

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP

**AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM ANTICORPOS MONOCLONAIS:  
ANTI-CTLA4 (9H10) E ANTI- CD28 (PV-1) NA ESQUISTOSSOMOSE  
MANSÔNICA MURINA**

LAÍS CRISTINA DE SOUZA

São Carlos – SP

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS  
DEPARTAMENTO DE MORFOLOGIA E PATOLOGIA – DMP

**Avaliação do tratamento com anticorpos monoclonais: anti-CTLA4 (9H10) e anti-  
CD28 (PV-1) na esquistossomose mansônica murina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos,  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biotecnologia.

LAÍS CRISTINA DE SOUZA

Orientadoras: Prof.<sup>a</sup> Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Prof.<sup>a</sup> Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

Co-orientador: Prof. Dr. Auro Nomizo

São Carlos – SP

2011

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S729at

Souza, Laís Cristina de.

Avaliação do tratamento com anticorpos monoclonais : anti-CTLA4 (9H10) e anti- CD28 (PV-1) na esquistossomose mansônica murina / Laís Cristina de Souza. -- São Carlos : UFSCar, 2012.  
126 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Biotecnologia. 2. Moléculas coestimulatórias. 3. Esquistossomose mansônica. 4. Tratamento anti-CTLA4. 5. Tratamento anti- CD28. I. Título.

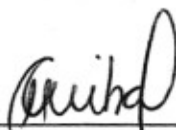
CDD: 660.6 (20<sup>a</sup>)

**Lais Cristina de Souza**

Dissertação de Mestrado submetida  
à Coordenação do Programa de  
Pós-Graduação em Biotecnologia,  
da Universidade Federal de São  
Carlos, como requisito parcial para  
a obtenção do título de Mestre em  
Biotecnologia

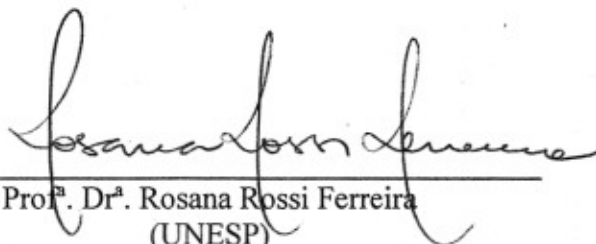
**Aprovado em: 27/10/2011**

**BANCA EXAMINADORA**



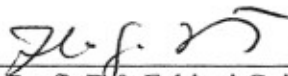
---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda de Freitas Anibal (Orientadora)  
(UFSCar)



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosana Rossi Ferreira  
(UNESP)



---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabiani Gai Frantz  
(USP)

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais  
Angela e Roberto, aos meus irmãos Lucas e  
Ligia pelo incentivo, apoio, amor e dedicação  
sempre. Ao meu querido namorado João Paulo  
pela presença, pelo amor e companheirismo em  
todos os momentos. Sem vocês eu não teria  
chegado até aqui. Obrigada!*

## **Agradecimentos**

*Primeiramente gostaria de agradecer a Deus que me fez conseguir chegar até aqui, e seguir meu destino mantendo a minha fé e me fazendo superar os momentos de provação e dificuldade.*

*Gostaria de agradecer aos meus pais Angela e Roberto, que me ensinaram sempre seguir os caminhos do bem e a ter caráter, que me geraram e amarão por toda a vida. Agradeço pelo carinho, amor, paciência e atenção que sempre me dedicaram, por nunca deixar nada faltar e por serem exemplos de PESSOAS as quais tenho orgulho de seguir. Obrigada por nunca deixarem de acreditar em mim, amo vocês mais do que se possa traduzir em simples palavras.*

*Agradeço meus irmãos Ligia e Lucas, pela paciência e compreensão na minha ausência. Amo muito vocês, obrigada por existirem em minha vida. Ligia, obrigada por ser um exemplo de profissional e Lucas, obrigada por ser meu “irmãozinho” e confiar em meus ensinamentos.*

