20 minutos a 4°C. Foram feitas três lavagens sucessivas para eliminar o excesso de anticorpo monoclonal, seguido de ressuspensão das células em 100  $\mu\text{L}$  de PBS 1X para aquisição no citômetro de fluxo (FACS canto: BD Biosciences Falcon™352052 II). As populações celulares foram definidas a partir dos parâmetros de tamanho (SSC) e granulosidade celular (FSC), respectivamente para delimitação da região dos linfócitos. As células mononucleares foram analisadas de acordo com a frequência da expressão dos marcadores de superfície celular usando o programa Flow Jo (FIGURA 6).



**FIGURA 6** - Região (*gate*) de identificação dos linfócitos através da expressão dos parâmetros de SSC (tamanho) e FSC (granulosidade) em CMSP de pacientes com esquistossomose. Figura representativa de um paciente.

### V.5.5 Fluxograma – Desenho do estudo



## **V.6 ANÁLISES DOS DADOS**

Os dados referentes à amostra populacional foram analisados pelo programa *Statistical Package for Social Science* (SPSS® versão 9,0) e representados através de medianas ou através de porcentagens. Os fenótipos das células foram analisados pelo software Flowjo (GeneChip®, Affymetrix® versão 7.6.5) e expressos em percentagem de positividade do total de células dentro de um grupo celular específico. A comparação entre os três grupos de pacientes com diferentes graus de fibrose periportal foi realizada através do teste Anova ou Kruskal Wallis, com pós-teste de Dunn, sendo considerado significativo um valor de  $p < 0,05$ .

## **V.7 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS DA PESQUISA**

O presente estudo é uma extensão do projeto aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Maternidade Climério de Oliveira – UFBA, intitulado: Avaliação do Perfil de Citocinas em Indivíduos com Diferentes Graus de Fibrose Hepática Secundária a Esquistossomose (Parecer/Resolução nº 043/2008; ANEXO II). Os participantes do estudo foram todos voluntários que, após esclarecimentos sobre o objetivo desta pesquisa, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). No caso de menores, o consentimento foi assinado por um dos responsáveis (APÊNDICE B). Todos os indivíduos portadores de enteroparasitoses foram tratados gratuitamente.

**VI. ARTIGO**

**“Lymphocyte Profile in Schistosomiasis Patients with  
Periportal Fibrosis” (submitted)**

## **Lymphocyte Profile in Schistosomiasis Patients with Periportal Fibrosis**

**Luciana Santos Cardoso<sup>1,2,3</sup>, Andréia de Sousa Rocha Barreto<sup>1</sup>, Jamille Souza Fernandes<sup>1</sup>, Robson da Paixão de Souza<sup>1</sup>, Edgar M. Carvalho<sup>1,3,4</sup>, Maria Ilma Araujo<sup>1,3,4</sup>**

*<sup>1</sup>Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, <sup>2</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, UFBA, <sup>3</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT –DT/CNPq-MCT).<sup>4</sup>Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública, Salvador, BA, Brazil.*

Correspondence should be addressed to [lucianac@ufba.br](mailto:lucianac@ufba.br)

## Abstract

Schistosomiasis takes the second place in clinical and epidemiological magnitude of parasitic diseases in the world. The host immune response is essential for the protection and pathogenesis. The chronic phase is characterized by the production of Th2 cytokines, which are associated to the development of periportal fibrosis. Little is known about the phenotype and activation status of different subtypes of T cells in the process. Objective: To evaluate the phenotype and the degree of T cell activation in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. Methods: It was a cross-sectional study, conducted in the village of Agua Preta, Gandu-Bahia, which included 37 subjects with periportal fibrosis determined by ultrasound. Fifteen of them had incipient fibrosis, seven moderate to severe fibrosis and fifteen without fibrosis. Peripheral blood mononuclear cells were obtained by the Ficcol-hypaque gradient and frequency of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells, as well as the expression of the surface markers CD28, CD69, CD25 and CTLA-4 were determined by flow cytometry. Results: There was no significant difference in the frequency of CD4<sup>+</sup> T cells in patients with different degrees of periportal fibrosis, however, individuals with moderate to severe fibrosis showed a lower frequency of CD8<sup>+</sup> T cells when compared to patients without fibrosis or incipient fibrosis. The frequency of CD8<sup>+</sup> CD28<sup>+</sup> T cells as well as CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T cells was higher in patients with incipient fibrosis when compared to those without fibrosis. Regarding the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>, there was no significant difference between groups, however, individuals with moderate to severe fibrosis presented a lower frequency of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T cells when compared to patients without fibrosis or incipient fibrosis. The frequency of CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> T cells in individuals with moderate to severe fibrosis was lower also than in patients without fibrosis or with incipient fibrosis. Conclusion: The high frequency of activated T cells in patients with fibrosis

indicates that these cells might participate in the periportal fibrosis development in schistosomiasis. Additionally, the low frequency of T cells with regulatory profile in patients with moderate to severe fibrosis reinforces the hypothesis of a lack of regulatory immune response in these patients.

**Keywords:** Schistosomiasis, pathogenesis, periportal fibrosis, T lymphocytes.

## 1. Introduction

Schistosomiasis is a parasitic disease which account for the second place in terms of socio-economic and public health in tropical and subtropical areas. It is a chronic and debilitating disease caused by parasites of the genus *Schistosoma*, which affects about 200 million people worldwide and close to 800 million are at the risk of infection [1]. The liver pathology results from the host immune response to antigens from the eggs that become trapped in the portal venous system. The granulomas formed around the eggs act as barriers which prevent the dispersion of egg antigens of *S. mansoni*, however, about 5 % of infected individuals evolve to periportal fibrosis and it is associated to the morbidity and mortality described in chronic schistosomiasis [2-4].

Studies have evaluated the cytokine response associated with granuloma formation and development of periportal fibrosis due to schistosomiasis, both in experimental models and in vitro models of granuloma or tissue biopsies [5-7]. There are, however few studies evaluating the lymphocyte profile in patients with periportal fibrosis and the participation of co-stimulatory molecules in the process. The activation process of T cells requires stimulation through co-stimulatory molecules which interact with corresponding ligands on antigen presenting cells (APC). One of the most important co-stimulatory molecules on T cells is CD28, which is constitutively expressed, and bind to its ligands on APCs, CD80 and CD86. CD86 is constitutively expressed at low levels and it is rapidly up-regulated after primary antigen recognition, whereas CD80 exhibits delayed expression kinetics [8]. Other ligand for CD80 and CD86 is CTLA4. The expression of this molecule is rapidly up-regulated after T cell activation, and provides a negative feedback signal limiting the immune response [9]. Additionally to co-stimulatory molecules expressed during the antigen presentation process, we also evaluated in this study the expression of CD69, a molecule associated to T cell

activation [10]. This molecule is expressed following activation of T cells and it induces proliferation of these cells through increased synthesis of IL-2 [10]. The CD4<sup>+</sup> T cells, depending on the cytokine environment that is exposed at the time of antigen presentation, can differentiate into effectors T cells subtypes of Th1, Th2, Th17 or T regulatory (Treg) phenotypes. Treg cells have been described to play a key role in controlling the immune system. Depending on how they are derived, regulatory T-cells can be classified into two main types. The natural regulatory cells arises from the thymus as a distinct subtype of mature T cell and express the alpha chain of the IL-2 receptor, the molecule CD25 and they can also express the transcription factor Foxp3 [11, 12]. Other type of regulatory cell, the regulatory T cells induced type 1 (Tr1), develops from the differentiation of naive T cells in the periphery after contact with high concentrations of antigen [13-15]. In recent years the expression of CD25 molecule on T lymphocytes has been better characterized, being considered responder or activated T cells those which show low expression of CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup>) or did not express this molecule (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup>). Cells expressing high levels of CD25 (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>), on the other hand, have potent suppressor activities on the immune response, by inhibiting cell proliferation and cytokine secretion by T cells. These cells can act via cell-cell contact [16, 17] or by the synthesis of regulatory cytokines such as IL-10 and TGF- $\beta$  [18].

We hypothesize that the process of periportal fibrosis development in schistosomiasis is associated with an exacerbated activation status of T cells due to an impairment of regulatory molecule expression in these cells. To test this hypothesis we evaluated the phenotype and the degree of activation of T lymphocytes in patients with varying degrees of periportal fibrosis secondary to schistosomiasis.

## 2. Patients, Materials and Methods

### 2.1. Study design and the endemic area

This study was carried out in an endemic area from schistosomiasis named Água Preta, in the state of Bahia, Brazil. Água Preta is located 280km south of Salvador, the capital of the State Bahia. It is composed of a residential area in the center of the village and some surrounding farms. A total of approximately 800 people live in the community. They live in poor sanitary conditions and agriculture is the predominant occupation. There is one river in this region that is used for bathing, washing clothes and utensils, and leisure - exposing the residents to high risk of *Schistosoma* infection.

A cross-sectional parasitological surveys using Kato-Katz [19] and sedimentation techniques were conducted in three different stool samples collected on different days. The inclusion criteria for this study were individuals from endemic areas who have at least one positive parasitological exam for *S. mansoni*. From the 537 individuals who agreed to participate in this study 334 were infected with *S. mansoni* (62.5%). The frequency of other helminthic infections was 43.4% for *Trichuris trichiura*, 37.4% for *Ascaris lumbricoides*, 33.7% for Hookworms and 3.5% for *Strongyloides stercoralis*. From 334 individuals who were infected with *S. mansoni*, 220 agreed to perform abdominal ultrasound, in order to determine the degree of periportal fibrosis [20]. They also agreed to donate blood for the study of the immunological response. For this particular aim, we analyzed fifteen patients with grade 0 (no fibrosis), fifteen patients with grade I (incipient fibrosis) and seven with fibrosis grades II and III (moderate and severe fibrosis). We had difficulty in finding patients with advanced stages of fibrosis in the region of the study, being seven all patients with this condition who met the inclusion criteria. We did not include individuals fewer than 05 or above 60 years old.

We also did not include alcoholic individuals and those with positive serology for HIV, HTLV-1 or hepatitis virus type B and C - all of which are conditions that could interfere with the immunological response.

## *2.2. Ultrasound examination*

Abdominal ultrasound (USG) were performed using the Quantum 2000 Siemens and Elegra Siemens ultrasound with a convex transducer of 3.5 - 5.0 Mhz. Liver span was measured in the midclavicular line and midline. The liver was also examined for smoothness of surface; echogenicity and posterior attenuation of the sound beam; and portal vein diameter outside the liver midway between its entrance into the portal hepatic and its first bifurcation in the liver. Periportal fibrosis was observed as multiple diffuse echogenic areas. Grading of periportal fibrosis was determined by the mean total thickness of four portal tracts after the first division from the right and left branches of portal vein (PT1) as follow: degree 0, mean thickness < 3mm; degree I, mean thickness 3 to 5 mm; degree II, mean thickness > 5 to 7 mm; and degree III mean thickness > 7 mm [21, 22]. Of the 220 individuals evaluated 62 (28.2%) had some degree of periportal fibrosis [20]. The score of periportal fibrosis were grouped according to the severity, being degree 0 without periportal fibrosis, incipient periportal fibrosis was considered to individuals with degree I and moderate to severe periportal fibrosis to those with degrees II and III [23].

To perform the immune response we included 15 individuals with degree 0, 15 individuals with degree I, while all individuals with severe forms of the disease characterized by the grade II or III (n=07) were included.

## *2.2. Fecal examinations for parasite load*

Three stool samples from each individual were examined using Hoffman sedimentation method, to identify helminthes and enteric protozoa, and Kato-Katz method, to estimate the number of eggs per gram of feces [19].

## *2.3. Ex vivo staining*

The PBMC cells were labeled with monoclonal antibodies for the surface markers, CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD69 and CTLA-4 with the following fluorochromes FITC (anti-CD3, anti-CD4 , anti-CD25), PercPCy5.5 (anti-CD4, anti-CD28), PerCP (anti-CD69), APC (anti-CD4), PE (anti-CD3 and anti-CTLA-4) and PeCy7 (anti-CD8). The staining cells,  $3 \times 10^5$  cells / ml in 30 uL of a solution, were added to each well of 96 well plate. Then, 20 uL of diluted antibody solution were added. The plates were incubated, protected from the light for 20 minutes at 4 ° C. After staining, preparations were washed with 0.1% sodium azide PBS, fixed with 200 ml of 4% formaldehyde in PBS and kept at 4°C for later acquisition using a flow cytometer (FACS corner: BD Biosciences 352052 Falcon <sup>TM</sup> II). The cell populations were defined from the size parameters (SSC) and cell granularity (FSC) for the delimitation of the lymphocyte region. Cells were analyzed according to the frequency of expression of cell surface markers using Flow Jo software (Figure 1).

## *2.5. Analysis of FACS data*

The frequency of positive cells was analyzed using the program Cell Quest in the lymphocyte region, which was determined using granularity (SSC) and size (FSC) plot. Limits for the quadrant markers were always set based on negative populations and

control isotypes. For analyses of CD8-positive lymphocytes, quadrants were always set for CD8<sup>hi</sup> populations in order to not to include CD8<sup>low</sup> positive NK cells.

### *2.6. Statistical analysis*

Statistical analyses were performed using the software Statistical Package for Social Science (version 9.0 for Windows; SPSS). The frequency of positive cells was expressed as percentages. The differences between means were assessed using unpaired t test to compare two groups, or one-way ANOVA to compare three or more groups. Fisher's exact test was used to compare proportions. The difference in mean age was assessed by the Mann Whitney test. Statistical significance was established at the 95% confidence interval.

## **3. RESULTS**

The demographic characteristics, parasite burden and the ultrasonography evaluation of individuals included in this study are shown in the Table I. It was observed that the mean age of individuals with moderate to severe periportal fibrosis was higher than in patients without fibrosis or with incipient fibrosis ( $p < 0.05$ ). Individuals with moderate-to-severe fibrosis had lower parasite burden than individuals with incipient fibrosis or without periportal fibrosis, and there was no significant differences in gender distribution between groups of patients (TABLE 1).

### *3.1. Frequency and activation status of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in individuals with different degrees of periportal fibrosis*

The frequency of CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells was similar among patients with different degrees

of periportal fibrosis (Figure 1A). There was, however, a lower the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells in individuals with moderate to severe fibrosis (median = 11.4%; min-max= 0.2% -16%), compared to those without fibrosis (16%; 13% -29.7%) or with incipient fibrosis (11.6%; 0,8% - 21.1%; p<0.05) (Figure 1B). The CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cell ratio was higher in individuals with moderate to severe fibrosis compared to those without fibrosis (p<0.05).

We also evaluated the frequency of some T cells activation markers such as CD28 and CD69. The expression of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T lymphocytes was higher in individuals with moderate to severe fibrosis (95.7%; 91.2% - 98.5%) compared to patients with incipient fibrosis (62%; 48.8% - 95.4%; p<0.05; Figure 2A). There was no significant difference in the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells expressing CD28 between groups (Figure 2B). Regarding CD69 we did not observe any significant difference among groups of individuals, both in CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells.

It has been demonstrated that the suppressive mechanisms induced by helminth infection include cell-to-cell contact via CTLA-4. The frequency of CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> T cells was higher in individuals with moderate to severe fibrosis (0.41%; 0.2% - 0.6%), compared to individuals without fibrosis (0.8%; 0.15% - 2.8%) or with incipient fibrosis (0.16%; 0.1% - 4.2%; p<0,05).

### *3.2. Different populations of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells may participate in the pathogenesis of periportal fibrosis due to S. mansoni infection*

It has been demonstrated that within the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cell populations, those which express high levels of CD25 exhibit regulatory functions [16].

The lower expression of CD25 (CD25<sup>low</sup>) on CD4<sup>+</sup> cells has been related to activation

status of these cells. The frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>low</sup> T cells (Figure 4A) did not differ among groups, being 7.4% (3.1% - 11.5%) in the group of individuals without fibrosis, 7.5% (4% - 13.1%) in the group with incipient fibrosis and 6% (4% - 8.3%) in the group of individuals with moderate to severe fibrosis ( $p>0.05$ ). Individuals with moderate to severe fibrosis, had, however, high frequency of TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup> T cells (91.9%; 87.8% - 95.2%) compared to those without fibrosis (89%; 86% - 91.5%) or with incipient fibrosis (88.4%; 83.4% - 93%;  $p<0.05$ ; Figure 4B).

On the other hand, the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> were lower in individuals with moderate to severe fibrosis (1.0%; 0.7% - 1.35%) compared to individuals without fibrosis (1.8%; 1.1% - 2.9%) or with incipient fibrosis (1.75%; 0.85% - 3.5%;  $p<0.05$ ).

#### 4. Discussion

In this study we evaluated the frequency of T lymphocytes subtypes and activation status of these cells in individuals with different degrees of periportal fibrosis due to *S. mansoni* infection. Most of the included subjects were female; however there was no difference in gender distribution between groups of patients with different degrees of fibrosis. The parasite load of *S. mansoni* was also similar between groups. Individuals without periportal fibrosis were younger than patients with moderate to severe fibrosis, which corroborates with Alves-Oliveira and colleagues [23], who observed that the development of periportal fibrosis is a slow process usually occurring after 50 years of age.

Regarding, the immune response, the frequency of CD4<sup>+</sup> T cells did not differ between groups of patients with different degrees of periportal fibrosis, while CD8<sup>+</sup> T cells were more frequent in individuals with moderate to severe fibrosis. Granuloma formation is mainly mediated by CD4<sup>+</sup> T cells specific for the parasite antigens [4, 24], and these cells also participate in the modulatory process of granuloma development [25]. Studies have showed that both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are sources of IL-10, a cytokine with suppressive activity that is highly produced during chronic *S. mansoni* infection [26]. We did not find, however, differences in the frequency of CD4<sup>+</sup> T cells between groups of patients with different degrees of fibrosis, indicating that even with similar frequency of these cells, their profile might be important, and this aspect was also evaluated in this study. Regarding the CD8<sup>+</sup> lymphocytes, there are some evidences that they participate in the control of granuloma formation and prevent pathology during chronic schistosomiasis [27]. This is supported by the data that there is an increased population of activated CD8<sup>+</sup> T cells in individuals with the intestinal form of the disease [28].

In relation to the activation status of T lymphocytes in this study, we observed higher frequency of CD4<sup>+</sup>T cells expressing CD28 in subjects with moderate to severe fibrosis when compared to cells from individuals with incipient fibrosis. There was, however, no difference in the frequency of CD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> T cells among groups. These findings suggest that expression of CD28 on CD4<sup>+</sup> T cells may be related to the development of more severe forms of schistosomiasis. The molecule CD69 is other marker of T cell activation. It is not found on resting cells, being rapidly expressed following T cells activation. The expression of CD69 induces proliferation of T cells through the increased synthesis of IL-2 [10]. In this study we observed no differences in the frequency of CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> T cells among patients with different degrees of periportal fibrosis. A lower expression of CD69 on eosinophils has been showed in patient with chronic intestinal schistosomiasis when compared to those with periportal fibrosis [29] There are few studies in the literature that assess the function of the CD69 molecule expressed on T lymphocytes in individuals infected with *S. mansoni*. CD69 expression in these cells may not be as important as on eosinophils. Indeed, the expression of CD69 on eosinophils of other Th2 mediated disease, such as asthma, is associated with airway inflammations and severity of the disease [30, 31].

In this study, we also evaluated the expression of CD25 on lymphocytes of schistosomiasis patients. While there was a high frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>neg</sup> T cells in subjects with moderate to severe fibrosis, the frequency of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T cells was lower, compared to patients without fibrosis or incipient fibrosis. This finding is in agreement with what was found by Teixeira-Carvalho and colleagues [26], who demonstrated for the first time, a high frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> T cells in patients with intestinal form of schistosomiasis, suggesting that they are key cells in controlling morbidity during chronic schistosomiasis.

Experimental evidence points to the possible involvement of regulatory T cells in other chronic helminth infections, such as those caused by hookworm, where there is an increased number of circulating CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> T cells, compared to healthy individuals [32].

Regarding the co-stimulatory molecule CTLA-4, we observed a lower frequency of TCD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> T cells in patients with moderate to severe fibrosis than in individuals with incipient fibrosis or without fibrosis. This suggests the involvement of lymphocytes expressing CTLA-4 as an additional mechanism to control the inflammatory process associated to liver fibrosis during chronic schistosomiasis. In a *S. mansoni* infection experimental study it was demonstrated that cells expressing CTLA-4 can control morbidity through a decrease in the Th2 immune response and in the eosinophil number [33].

## **5. Conclusions**

The data of high frequency of T activated cells in patients with periportal fibrosis, together with a low frequency of cells expressing regulatory markers in these patients, reinforces the hypothesis that the lack of modulatory mechanisms is associated with pathology in human schistosomiasis.

## **Conflict of interests**

The authors declare that they have no conflict of interests.

## **Acknowledgment**

The authors would like to thanks to Dr. Irisma Souza and Dr. Delfin Gonzalez for performing the ultrasound assessment. They are very grateful to all volunteers from the

community of Agua Preta, Gandu, who agreed to participate in this study, to the local health agent Irene Jesus for her support, and to Michael Andrew Sundberg

for the corrections and suggestions made in the text. E. Carvalho and M. I. Araujo are investigators supported by The Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). This work was supported by the Brazilian National Research Council (CNPq) Universal (482113/2010-3).

## Figure legends

**Figura 1. Strategy for T cell evaluation by flow cytometry.** The cell populations were defined by nonspecific fluorescence from the forward (FSC) and side scatter (SSC) as parameters of cell size and granularity, respectively (A). TCD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup> lymphocytes region was determined through the expression of CD3 and CD4 (B) or CD3 and CD8, respectively. Representative graph of one experiment.

**Figure 2. Frequency of T cell population. Frequency of TCD4<sup>+</sup> (A), TCD8<sup>+</sup> (B) and ratio between TCD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup> cells (C) in individuals infected with *S. mansoni* with different degrees of periportal fibrosis.** Ex vivo PBMC were stained for surface. The selection of T-lymphocytes subsets was initially performed based on their forward (FSC) and side (SSC) light scatter properties, followed by immunophenotype using double-labeling platform with anti-CD4 FITC and anti-CD8 PE-CY7 mAbs and flow cytometry. Results are expressed in median, minimum, maximum and interquartile values of frequency (\*p<0.05; Kruskal-Wallis test).

**Figura 3. Frequency of T cell population expressing co-stimulatory molecules.** Frequency of TCD4<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> (A), TCD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (B) and TCD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> cells (C) in individuals infected with *S. mansoni* with different degrees of periportal fibrosis. Ex vivo PBMC were stained for surface. The selection of T-lymphocytes subsets was initially performed based on their forward (FSC) and side (SSC) light scatter properties, followed by immunophenotype using double-labeling platform with anti-CD4 FITC and anti-CD69 PerCP anti-CD28 PE and anti-CD152 PE-CY5. mAbs and flow cytometry.

Results are expressed in median, minimum, maximum and interquartile values of frequency (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ ; Kruskal-Wallis test).

**Figura 4. Frequency of T cell population expressing CD25 molecules.** Strategy to analyze the intensity of expression of CD25 molecule on TCD4<sup>+</sup> cells. Plot (A) and histogram (B) are representative of one experiment. Frequency of TCD4<sup>high</sup> (C), TCD4<sup>low</sup> (D) and TCD4<sup>neg</sup> cells (E) in individuals infected with *S. mansoni* with different degrees of periportal fibrosis. Ex vivo PBMC were stained for surface . The selection of T-lymphocytes subsets was initially performed based on their forward (FSC) and side (SSC) light scatter properties, followed by immunophenotype using double-labeling platform with anti-CD4 APC and anti-CD25 FITC mAbs and flow cytometry. Results are expressed in median, minimum, maximum and interquartile values of frequency (\* $p < 0.05$ ; Kruskal-Wallis test).