*Minhas avós Victalina e Alzira e avôs Bernardino e Diniz, vocês estarão eternamente guardados em meu coração aonde quer que eu vá. Vocês são muito especiais em minha vida. Obrigada pela admiração e carinho que tem por mim!*

*Em especial agradeço a uma pessoa que está na minha vida há anos, meu querido e amado namorado João Paulo, pelos momentos que me ajudou com palavras amigas, pela paciência, compreensão pelos dias que não pude estar ao seu lado devido a minha dedicação aos estudos, obrigada por ser essa pessoa maravilhosa que me proporciona momentos felizes e agradáveis quando estamos juntos.*

*Agradeço também, aos familiares do meu namorado pela admiração e incentivo, em especial agradeço dois “anjinhos” que surgiram em minha vida, Maria Virginia e Davi que me proporcionam momentos de amor e paz.*

*Aos meus queridos animais de estimação Max e Nina que me proporcionam momentos felizes, em especial ao Caiul que se tornou uma “estrelinha” no céu e estará eternamente guardado em meu coração aonde quer que eu vá.*

*Depois dos agradecimentos aos familiares gostaria de agradecer a equipe do laboratório – LAP: Naiara Dejani, Joice Rodolpho, Sandra Oliveira, Débora Neris e Ricardo Correia que contribuíram para que este trabalho fosse concluído, obrigada a todos pela dedicação, incentivo e esforço principalmente nos dias de experimentos.*

*As pessoas maravilhosas que surgiram na minha vida Naiara Dejani, Joice Rodolpho, Sandra Oliveira, Débora Neris e Danilo Arantes pela amizade e carinho, e saibam que cada um de vocês possui um valor único e especial para mim, obrigada a todos pelos momentos amigáveis e felizes que me proporcionaram, vocês nunca deixarão de existir no meu coração.*

*A minha querida orientadora Fernanda de Freitas Anibal e “mãe de coração”, pela qual eu tenho imensa admiração, respeito e carinho. Fer, tenho que te agradecer não apenas pela oportunidade que me deu de estar em seu laboratório realizando esse trabalho, me orientando, confiando em mim, acreditando nas minhas possibilidades e no meu crescimento como profissional. Quero te agradecer pelas conversas científicas ou não, pelos sorrisos que sempre me fez dar, pela amizade e incentivo profissional. Você é alguém que trabalha muito, e apesar do reconhecimento nem sempre chegar, nossa equipe do LAP sabe o quanto você se desdobra para fazer tudo da melhor forma possível, obrigada por tudo!*

*Gostaria de agradecer também a todos os professores, equipes de outros laboratórios e fomento, listados abaixo, por terem contribuído com o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.*

*- Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, co-orientador, pessoa que tive a honra de conhecer e a oportunidade de trabalhar. Obrigada pela dedicação e pelos ensinamentos.*

*- Aos Professores: Dra. Fabiani Frantz, Dr. Cláudio Suazo, Dra. Yara Valim, Dr. Vanderlei Rodrigues, Dr. Edson Soares, Dra. Lucia Faccioli e Dra. Heloísa Araújo, pelas valiosas contribuições que possibilitaram a realização deste trabalho.*

*- As equipes - técnicos dos laboratórios: Mara Brigoto, Fabiana Moraes, Ana Azzolini, Ana Soares e Aline Galvão. E alunos: Isabela Ferreira, Denise Silveira, Ciro Lino, Bruna Silva e André Barros.*

*- A FAPESP que contribuiu com apoio financeiro.*

*Gostaria de agradecer por todos aqueles que de uma forma ou de outra fizeram parte da minha formação e que por uma razão ou outra esqueci de colocar aqui.*

## Resumo

A esquistossomose mansônica representa um dos grandes problemas de Saúde Pública acometendo, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 210 milhões de indivíduos no mundo todo. No hospedeiro infectado, a doença é caracterizada pela presença de granuloma, resultado imunopatológico do infiltrado celular e em muitos casos consequência de fibrose tecidual. Dessa forma, a relação parasito-hospedeiro pode levar a morbidade devido à doença resultar em hepatoesplenomegalia, fibrose hepática e ascite. O processo granulomatoso na esquistossomose é dependente de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e requer recrutamento e acúmulo de células inflamatórias no sítio de deposição dos ovos. A fibrose esquistossomótica é resultado da reação granulomatosa que se desenvolve em resposta a antígenos liberados pelos ovos do *Schistosoma mansoni* retidos nas veias portais de menor calibre. A patologia causada em hospedeiros com *S. mansoni* é mediada pela resposta imune, por células T através da disseminação dos ovos que são alojados no fígado e intestino. Manipulações para a interação entre moléculas B7 de células apresentadoras de antígenos (APC) e receptores CD28/CTLA4 de células T modulam, e em algumas circunstâncias, bloqueiam a resposta imunopatológica *in vivo*. O CTLA4 é estruturalmente homólogo ao CD28, mas é expresso nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> recém ativadas, e sua função é inibir a ativação de células T pela inibição dos sinais liberados pelo CD28. Assim, o CTLA4 está envolvido na finalização das respostas das células T. A maneira pelos quais os dois receptores liberam sinais opostos e reconhecem a mesma molécula B7 das APC é uma intrigante questão e motivo de pesquisa. Esses sinais coestimulatórios podem ter diferentes papéis nos vários tipos de resposta imune. Dessa forma a estratégia de utilizar o tratamento com anticorpos monoclonais (mAb) anti-CTLA4 e anti-CD28 na esquistossomose mansônica murina foi de avaliar a modulação da resposta inflamatória e parasitária induzida pelo *S. mansoni* quando CTLA4 e CD28 fossem bloqueados. Nossos resultados mostraram que o tratamento com (mAb) anti moléculas coestimulatórias CTLA4 e CD28 favoreceram alterações no número de leucócitos, modulações nos níveis de anticorpos circulantes, citocinas, e do perfil da resposta T *helper* (Th) e alteração na atividade parasitária. Nossos dados demonstraram que, a redução da carga parasitária foi de 21,3% no grupo tratado com mAb anti-CTLA4 e 46,2% no grupo tratado com anti-CD28. Sugerindo que, estes tratamentos devem ser considerados interessantes candidatos para imunoterapia e para maiores investigações, uma vez que se faz necessário conhecer melhor a resposta destas moléculas na esquistossomose mansônica que quando bloqueadas ou não apresentaram a hipotética atividade antiparasitária e antiinflamatória nesse modelo.

**Palavras-Chave:** moléculas coestimulatórias CTLA4 e CD28, esquistossomose mansônica, tratamento anti-CTLA4 e anti-CD28.



## Abstract

Schistosomiasis mansoni is a major problem affecting public health, according to World Health Organization (WHO), 210 million individuals worldwide. In the infected host, the disease is characterized by the presence of granuloma, immunopathological outcome of the cellular infiltrate and in many cases a consequence of tissue fibrosis. Thus, the host-parasite relationship may lead to morbidity from the disease result in hepatosplenomegaly, hepatic fibrosis and ascites. The granulomatous process in schistosomiasis is dependent on CD4 + and requires recruitment and accumulation of inflammatory cells at the site of deposition of eggs. Schistosomal fibrosis is the result of granulomatous reaction that develops in response to antigens released by eggs of *Schistosoma mansoni* retained in the portal veins of smaller caliber. A host of disease caused by *S. mansoni* is mediated by the immune response by T cells through the dissemination of eggs that are housed in the liver and intestine. Manipulation of the interaction between B7 molecules of antigen presenting cells (APC) and T cell receptors CD28/CTLA4 modulate, and in some circumstances block the immunological response in vivo. The CTLA4 is structurally homologous to CD28 but is expressed in CD4 + and CD8 + newly activated, and its function is to inhibit T cell activation by inhibiting the signals released by CD28. Thus, CTLA4 is involved in the completion of T cell responses The way in which the two receptors release opposite signs and recognize the same molecule B7 of APC is an intriguing question and a matter of research. Coestimulatory these signals may have different roles in various types of immune response. Thus the treatment strategy of using monoclonal antibodies (mAb) anti-CTLA4, anti-CD28 in murine schistosomiasis was to evaluate the modulation of inflammatory response and parasite-induced *S. mansoni* as CTLA4 and CD28 were blocked. Our results showed that treatment with (mAb) anti CD28 and CTLA4 molecules coestimulatory favored changes in the number of leukocytes, modulations in the levels of circulating antibodies, cytokines, and the response profile of T helper (Th) and change in the parasitic activity. Our data showed that the reduction of parasite burden was 21.3% in the group treated with anti-CTLA4 mAb and 46.2% in the group treated with anti-CD28. Suggesting that these treatments should be considered interesting candidates for immunotherapy and for further investigation, since it is necessary to better understand the response of these molecules in schistosomiasis mansoni that when blocked or did not show the hypothetical anti-parasitic and anti-inflammatory activity in this model.