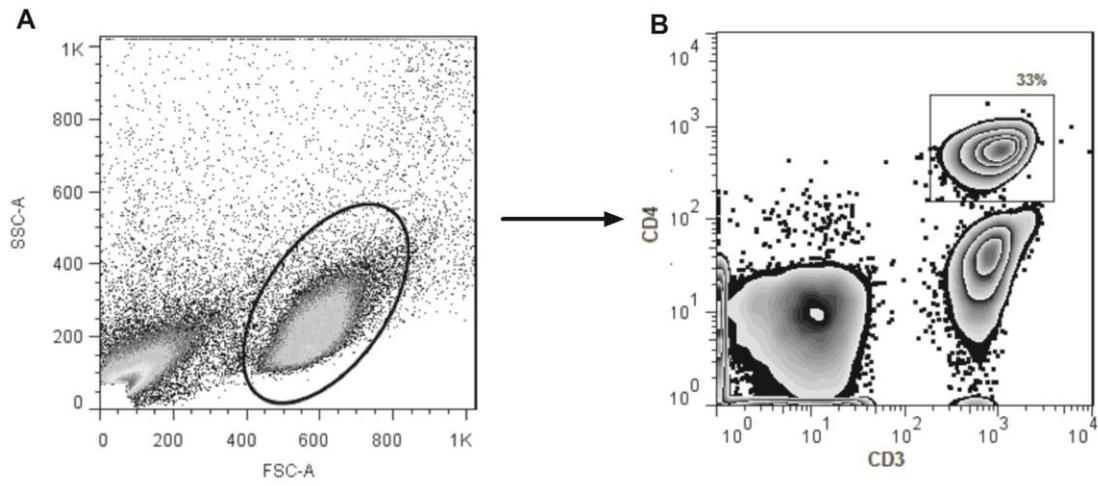
## References

- [1] Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 2006 Jul;6(7):411-25.
- [2] Bina JC, Prata A. [Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I- *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms]. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003 Mar-Apr;36(2):211-6.
- [3] Henri S, Chevillard C, Mergani A, Paris P, Gaudart J, Camilla C, et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. *J Immunol* 2002 Jul 15;169(2):929-36.
- [4] Andrade ZA. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol* 2009 Nov;31(11):656-63.
- [5] Gustavson S, Zouain CS, Alves JB, Leite MF, Goes AM. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. *Parasitol Int* 2002 Sep;51(3):259-69.
- [6] Wynn TA, Cheever AW. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Curr Opin Immunol* 1995 Aug;7(4):505-11.
- [7] Steinman L. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007 Feb;13(2):139-45.
- [8] Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 1994 Aug 1;180(2):631-40.
- [9] Brunet JF, Denizot F, Luciani MF, Roux-Dosseto M, Suzan M, Mattei MG, et al. A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4. *Nature* 1987 Jul 16-22;328(6127):267-70.
- [10] Testi R, Phillips JH, Lanier LL. T cell activation via Leu-23 (CD69). *J Immunol* 1989 Aug 15;143(4):1123-8.
- [11] Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.
- [12] Nielsen J, Holm TL, Claesson MH. CD4+CD25+ regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects. *Apmis* 2004 Oct;112(10):642-50.
- [13] Weiner HL. Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases. *Annu Rev Med* 1997;48:341-51.
- [14] Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Wuthrich B, Blaser K. Role of interleukin 10 in specific immunotherapy. *J Clin Invest* 1998 Jul 1;102(1):98-106.
- [15] Yssel H, Lecart S, Pene J. Regulatory T cells and allergic asthma. *Microbes Infect* 2001 Sep;3(11):899-904.

- [16] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001 Aug 1;167(3):1245-53.
- [17] Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25+ regulatory cells from human peripheral blood express very high levels of CD25 ex vivo. *Novartis Found Symp* 2003;252:67-88; discussion -91, 106-14.
- [18] Saito S, Sasaki Y, Sakai M. CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy. *J Reprod Immunol* 2005 Apr;65(2):111-20.
- [19] Katz N, Coelho PM, Pellegrino J. Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. *J Parasitol* 1970;56(5):1032-3.
- [20] De Souza Rda P, Cardoso LS, Lopes GT, Almeida MC, Oliveira RR, Alcantara LM, et al. Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to *Schistosoma mansoni* Infection. *J Parasitol Res*;2012:394981.
- [21] Abdel-Wahab MF, Esmat G, Farrag A, el-Boraey YA, Strickland GT. Grading of hepatic schistosomiasis by the use of ultrasonography. *Am J Trop Med Hyg* 1992 Apr;46(4):403-8.
- [22] Abdel Wahab MF, Esmat G. The value of ultrasonography in assessment of portal hypertension in hepatosplenic schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992;87 Suppl 4:143-7.
- [23] Alves Oliveira LF, Moreno EC, Gazzinelli G, Martins-Filho OA, Silveira AM, Gazzinelli A, et al. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. *Infect Immun* 2006 Feb;74(2):1215-21.
- [24] Asahi H, Stadecker MJ. Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection. *Parasitol Int* 2003 Dec;52(4):361-7.
- [25] Mathew RC, Boros DL. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun* 1986 Dec;54(3):820-6.
- [26] Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Peruhype-Magalhaes V, Silveira-Lemos D, Malaquias LC, Oliveira LF, et al. Cytokines, chemokine receptors, CD4+CD25HIGH+ T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. *Acta Trop* 2008 Nov-Dec;108(2-3):139-49.
- [27] Oliveira-Prado R, Caldas IR, Teixeira-Carvalho A, Andrade MV, Gazzinelli A, Correa-Oliveira R, et al. CD4 and CD8 distribution profile in individuals infected by *Schistosoma mansoni*. *Scand J Immunol* 2009 Jun;69(6):521-8.
- [28] Martins Filho OA, Mello JR, Correa-Oliveira R. The spleen is an important site of T cell activation during human hepatosplenic schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1998;93 Suppl 1:159-64.
- [29] Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Alves Oliveira LF, Costa-Silva MF, Matoso LF, et al. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta Trop* 2008 Nov-Dec;108(2-3):150-9.
- [30] Hartnell A, Robinson DS, Kay AB, Wardlaw AJ. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 1993 Oct;80(2):281-6.

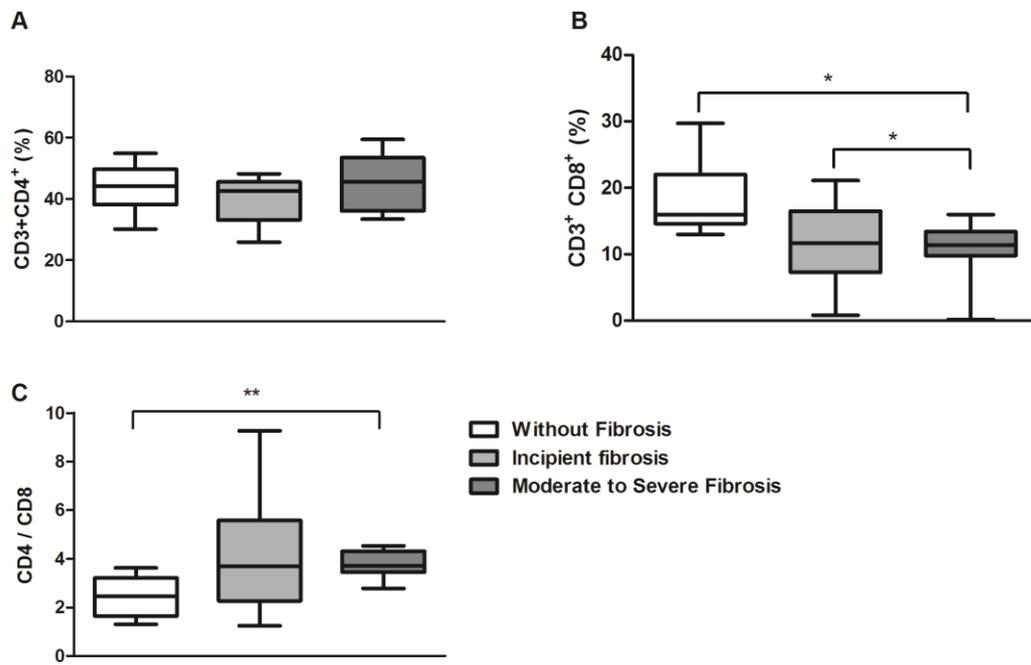
- [31] Miki-Hosokawa T, Hasegawa A, Iwamura C, Shinoda K, Tofukuji S, Watanabe Y, et al. CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation. *J Immunol* 2009 Dec 15;183(12):8203-15.
- [32] Ricci ND, Fiuza JA, Bueno LL, Cancado GG, Gazzinelli-Guimaraes PH, Martins VG, et al. Induction of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells during human hookworm infection modulates antigen-mediated lymphocyte proliferation. *PLoS Negl Trop Dis* Nov;5(11):e1383.
- [33] Walsh CM, Smith P, Fallon PG. Role for CTLA-4 but not CD25+ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice. *Parasite Immunol* 2007 Jun;29(6):293-308.

Figure 1



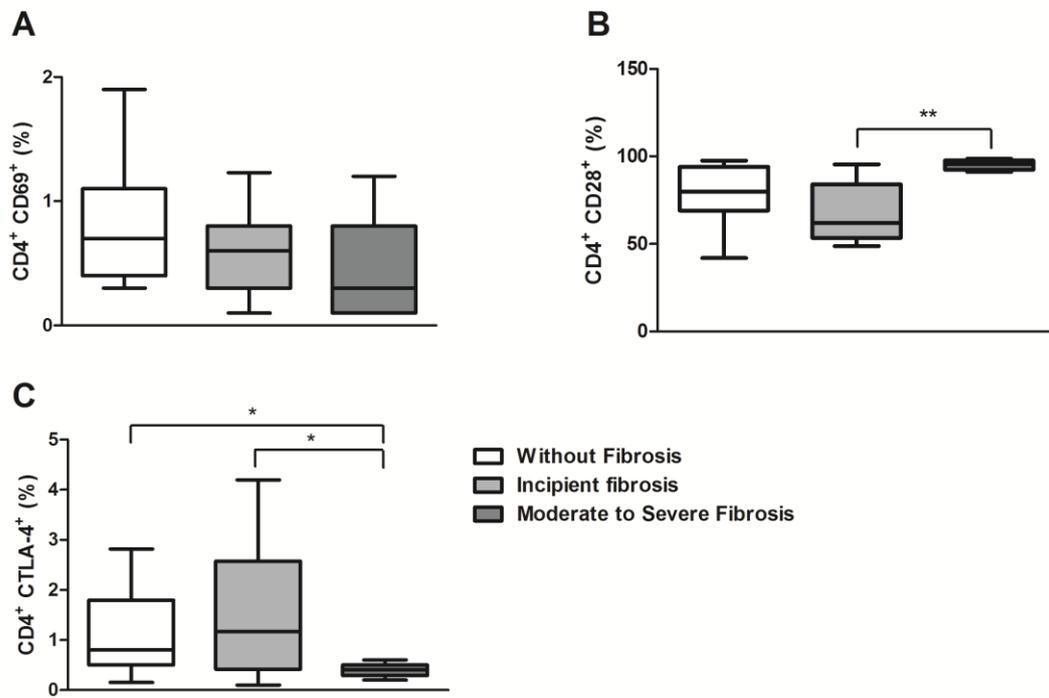
Cardoso et al, Fig 1

Figure 2



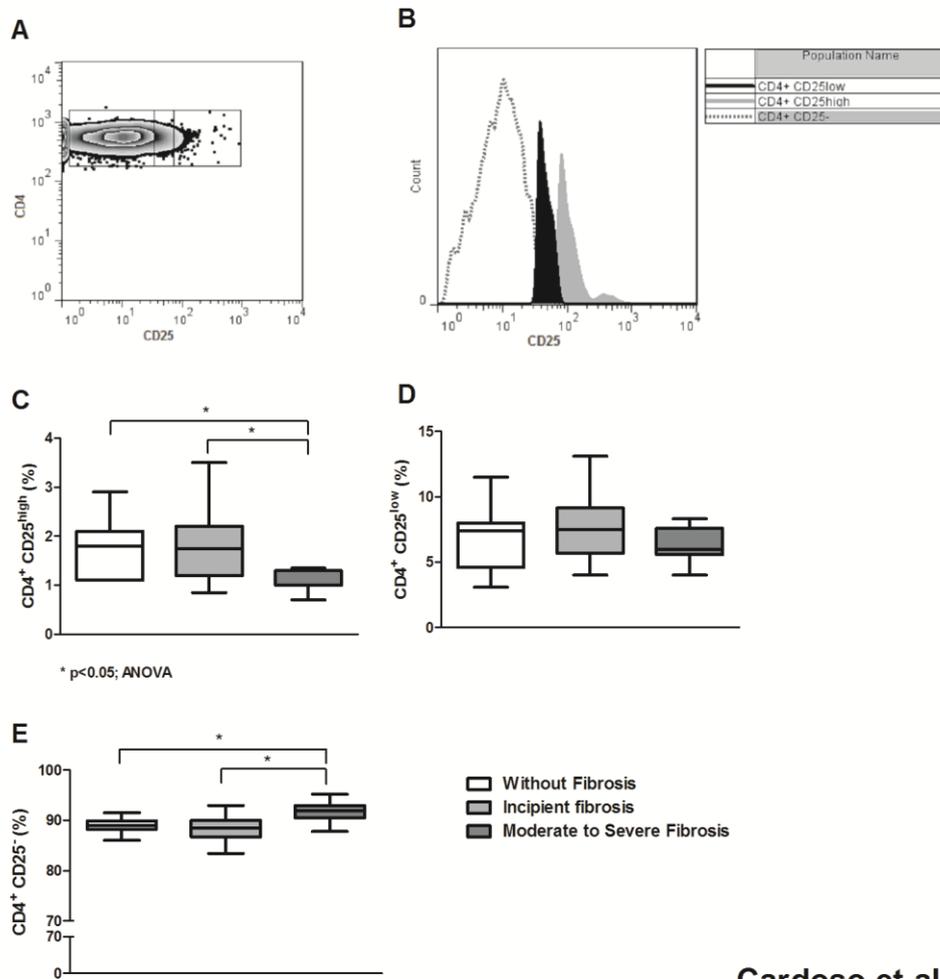
Cardoso et al, Fig 2

Figure 3



Cardoso et al, Figure 3

Figure 4



Cardoso et al, Fig 4

## VII. RESULTADOS

Participaram deste estudo 37 indivíduos infectados pelo *S. mansoni* residentes em Água Preta, no município de Gandu, Bahia. Quinze deles não apresentavam fibrose periportal, quinze apresentavam fibrose incipiente e sete apresentavam fibrose moderada a grave. A idade da população variou de 12 a 70 anos, com mediana de 37 anos. A faixa etária do grupo de pacientes com fibrose moderada a grave foi maior do que a dos pacientes do sem fibrose ( $p < 0,05$ , Tabela 1). Observou-se que 65% dos participantes eram do sexo feminino, não havendo, entretanto, diferença significativa na distribuição de gêneros entre os três grupos avaliados (Tabela 1). Não foram observadas também diferenças significativas na carga parasitária de *S. mansoni* entre os três grupos estudados (Tabela 1).

**TABELA 1. Caracterização dos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*.**

| Categories                                  | Sem fibrose<br>(n=15) | Fibrose<br>incipiente<br>(n=15) | Fibrose<br>moderada a<br>grave (n=07) | P                   |
|---|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------------|---------------------|
| <b>Idade (em anos)*</b>                     |                       |                                 |                                       |                     |
| mediana (faixa etária)                      | 30 (12-50)            | 34 (20-62)                      | 47 (26 - 70)                          | < 0,05 <sup>a</sup> |
| <b>Gênero n (%)**</b>                       |                       |                                 |                                       |                     |
| Masculino                                   | 06 (40)               | 05 (33,3)                       | 02 (28,5)                             | Ns                  |
| Feminino                                    | 09 (60)               | 10 (66,7)                       | 05 (71,5)                             |                     |
| <b>Carga parasitária <i>S.mansoni</i> *</b> |                       |                                 |                                       |                     |
| mediana (min-max)                           |                       |                                 |                                       |                     |
| Opg/fezes                                   | 72 (24 - 392)         | 72 (24 - 600)                   | 72 (24 - 192)                         | Ns                  |

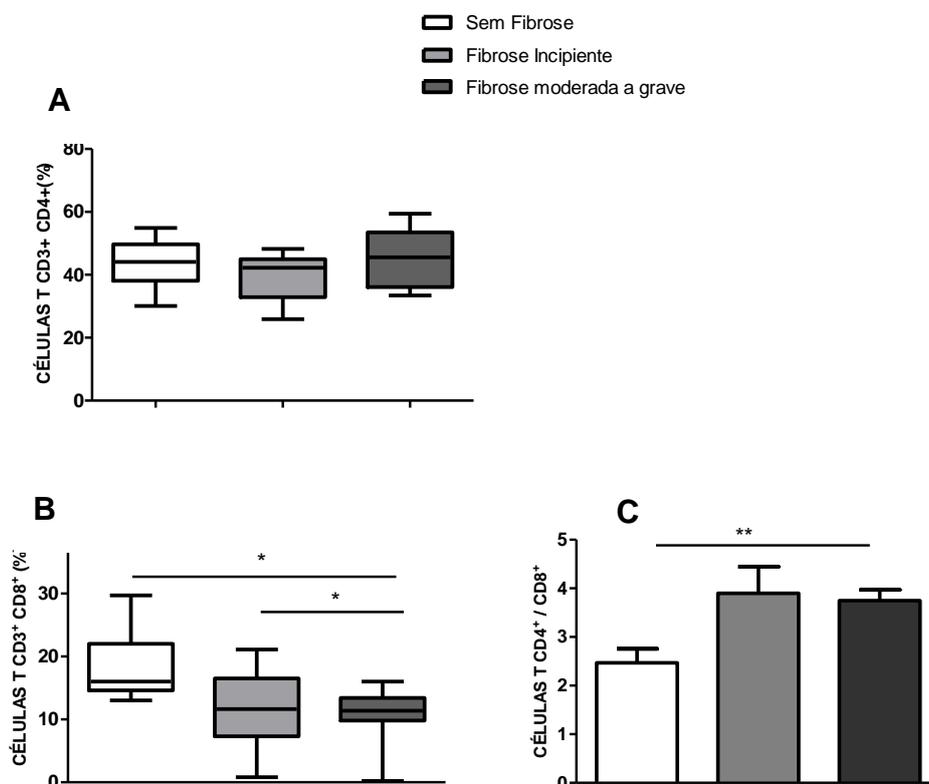
\*One-way ANOVA com pós-teste; \*\*Teste Qui quadrado

<sup>a</sup> Sem fibrose vs fibrose moderada a grave; ns = não significativo (n=37)

## VI. 1. Frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal

Neste estudo foi avaliada a frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal (Figura 1). Não houve diferença significativa na frequência das células TCD4<sup>+</sup> entre os grupos de pacientes avaliados ( $p > 0,05$ ; Figura 1A). Entretanto, os indivíduos com fibrose moderada a grave apresentaram uma frequência menor de células TCD8<sup>+</sup> (mediana = 11,4%; min-max= 0,2% -16%), quando comparados aos indivíduos sem fibrose (16%; 13% -29,7%) e com fibrose incipiente (11,65%; 0,8% - 21,1%;  $p < 0,05$ ; Figura 1B).

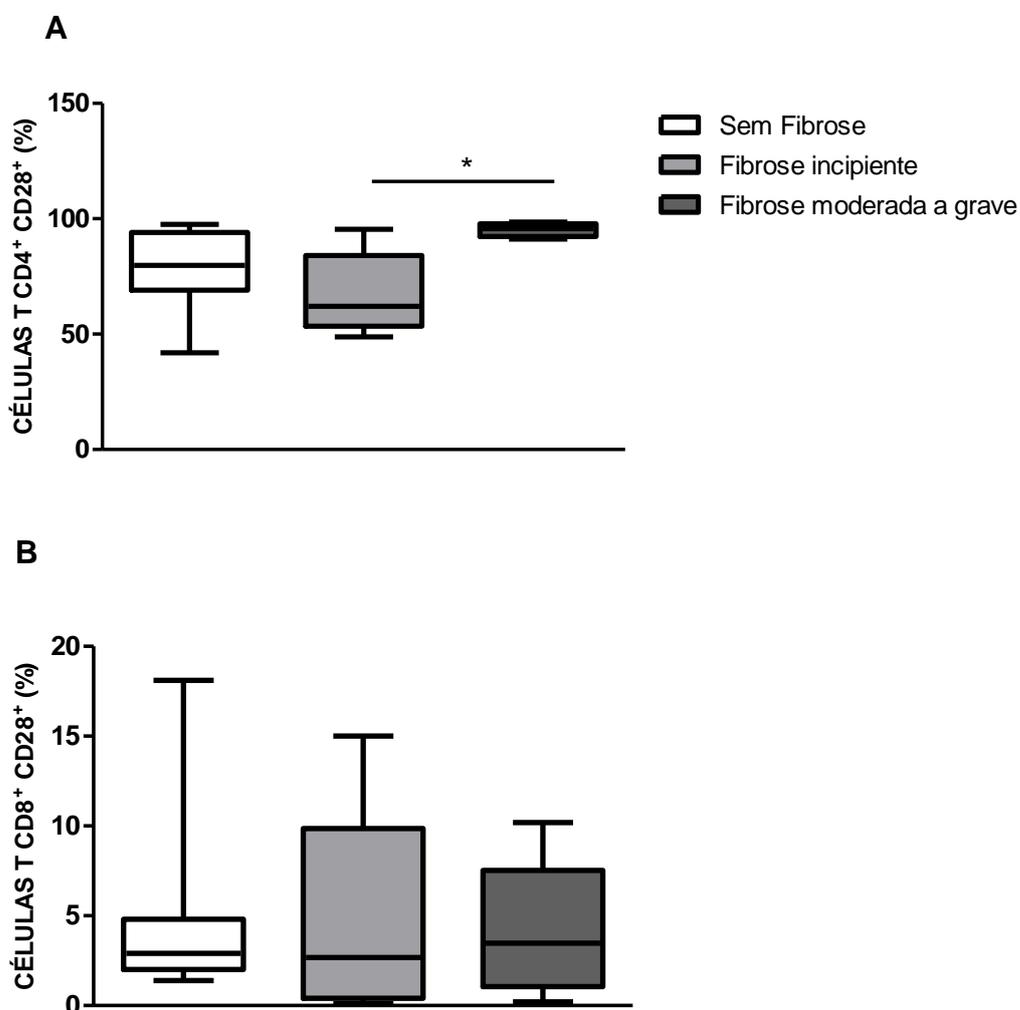
A razão entre as células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> foi avaliada, sendo significativamente maior no grupo de pacientes com fibrose moderada a grave (3,7), quando comparada com os pacientes sem fibrose (2,5;  $p < 0,005$ ; Figura 1C).



**Figura 1. Frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> (A) e TCD8<sup>+</sup> (B) e razão entre TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> (C) em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* com diferentes graus de fibrose periportal. Os resultados das freqüências das populações celulares foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos e interquartil (\* $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ; Teste de Kruskal-Wallis).**

## VI. 2. Frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> expressando a molécula CD28 nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal

Em relação à expressão de CD28 nos linfócitos T dos pacientes com diferentes graus de fibrose periportal, foi observada maior frequência de células TCD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (Figura 2A) nos indivíduos com fibrose moderada a grave (95,7%; 91,2% - 98,5%) quando comparadas aos indivíduos com fibrose incipiente (62%; 48,8% - 95,4%;  $p < 0.05$ ). Não houve, entretanto, diferença significativa na frequência das células TCD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> entre os pacientes sem fibrose (2,9%; 1,4% - 18,1%), com fibrose incipiente (2,67%; 0,1% - 15%) e moderada a grave (3,48%; 0,2% - 10,2%; Figura 2B).



**Figura 2. Frequência dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (A) e TCD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> (B) em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* com diferentes graus de fibrose periportal. Os resultados foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos e interquartis (\* $p < 0,005$ ; Teste de Kruskal-Wallis).**

### VI. 3. Frequência de linfócitos expressando a molécula CD69 nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal

Para determinar o grau de ativação das células T, foi também avaliada a expressão do marcador de superfície celular CD69 em linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>. Não foram observadas diferenças significativas nas frequências de células TCD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (Figura 3A) entre os grupos de pacientes sem fibrose (0,7%; 0,3% - 1,9%), com fibrose incipiente (0,6%; 0,1% - 1,2%) e com fibrose moderada a grave (0,3%; 0,1%-1,2%). Também não houve diferença na frequência de células TCD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> entre os grupos de pacientes sem fibrose (2,7%; 0,4% - 4,7%), com fibrose incipiente (3,8%; 0,8% -12,4%) e com fibrose moderada a grave (3,6%; 0,2%- 6,2%; Figura 3B).

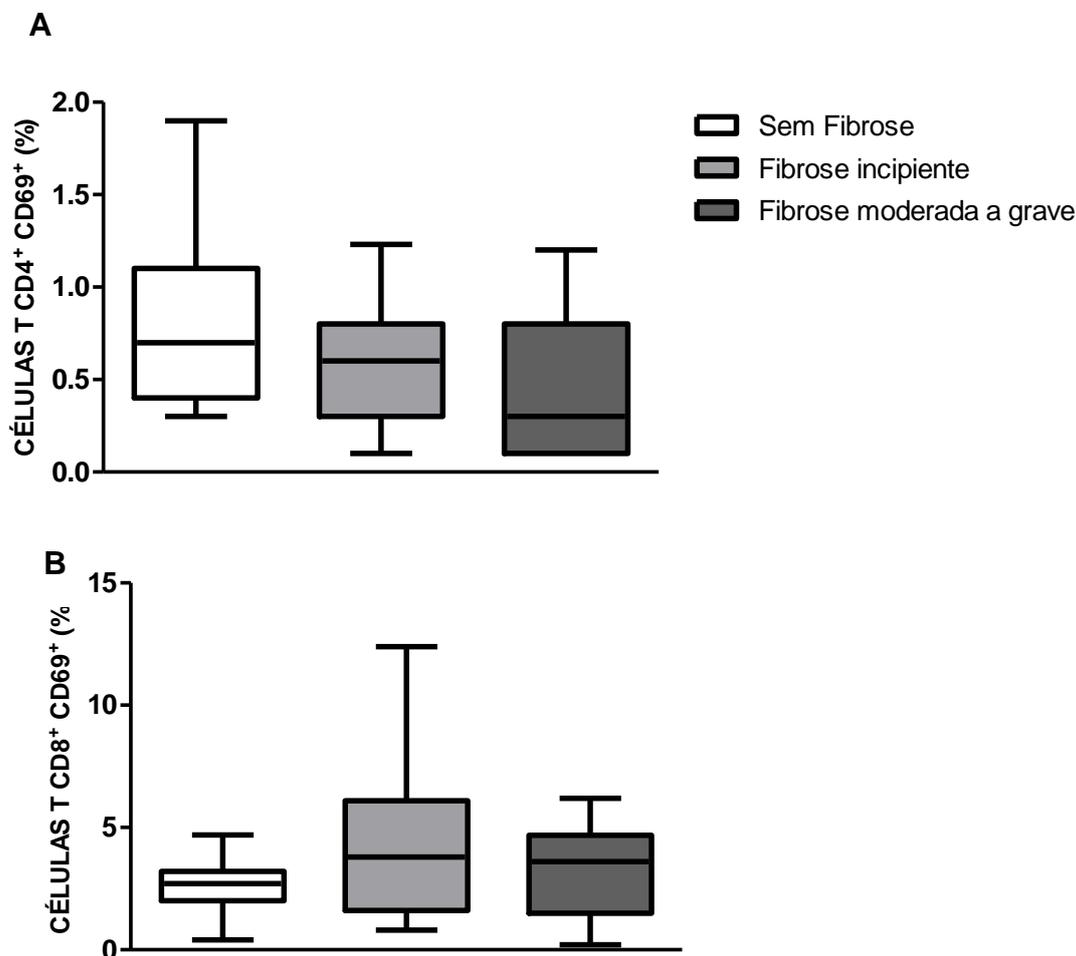


Figura 3. Frequência dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (A) e T CD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> (B) em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* com diferentes graus de fibrose periportal. Os resultados foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos e interquartil ( $p > 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

#### VI. 4. Frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> expressando a molécula CD25 nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal

Foi avaliado nesse estudo as freqüências das populações de células TCD4<sup>+</sup> que apresentavam baixa expressão de CD25 (CD25<sup>Low</sup>), alta expressão desta molécula (CD25<sup>High</sup>) e também a população de células TCD4<sup>+</sup> que não expressavam a molécula CD25 (CD25<sup>Neg</sup>). Em relação à frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>Low</sup> (Figura 4A), foi observado que não houve diferença significativa na frequência destas células entre os pacientes sem fibrose (7,4%; 3,1% - 11,5%), com fibrose incipiente (7,5%; 4% - 13,1%) e com fibrose moderada a grave (6%; 4% - 8,3%). Observou-se, entretanto, que os indivíduos com fibrose moderada a grave apresentaram uma maior frequência de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>Neg</sup> (91,9%; 87,8% - 95,2%), quando comparados aos indivíduos sem fibrose (89%; 86% - 91,5%) e com fibrose incipiente (88,4%; 83,4% - 93%; p<0,05; Figura 4B).

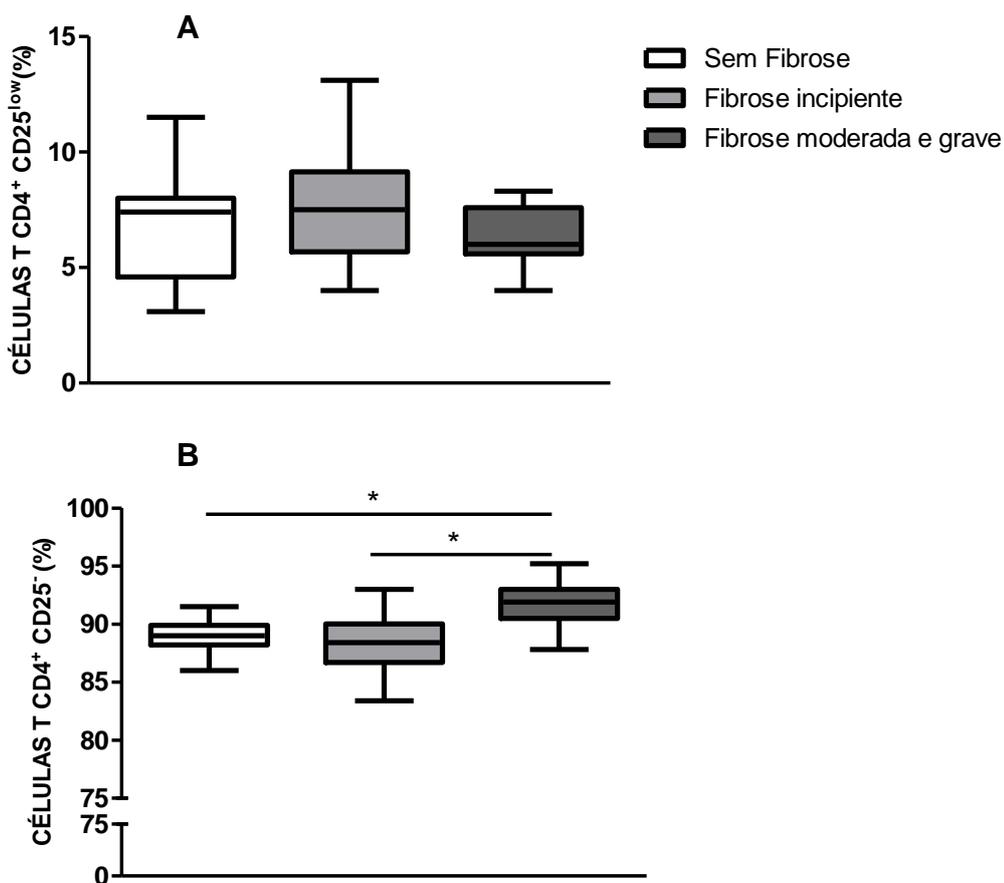
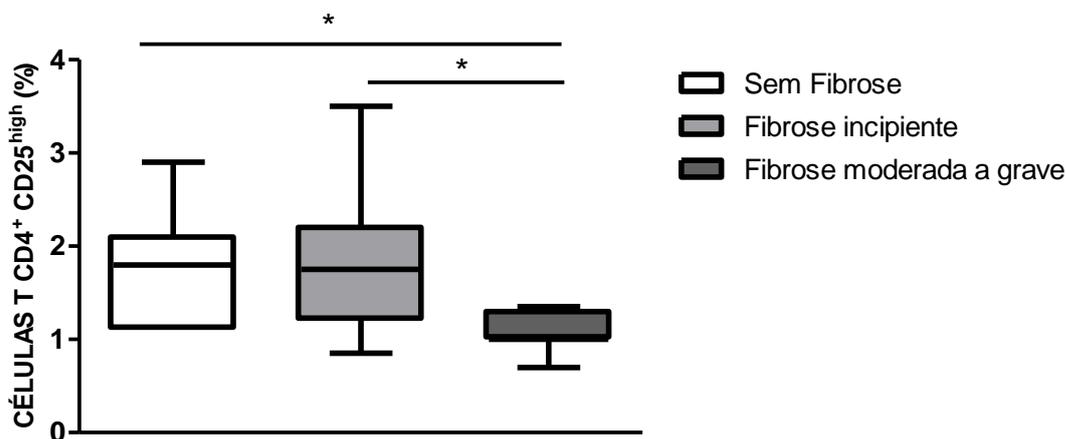


Figura 4. Frequência dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>Low</sup> (A) e TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>Neg</sup> (B) em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* com diferentes graus de fibrose periportal. Os resultados foram

expressos em mediana, valores mínimos e máximos e interquartis (\* $p < 0,05$ ; Teste Kruskal-Wallis).

### VI. 5. Frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> expressando a molécula CD25 nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal

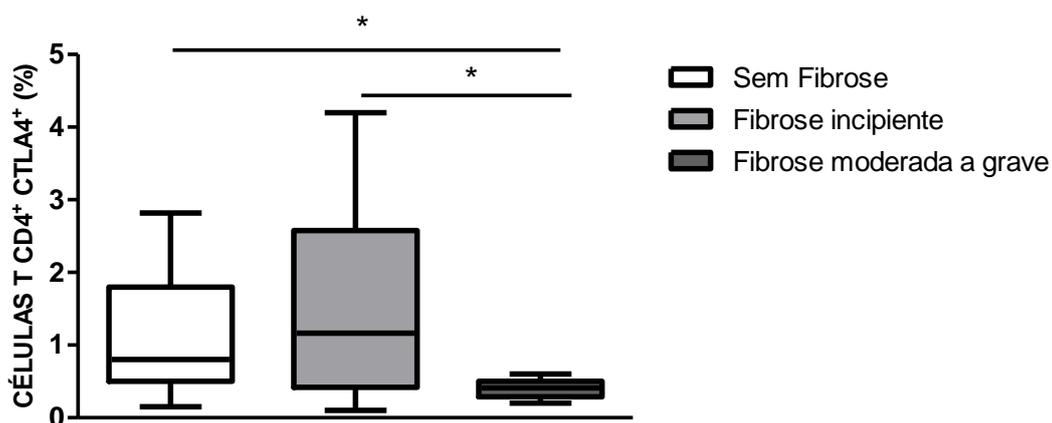
Em relação às células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> (Figura 5), observou-se menor frequência dessas células em indivíduos com fibrose moderada a grave (1,0%; 0,7% - 1,35%), quando comparada aos pacientes sem fibrose (1,8%; 1,1% - 2,9%) e com fibrose incipiente (1,75%; 0,85% - 3,5%;  $p < 0,05$ ).



**Figura 5. Frequência dos linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* com diferentes graus de fibrose periportal. Os resultados foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos e interquartis (\* $p < 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).**

## VI. 6. Frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> expressando CTLA-4 nos indivíduos com diferentes graus de fibrose periportal

A frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> foi avaliada nos três diferentes grupos de pacientes (Figura 6), e observou-se que indivíduos com fibrose moderada a grave apresentaram uma menor frequência destas células (0,41%; 0,2% - 0,6%), quando comparados aos indivíduos sem fibrose (0,8%; 0,15% - 2,8%) e com fibrose incipiente (0,16%; 0,1% - 4,2%;  $p < 0,05$ ).



**Figura 6. Frequência dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> CTLA-4** em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* com diferentes graus de fibrose periportal. Os resultados foram expressos em mediana, valores mínimos e máximos e interquartis (\* $p < 0,05$ ; Teste de Kruskal-Wallis).

## VIII. RESUMO DOS RESULTADOS

| Grupos                       |  | Sem fibrose | Fibrose Incipiente | Fibrose Moderada a Grave |
|------------------------------|--|-------------|--------------------|--------------------------|
| Fenótipos dos linfócitos     |  |             |                    |                          |
| Linfócitos TCD4 <sup>+</sup> | TCD4 <sup>+</sup>                      | +           | +                  | +                        |
|                              | TCD4 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>    | ++          | +                  | +++                      |
|                              | TCD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>    | +           | +                  | +                        |
|                              | TCD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>low</sup>  | +           | +                  | +                        |
|                              | TCD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>neg</sup>  | +           | +                  | +++                      |
|                              | TCD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>high</sup> | +++         | +++                | +                        |
|                              | TCD4 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup>  | +++         | +++                | +                        |
| Linfócitos TCD8 <sup>+</sup> | TCD8 <sup>+</sup>                      | +++         | +++                | +                        |
|                              | TCD8 <sup>+</sup> CD28 <sup>+</sup>    | +           | +                  | +                        |
|                              | TCD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>    | +           | +                  | +                        |

## IX. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi avaliada a freqüência de subtipos de linfócitos T e o grau de ativação destas células em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* apresentando diferentes graus de fibrose periportal, residentes na área endêmica de Água Preta, município de Gandu, no Sul da Bahia. A população da região vive exclusivamente da agricultura de subsistência e utilizam uma única fonte hídrica para o desenvolvimento das atividades domésticas, onde acontece a infecção pelo *S. mansoni*.

Os indivíduos incluídos no estudo foram, na maioria, do sexo feminino, não havendo, entretanto diferença na distribuição de gêneros entre os grupos de pacientes com diferentes graus de fibrose periportal. Os pacientes eram também equiparáveis em relação a carga parasitária do *S. mansoni*. Observou-se, porém, que os indivíduos sem fibrose periportal eram mais jovens do que os indivíduos com fibrose moderada a grave, corroborando com estudos de Alves-Oliveira e colaboradores (2006), que observaram que o desenvolvimento da fibrose periportal é um processo lento, ocorrendo geralmente em indivíduos com idade superior a 50 anos (Alves Oliveira, Moreno et al. 2006).

A população deste estudo já havia sido avaliada em relação a resposta imunológica, particularmente sobre o perfil de citocinas e quimiocinas produzidas pelas células mononucleares de sangue periférico *in vitro*. Foi documentado que os níveis de IL-5, uma citocina do perfil Th2 que está associada a proliferação e ativação de eosinófilos, e de TNF- $\alpha$ , uma citocina pro-inflamatória, foram mais altos em pacientes com fibrose, comparado àqueles sem fibrose. Por outro lado, as concentrações de IL-13, citocina também do padrão Th2 associada ao desenvolvimento de fibrose na esquistossomose experimental (Reiman, Thompson et al. 2006) e MIP-1 $\alpha$ , quimiocina inflamatória, foram mais elevadas nos indivíduos sem fibrose, quando comparados aos indivíduos com fibrose moderada a grave (Souza, Cardoso et al. 2012). Dando continuidade a este estudo do grupo, a população

de células T, assim como o grau de ativação dessas células foram avaliados no presente trabalho.

A frequência das células TCD4<sup>+</sup> não diferiu entre os grupos de pacientes com diferentes graus de fibrose periportal, estando as células TCD8<sup>+</sup> em menor frequência nos indivíduos com fibrose moderada a grave. A formação do granuloma é principalmente mediada pelos linfócitos TCD4<sup>+</sup> específicos para os antígenos dos ovos do parasita (Asahi and Stadecker 2003; Andrade 2009), e estas células participam também dos eventos de modulação da reatividade granulomatosa (Mathew and Boros 1986).

Estudos sobre os aspectos fenotípicos e funcionais dos linfócitos T durante a infecção crônica assintomática pelo *S. mansoni* demonstraram que tanto linfócitos TCD4<sup>+</sup> quanto TCD8<sup>+</sup> são fontes de IL-10, uma citocina moduladora da resposta imune altamente produzida durante a infecção crônica pelo *S. mansoni* (Teixeira-Carvalho, 2004). Não encontramos, entretanto, diferenças na frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup> nos pacientes incluídos nesse estudo, o que indica que numericamente essas células podem não diferir, mas o perfil das mesmas é muito importante e esse aspecto foi também avaliado neste trabalho. Em relação aos linfócitos TCD8<sup>+</sup>, são células envolvidas principalmente nas respostas antivirais e também possuem atividade antitumoral, embora apresentem também papel importante no controle de patógenos intracelulares através da produção de citocinas, particularmente do IFN- $\gamma$ .

Alguns autores têm demonstrado a participação das células TCD8<sup>+</sup> na esquistossomose, sendo as mesmas importantes no controle do granuloma e da morbidade da doença (Doughty and Phillips 1982; Oliveira-Prado, Caldas et al. 2009), podendo estar associado à produção de IL-10 (Teixeira-Carvalho, Martins-Filho et al. 2008). Tem sido demonstrado também um aumento da população das células TCD8<sup>+</sup> ativadas em pacientes na fase intestinal da esquistossomose (Martins-Filho, Cunha-Melo et al. 1999; Teixeira-Carvalho, 2004). Esses dados de literatura são concordantes com os nossos achados de maior frequência de linfócitos TCD8<sup>+</sup> em pacientes sem fibrose periportal. Por

outro lado, estudo conduzido por Zhang *et al* (2000) demonstrou que o infiltrado inflamatório hepático dos pacientes hepatoesplênicos era linfocítico, com predominância de células TCD8<sup>+</sup>, porém, neste estudo, não foi descartada a possibilidade de co-infecção esquistossomose/hepatite viral, sendo de qualquer modo um dado isolado que sugere a participação desta população celular na resposta granulomatosa (Zhang, Li et al. 2000). Além da frequência dos subtipos de linfócitos T, nesse estudo foi também avaliado o grau de ativação dessas células. Para a ativação das células T é necessário pelos menos dois sinais independentes. O primeiro é dado pela ligação do complexo peptídeo-complexo de histocompatibilidade principal (MHC) ao receptor de células T, e o segundo por um sinal co-estimulatório que decorre da ligação de moléculas associadas às células apresentadoras de antígenos (CAA) com aquelas expressas nos linfócitos.

A molécula CD28 é uma proteína de superfície celular, e é um das principais moléculas co-estimulatórias presentes nos linfócitos T. Ela liga-se ao receptor na CAA, o B7 (B7-1 ou B7-2), emitindo sinal para a ativação das células T. Uma vez ativadas, estas células passam a exibir um receptor homólogo chamado CTLA-4 (CD152), este, liga-se ao B7 com mais avides, e apesar de ser menos abundante que o CD28, consegue inibir a ativação das células T, e desta forma, limitar a produção do fator de crescimento de linfócitos T, a IL-2, resultando em regulação da resposta imune (Tsuyuki, Tsuyuki et al. 1997).

Neste estudo observamos que a frequência de células TCD4<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> foi maior em indivíduos com fibrose moderada a grave quando comparadas as células dos indivíduos com fibrose incipiente. Não houve, porém, diferença na frequência das células TCD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> entre os três grupos de pacientes. Estes achados foram discordantes daqueles encontrados por Martins-Filho e colaboradores (1999) que observaram uma associação entre a redução no percentual de linfócitos TCD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> e o desenvolvimento da forma grave da esquistossomose. De qualquer modo, os nossos resultados e o descrito acima sugerem que as células TCD8<sup>+</sup> devem estar relacionada à proteção contra o desenvolvimento das formas mais graves da esquistossomose (Martins-Filho,

Cunha-Melo et al. 1999). A molécula CD69 é outro marcador de ativação de células T, não sendo expresso em células em repouso. Essa molécula é rapidamente expressa seguindo a ativação das células T e induzem a proliferação dessas células através do aumento da síntese de IL-2 (Testi, Phillips et al. 1989). Na esquistossomose experimental em sido demonstrado que linfócitos derivados do granuloma hepático são mais ativados, e expressam, portanto muito mais a molécula CD69 e também o receptor de IL-2 (IL-2R) do que os linfócitos derivados do baço desses animais (Rumbley, Sugaya et al. 1999).

Em nosso estudo não observamos diferenças na frequência das células TCD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> entre os pacientes com diferentes graus de fibrose periportal. Em pacientes na fase crônica intestinal da esquistossomose foi observado uma diminuição da expressão da molécula CD69 em eosinófilos, em comparação àqueles com fibrose periportal (Hartnell, Robinson et al. 1993; Silveira-Lemos, Teixeira-Carvalho et al. 2008; Miki-Hosokawa, Hasegawa et al. 2009). Existem poucos trabalhos na literatura que avaliam a função da molécula CD69 expressa em linfócitos T na infecção pelo *S. mansoni*, entretanto, é bem conhecido o papel dessa molécula na ativação celular. A expressão de CD69 em eosinófilos de indivíduos asmáticos, por exemplo, associa-se a inflamação das vias aéreas (Hartnell, Robinson et al. 1993; Miki-Hosokawa, Hasegawa et al. 2009).

As células TCD4<sup>+</sup> virgens, na dependência do ambiente de citocinas a que é exposta no momento da apresentação antigênica, podem diferenciar-se em células T efetoras dos subtipos Th1, Th2, Th17 ou T regulatória (Treg). As células Treg têm sido descritas por desempenhar um papel fundamental no controle do sistema imunológico. A depender da forma como são originadas, as células T regulatórias podem ser classificadas em dois principais tipos. Uma delas surge a partir do timo como um subtipo distinto de células T maduras com fenótipo e funções específicas, as células regulatórias naturais que expressam a cadeia alfa do receptor de IL-2, a molécula CD25, e também pode expressar o fator de transcrição Foxp3 (Smith, Malone et al. 1997; Hori, Nomura et al. 2003; Nielsen, Holm et al. 2004). Outro tipo de célula regulatória

desenvolve-se a partir da diferenciação das células T virgens na periferia após o contato com elevadas concentrações de antígeno e citocinas específicas, as células T regulatórias induzidas tipo 1 (Tr1)(Weiner 1997; Akdis, Blesken et al. 1998; Yssel, Lecart et al. 2001). As células regulatórias TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> são importantes na prevenção da autoimunidade, na rejeição dos transplantes de órgãos e no câncer (Luhn, Simmons et al. 2007). Araújo e colaboradores (2007) (Araujo, Gomes et al. 2007) evidenciaram a presença destas células T reguladoras em pacientes com a doença de Chagas em várias formas de desenvolvimento da doença, e um outro trabalho tem associado as células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> ao controle da malária e prevenção da patologia devido a respostas inflamatórias excessivas na fase eritrocítica dessa doença (Bueno, Morais et al. 2010).

Nos últimos anos a expressão de CD25 nos linfócitos T foi melhor caracterizada, sendo consideradas células T respondedoras ou ativadas aquelas que apresentam baixa expressão de CD25 (TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>Low</sup>), as que não expressam essa molécula (TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>Neg</sup>) são as células efetoras mais jovens. As células que expressam altos níveis de CD25 (TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup>), por outro lado, apresentam potentes atividades supressoras da resposta imune, inibindo totalmente a proliferação celular e secreção de citocinas pelas células T respondedoras ativadas via contato célula-célula (Baecher-Allan, Brown et al. 2001). Além de agir na forma de contato célula-célula, os linfócitos TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> também podem agir através da síntese das citocinas regulatórias IL-10 e TGF-β (Miyamoto, Kaneko et al. 2005).

Neste estudo foi observado uma menor frequência de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> em indivíduos com fibrose moderada a grave, quando comparadas a pacientes sem fibrose e com fibrose incipiente. Esse dado está de acordo com o encontrado por Teixeira-Carvalho e colaboradores (2008), que demonstraram, pela primeira vez, uma elevada frequência de células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> em pacientes com a forma intestinal da esquistossomose, sugerindo que estas células regulatórias devem estar envolvidas no processo de controle da morbidade na infecção humana crônica pelo *S. mansoni*

(Teixeira-Carvalho, Martins-Filho et al. 2008). Evidências experimentais apontam para um possível envolvimento de células T reguladoras em infecções crônicas por outros helmintos, a exemplo dos ancilostomídeos, onde se observou um aumento de circulação de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, em comparação com indivíduos saudáveis, além de níveis altos de células Treg circulantes expressando várias moléculas, a exemplo de CTLA-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (Ricci, Fiuza et al. 2011). Adicionalmente, um trabalho em modelo experimental demonstrou que a infecção pelo *S. mansoni*, por induzir células TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> leva a uma significativa diminuição da resposta eosinofílica das vias respiratórias na asma alérgica (Pacífico, Marinho et al. 2009).

Com relação às células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>Low</sup> observamos que não houve diferença na frequência dessas células entre os três grupos avaliados, no entanto, os indivíduos com fibrose moderada a grave, apresentaram uma maior frequência de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>Neg</sup> quando comparados aos indivíduos sem fibrose e com fibrose incipiente. Isso sugere que associada a baixa frequência de células T com perfil regulatório nos pacientes com graus mais avançados de fibrose periportal, esses pacientes apresentam maior frequência de células T efetoras. Neste trabalho também avaliou-se a expressão da molécula coestimulatória CTLA-4, uma molécula expressa pelas células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup>, e estruturalmente homóloga a molécula CD28. Embora expressa em células T ativadas, a molécula CTLA-4 está associada com atividade de regulação. Observamos que a frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> nos indivíduos com fibrose moderada a grave foi menor, quando comparados aos indivíduos sem fibrose e com fibrose incipiente. Este dado sugere a participação de linfócitos expressando CTLA-4 como um mecanismo adicional de controle da resposta imune na esquistossomose crônica e prevenção da fibrose periportal nesses pacientes. Um trabalho experimental demonstrou uma maior participação de células expressando CTLA-4 do que expressando CD25 no controle da morbidade de camundongos infectados pelo *S. mansoni*, havendo maior regulação da resposta Th2 e da eosinofilia nos referidos animais (Walsh, Smith et al. 2007).

Resumidamente, foi encontrada nesse estudo uma elevada frequência de linfócitos T expressando moléculas associadas à ativação celular nos pacientes com fibrose periportal, coincidindo com uma baixa frequência de células expressando marcadores de regulação celular nesses pacientes. Estes dados contribuem para o entendimento dos mecanismos de patogenia na esquistossomose humana.

## **X. CONCLUSÃO**

A alta frequência de células T efetoras ativadas nos pacientes com fibrose periportal neste estudo, indica que estas células devem participar da patogênese da esquistossomose humana. Adicionalmente, a menor frequência de células T com o perfil regulatório nos pacientes com fibrose moderada a grave, reforça a hipótese da falta de modulação da resposta imune nestes pacientes.

## XI. SUMMARY

Schistosomiasis takes the second place in clinical and epidemiological magnitude of parasitic diseases in the world. The host immune response is essential for the protection and pathogenesis. The chronic phase is characterized by the production of Th2 cytokines, which are associated to the development of periportal fibrosis. Little is known about the phenotype and activation status of different subtypes of T cells in the process. **Objective:** To evaluate the phenotype and the degree of T cell activation in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. **Methods:** It was a cross-sectional study, conducted in the village of Agua Preta, Gandu-Bahia, which included 37 subjects with periportal fibrosis determined by ultrasound. Fifteen of them had incipient fibrosis, seven moderate to severe fibrosis and fifteen without fibrosis. Peripheral blood mononuclear cells were obtained by the Ficcol-hypaque gradient and frequency of TCD4<sup>+</sup> and TCD8<sup>+</sup>, as well as the expression of the surface markers CD28, CD69, CD25 and CTLA-4 were determined by flow cytometry. **Results:** There was no significant difference in the frequency of TCD4<sup>+</sup> cells in patients with different degrees of periportal fibrosis, however, individuals with moderate to severe fibrosis showed a lower frequency of TCD8<sup>+</sup> cells when compared to patients without fibrosis or incipient fibrosis. The frequency of TCD8<sup>+</sup>CD28<sup>+</sup> cells as well as TCD4<sup>+</sup>CD69<sup>+</sup> cells was higher in patients with incipient fibrosis when compared to those without fibrosis. Regarding the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>Low</sup>, there was no significant difference between groups, however, individuals with moderate to severe fibrosis presented a lower frequency of TCD4<sup>+</sup>CD25<sup>High</sup> cells when compared to patients without fibrosis or incipient fibrosis. The frequency of TCD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> cells in individuals with moderate to severe fibrosis was lower also than in patients without fibrosis or with incipient fibrosis. **Conclusion:** The high frequency of activated T cells in patients with fibrosis indicates that these cells might participate in the periportal fibrosis development in schistosomiasis. Additionally, the low frequency of T cells with regulatory profile in patients with moderate to severe fibrosis reinforces the hypothesis of a lack of regulatory immune response in these patients.

**Keywords:** Schistosomiasis, pathogenesis, periportal fibrosis, T lymphocytes.

## XII.REFERÊNCIAS

- Abdel-Wahab, M. F., G. Esmat, et al. "Grading of hepatic schistosomiasis by the use of ultrasonography." Am J Trop Med Hyg 46(4): 403-8, 1992.
- Akdis, C. A., T. Blesken, et al. "Role of interleukin 10 in specific immunotherapy." J Clin Invest 102(1): 98-106, 1998.
- Alves Oliveira, L. F., E. C. Moreno, et al. "Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans." Infect Immun 74(2): 1215-21, 2006.
- Andrade, Z. A. "Schistosomiasis and liver fibrosis." Parasite Immunol 31(11): 656-63, 2009.
- Araujo, F. F., J. A. Gomes, et al. "Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease." Front Biosci 12: 2797-806, 2007.
- Asahi, H. and M. J. Stadecker "Analysis of egg antigens inducing hepatic lesions in schistosome infection." Parasitol Int 52(4): 361-7, 2003.
- Baecher-Allan, C., J. A. Brown, et al. "CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood." J Immunol 167(3): 1245-53, 2001.
- Baptista, A. P. and Z. A. Andrade. "Angiogenesis and schistosomal granuloma formation." Mem Inst Oswaldo Cruz 100(2): 183-5, 2005.
- Bina, J. C. "Estudo de variáveis que podem influenciar na evolução da esquistossomose mansônica: efeito da terapêutica específica e da interrupção da transmissão." Rev. Patol. Trop. 26: 69-128, 1997.
- Bina, J. C. and A. Prata. "[Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I- Schistosoma mansoni infection and severe clinical forms]." Rev Soc Bras Med Trop 36(2): 211-6, 2003.
- Bluestone, J. A. and A. K. Abbas. "Natural versus adaptive regulatory T cells." Nat Rev Immunol 3(3): 253-7, 2003.
- Borish, L. C. and J. W. Steinke. "2. Cytokines and chemokines." J Allergy Clin Immunol 111(2 Suppl): S460-75, 2003.
- Brasil and M. d. Saúde. "Situação epidemiológica da esquistossomose no Brasil." Retrieved 05/05/2013, 2013, from [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao\\_esquistossomose\\_brasil\\_abril2011.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacao_esquistossomose_brasil_abril2011.pdf), 2010.
- Bueno, L. L., C. G. Morais, et al. "Plasmodium vivax: induction of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells during infection are directly associated with level of circulating parasites." PLoS One 5(3): e9623, 2010.

- Carvalho, O. S., P. M. Z. Coelho, et al. Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro, Editora Fiocruz, 2008.
- CDC and Centers. for. Disease Control and. Prevention. "Parasites - Schistosomiasis." Retrieved 05/05/2013, from <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/>, 2013.
- Cerri, G. G., V. A. Alves, et al. "Hepatosplenic schistosomiasis mansoni: ultrasound manifestations." Radiology 153(3): 777-80, 1984.
- Chiaromonte, M. G., A. W. Cheever, et al. "Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis." Hepatology 34(2): 273-82, 2001.
- Contigli, C., D. N. Silva-Teixeira, et al. "Phenotype and cytokine profile of Schistosoma mansoni specific T cell lines and clones derived from schistosomiasis patients with distinct clinical forms." Clin Immunol 91(3): 338-44, 1999.
- Cruvinel, W. M., et al, "Células T regulatórias naturais (TREGS) em doenças reumáticas." Rev. Bras. Reumatol 48, 2008.
- De Jesus, A. R., D. G. Miranda, et al. "Morbidity associated with Schistosoma mansoni infection determined by ultrasound in an endemic area of Brazil, Caatinga do Moura." Am J Trop Med Hyg 63(1-2): 1-4, 2000.
- De Jesus, A. R., A. Silva, et al. "Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni." J Infect Dis 185(1): 98-105, 2002.
- Doughty, B. L. and S. M. Phillips . "Delayed hypersensitivity granuloma formation around Schistosoma mansoni eggs in vitro. I. Definition of the model." J Immunol 128(1): 30-6, 1982.
- Fallon, P. G., E. J. Richardson, et al. "Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent." J Immunol 164(5): 2585-91, 2000.
- Fossiez, F. *et al.* "T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines." J Exp Med 183(6): 2593-603, 1996.
- Hartnell, A., D. S. Robinson, et al. "CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines." Immunology 80(2): 281-6, 1993.

- Henri, S., C. Chevillard, et al. "Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease." J Immunol 169(2): 929-36, 2002.
- Hori, S., T. Nomura, et al. "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science 299(5609): 1057-61, 2003.
- Katz, N., Almeida, K. "Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. ." Revista Ciência e Cultura. v. 55 - n-1: 38 – 43, 2003.
- Katz, N., P. M. Coelho, et al. "Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces." J Parasitol 56(5): 1032-3, 1970.
- Lambertucci, J. R. "Acute schistosomiasis: clinical, diagnostic and therapeutic features." Rev Inst Med Trop Sao Paulo 35(5): 399-404, 1993.
- Lambertucci, J. R. "Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered." Mem Inst Oswaldo Cruz 105(4): 422-35, 2010.
- Lambertucci, J. R., A. A. Rayes, et al. "Acute schistosomiasis: report on five singular cases." Mem Inst Oswaldo Cruz 92(5): 631-5, 1997.
- Luhn, K., C. P. Simmons, et al. "Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection." J Exp Med 204(5): 979-85, 2007.
- MacDonald, A. S., E. A. Patton, et al. "Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction." J Immunol 168(9): 4643-9, 2002.
- Machado, e. a. "Mecanismos de resposta imune às infecções." An bras Dermatol 79(6): 647-664, nov/dez, 2004.
- Martins-Filho, O. A., J. R. Cunha-Melo, et al. "Clinical forms of human *Schistosoma mansoni* infection are associated with differential activation of T-cell subsets and costimulatory molecules." Dig Dis Sci 44(3): 570-7, 1999.
- Mathew, R. C. and D. L. Boros. "Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection." Infect Immun 54(3): 820-6, 1986.
- Miki-Hosokawa, T., A. Hasegawa, et al. "CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation." J Immunol 183(12): 8203-15, 2009.

- Miyamoto, T., T. Kaneko, et al. "Prolonged skin allograft survival by IL-10 gene-introduced CD4 T cell administration." Int Immunol 17(6): 759-68, 2005.
- Niamey Working Group WHO 2000. Ultrasound in schistosomiasis. A practical guide to the standardized use of ultrasonography for the assessment of schistosomiasis related morbidity. World Health Organization/TDR/SCH/ULTRASON/document. Geneva, Switzerland. 2000.
- Nielsen, J., T. L. Holm, et al. . "CD4+CD25+ regulatory T cells: II. Origin, disease models and clinical aspects." Apmis 112(10): 642-50, 2004.
- Oliveira-Prado, R., I. R. Caldas, et al. "CD4 and CD8 distribution profile in individuals infected by *Schistosoma mansoni*." Scand J Immunol 69(6): 521-8, 2009.
- Oliveira. C.D., e. a. "Massa tumoral secundária a infecção por *Schistosoma mansoni* simulando neoplasia de pulmão: relato de caso." Rev Bras Ter Intensiva 21(4): 461-464, 2009.
- Pacifico, L. G., F. A. Marinho, et al. "Schistosoma mansoni antigens modulate experimental allergic asthma in a murine model: a major role for CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells independent of interleukin-10." Infect Immun 77(1): 98-107, 2009.
- Prata, A. R. A., E. S.; Rebouças, G.; Rocha, H.; Bina, J. C.; Warren, K. Aspectos peculiares da infecção por Schistosoma mansoni. Salvador, 1984.
- Qureshi, O. S., Y. Zheng, et al. "Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4." Science 332(6029): 600-3, 2011.
- Reiman, R. M., R. W. Thompson, et al. "Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity." Infect Immun 74(3): 1471-9, 2006.
- Ricci, N. D., J. A. Fiuza, et al. "Induction of CD4(+)CD25(+)FOXP3(+) regulatory T cells during human hookworm infection modulates antigen-mediated lymphocyte proliferation." PLoS Negl Trop Dis 5(11): e1383, 2011.
- Romagnani, S. "Regulation and deregulation of human IgE synthesis." Immunol Today 11(9): 316-21, 1990.
- Rumbley, C. A., H. Sugaya, et al. "Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma." J Immunol 162(2): 1003-9, 1999.
- Silveira-Lemos, D., A. Teixeira-Carvalho, et al. "Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients." Acta Trop 108(2-3): 150-9, 2008.

- Smith, D. H., D. C. Malone, et al. "A national estimate of the economic costs of asthma." Am J Respir Crit Care Med 156(3 Pt 1): 787-93, 1997.
- Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. Nat Rev Immunol. Feb;2(2):116-26, 2002.
- Souza, R. P., L. S. Cardoso, et al. "Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to Schistosoma mansoni Infection." J Parasitol Res 2012: 394981, 2012.
- Teixeira-Carvalho, A., O. A. Martins-Filho, et al. "Cytokines, chemokine receptors, CD4+CD25HIGH+ T-cells and clinical forms of human schistosomiasis." Acta Trop 108(2-3): 139-49, 2008.
- Teixeira-Carvalho, T. "Estudo de Aspectos Imunocitoquímicos Associados às formas clínicas da Esquistossomose mansônica humana." Tese de Doutorado, Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2004.
- Testi, R., J. H. Phillips, et al. "T cell activation via Leu-23 (CD69)." J Immunol 143(4): 1123-8, 1989.
- Tsuyuki, S., J. Tsuyuki, et al. "Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness." J Exp Med 185(9): 1671-9, 1997.
- Vidal, L., M., et al. "Considerações sobre esquistossomose mansônica no município de Jequié, Bahia." Revista Patologia Tropical. Vol. 40 (4): 367-382. out.-dez, 2011.
- Walsh, C. M., P. Smith, et al. "Role for CTLA-4 but not CD25+ T cells during Schistosoma mansoni infection of mice." Parasite Immunol 29(6): 293-308, 2007.
- Weiner, H. L. (1997). "Oral tolerance for the treatment of autoimmune diseases." Annu Rev Med 48: 341-51, 2007.
- WHO and World Organization Health.. "Schistosomiasis." Retrieved 05/05/2013, from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>, 2013.
- Wynn, T. A. "Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm." Nat Rev Immunol 4(8): 583-94, 2004.
- Wynn, T. A. "Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases." J Clin Invest 117(3): 524-9, 2007.

Wynn, T. A. "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." J Pathol 214(2): 199-210, 2008.

Yssel, H., S. Lecart, et al. "Regulatory T cells and allergic asthma." Microbes Infect 3(11): 899-904, 2001.

Zhang, S., Z. Li, et al. "Observation of T lymphocyte subsets in the liver of patients with advanced schistosomiasis and advanced schistosomiasis accompanied with hepatitis B." J Tongji Med Univ 20(2): 137-8, 2000.

## ANEXO I



### FICHA ULTRA-SONOGRÁFICA

#### IDENTIFICAÇÃO

1. Nome: \_\_\_\_\_ Identificação: 

|                |  |  |                  |  |
|----------------|--|--|------------------|--|
| <i>Família</i> |  |  | <i>Indivíduo</i> |  |
|                |  |  |                  |  |

2. Comunidade: \_\_\_\_\_

3. Data da avaliação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

#### 1 – FÍGADO

##### 1.1 Dimensões

1.1.1 Medida da linha média (cm): \_\_\_\_\_

1.1.2 Medida da linha médio-clavicular (cm): \_\_\_\_\_

1.1.3 Lobo direito abaixo do RCD: (a) Sim, sem inspiração  
profunda (b) Sim, à inspiração  
profunda (c) Não

1.1.4 Lobo esquerdo abaixo do AX: (a) Sim, sem inspiração profunda  
(b) Sim, à inspiração profunda  
(c) Não

1.2 Características da superfície do fígado: (a) Regulares (b) Irregulares

##### 1.3 Textura do parênquima hepático

1.3.1 Múltiplas áreas ecogênicas no fígado (espaços porta):  
(a) Presentes (b) Ausentes

1.3.2 Atenuação do feixe acústico posterior:  
(a) Presentes (b) Ausentes

1.4 Espessura de 4 espaços periportais (entre a 1ª e a 2ª divisão após os ramos esquerdo e direito da veia porta) (mm): 1. (\_\_\_\_\_) 2. (\_\_\_\_\_) 3. (\_\_\_\_\_) 4. (\_\_\_\_\_) Média \_\_\_\_\_

1.5 Espessura de 4 espaços periportais distais (entre a 2ª e a 3ª divisão após os ramos esquerdo e direito da veia porta) (mm): 1. (\_\_\_\_\_) 2. (\_\_\_\_\_) 3. (\_\_\_\_\_) 4. (\_\_\_\_\_) Média \_\_\_\_\_

1.6 Maior diâmetro da veia porta extra hepática (mm): \_\_\_\_\_

1.7 Diâmetro da veia porta (localização: ponto médio entre a entrada do hilo hepático e sua bifurcação dentro do fígado) (mm): \_\_\_\_\_

1.8 Espessura da parede da veia porta (mm): \_\_\_\_\_

**2 – VESÍCULA BILIAR** 2.1 Espessura da parede (mm): \_\_\_\_\_ 2.2 Presença de cálculos: (a) Sim (b) Não

### 3 – BAÇO

3.1 Tamanho do baço (cm): \_\_\_\_\_

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

3.3 Diâmetro da veia esplênica (mm): 3.3.1 Linha média (distal): \_\_\_\_\_

3.3.2 Hilo esplênico (proximal): \_\_\_\_\_

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

3.5 Veias gástricas curtas: (a) Individualizadas, medindo \_\_\_\_\_ mm

(b) Não individualizadas

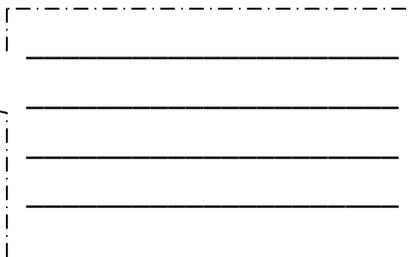
3.6 Sinais de varizes: 3.6.1 Esôfago distal: (a) Sim (b) Não

3.6.2 Fundo gástrico: (a) Sim (b) Não

3.6.3 Hilo esplênico: (a) Sim (b) Não

3.7 Ascite: (a) Presente (b) Ausente

3.8 Outros achados ultra-sonográficos relevantes:



3.9 Classificação: Média dos 4 espaços periportais centrais:

( ) GRAU 0 < 3 mm

( ) GRAU I 3 – 4,9 mm

( ) GRAU II 5 – 7 mm

( ) GRAU III > 7 mm

## ANEXO II

### PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP/MCO/UFBA  
MATERNIDADE CLIMÉRIO DE OLIVEIRA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
IORG0003460. Assurance FWA00002471, October 26, 2010  
IRB00004123, October 5, 2007 - October 4, 2010

Rua Augusto Vasques, s/nº, Castelo - Hospital Universitário Professor Edgard Souto, 41200-000, Salvador, Bahia  
Cep: 41.110-100 - Salvador, Bahia. telef: (71) 3033-0710 e-mail: c222000@ufba.br. homepage: www.cefec.ufba.br

#### PARECER/RESOLUÇÃO ADITIVA Nº 240/2008

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

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

*APROVADO*

Salvador, 29 de Outubro de 2008

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

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

## ANEXO III

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAR DO ESTUDO

**Nome do Projeto:** Avaliação dos fatores ambientais e imunológicos associados ao desenvolvimento de fibrose hepática secundária à esquistossomose mansônica

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

**Nome do Paciente:** \_\_\_\_\_

#### **Convite e Objetivo:**

Você está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo avaliar a associação entre a asma e a infecção por helmintos.

Esta participação implica na sua concordância em submeter-se, periodicamente, durante um ano, aproximadamente, a exames para determinar a presença de alergia e parasitoses, que consistem em: responder a um questionário com perguntas sobre alergias, submeter-se a exames clínicos, além de ultrassonografia de abdome e da coleta de amostras de sangue e de amostras de fezes.

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

#### **Participação Voluntária:**

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

#### **Finalidade do estudo:**

Este estudo tem a finalidade de avaliar os fatores associados ao desenvolvimento de fibrose hepática na esquistossomose mansônica.

#### **Procedimentos:**

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

**Duração do Estudo:**

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

**Confidencialidade:**

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe. Os resultados serão divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

**Análise dos Riscos e Benefícios:**

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

**Retorno dos Benefícios para o Sujeito e para a Sociedade:**

Estudos que contribuem para identificação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento de fibrose hepática secundária à esquistossomose.

As pessoas que se submeterem aos exames receberão, se desejarem, os resultados dos mesmos. No caso de detectarmos a presença de parasitas intestinais, você será tratado gratuitamente.

**Custos:**

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

**Esclarecimentos:**

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

**Consentimento:**

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

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante

\_\_\_\_\_  
RG nº

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

\_\_\_\_\_  
RG nº

Local: \_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hora: \_\_\_\_\_

**ANEXO IV**

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES  
DE 18 ANOS**

**Projeto:** Avaliação da Resposta Imune em indivíduos com diferentes graus de fibrose hepática secundária a esquistossomose

**Investigador Principal :** Maria Ilma Andrade Santos Araújo, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia- Brazil.

**Comitê de Ética:** Maternidade Climério de Oliveira/UFBA (CEP/MCO/UFBA), situado à rua Padre Feijó 240, Ambulatório Magalhães Neto, 30 andar, Canela-Salvador-Bahia. Tel: 71-3203-2740

**Nome do paciente:** \_\_\_\_\_

**Convite e objetivo:** Você está sendo convidado (a) a participar de um estudo que tem como objetivo

avaliar a associação entre a asma e a infecção por helmintos.

Esta participação implica na sua concordância em submeter-se, periodicamente, durante um ano, aproximadamente, a exames para determinar a presença de alergia e parasitoses, que consistem em responder a um questionário com perguntas sobre alergias, submeter-se a exames clínicos, além de ultrassonografia de abdome e da coleta de amostras de sangue e de amostras de fezes.

Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Para o exame de sangue nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de duas colheres de sopa ou uma xícara de café pequena) de seu braço usando uma seringa e agulhas descartáveis para realizar alguns exames que ajudarão a explicar a doença. Nós esperamos através deste estudo esclarecer mais sobre a esquistossomose, entendê-la e assim poderemos preveni-la no futuro.

**Você pode não participar deste estudo. Se você aceita participar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.**

---

Assinatura ou impressão do paciente Data Hora

---

Assinatura ou impressão do responsável Data Hora

---

Testemunha Data Hora

#### COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

---