**Keywords:** CD28 and CTLA4 molecules coestimulatory, schistosomiasis, anti-CTLA4 and anti-CD28.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Esquistossomose mansônica .....	16
1.2 Granuloma na esquistossomose .....	20
1.3 Ativação e inibição de Células T .....	21
1.4 Imunobiologia da Esquistossomose mansônica.....	22
1.5 Moléculas coestimulatórias, células T e a esquistossomose.....	25
1.6 Tratamento da Esquistossomose mansônica.....	28
2.OBJETIVOS .....	30
2.1 Objetivo Geral.....	30
2.2 Objetivos específicos .....	30
3.MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1 Animais.....	31
3.2 Obtenção das larvas infectantes do Schistosoma mansoni .....	31
3.3 Infecções dos camundongos com as larvas infectantes (cercárias) do Schistosoma mansoni.....	32
3.4 Procedimento experimental utilizado na obtenção dos anticorpos anti-CTLA4 e Anti-CD28 através do cultivo dos hibridomas (PV-1 e 9H10).....	34
3.5 Tratamento com anticorpos monoclonais .....	38
3.6 Avaliação Pulmonar: Fase pré – ovular .....	38
3.6.1 Homogenato do pulmão .....	39
3.7 Fase pós – ovular .....	39
3.8 Avaliação Celular .....	40
3.8.1 Obtenções das células do LBA, do LCP e do Sangue.....	40
3.8.2 Contagem global (total) e diferencial de leucócitos dos lavados LBA e LCP e do Sangue .....	43
3.9 Ensaio Imunoenzimático – ELISA .....	43

3.9.1 Para detecção de citocinas.....	43
3.9.2 Para detecção de anticorpos .....	44
3.10 Avaliação da Carga Parasitária .....	45
3.10.1 Recuperação de vermes adultos do sistema porta-hepático .....	45
3.10.2 Contagem de ovos nas fezes.....	46
3.10.3 Viabilidade dos ovos – Oograma .....	48
3.11 Estudos Histológicos e Microfotografias.....	50
3.12 Análise Por Citometria de Fluxo Para Receptor de Linfócitos: CTLA4 e CD28 (fascanto).....	50
3.13 Análise Estatística.....	52
4. RESULTADOS .....	53
4.1 Pesquisa dos Anticorpos anti-CTLA4 e anti-CD28, produzidos pelos hibridomas 9H10 e PV1 respectivamente, através do Ensaio Imunoenzimático - ELISA.....	53
4.2 Viabilidade dos hibridomas para produção dos anticorpos .....	55
4.3 Purificação do sobrenadante da cultura de biorreator e soro de hamster em coluna de troca iônica.....	57
4.4 Avaliação Celular .....	59
4.5 Contagem global (total) de células no 12° dia pós infecção.....	59
4.6 Contagem diferencial de eosinófilos no 12° dia pós infecção.....	61
4.7 Contagem diferencial de células mononucleares no 12° dia pós infecção .....	63
4.8 Contagem global (total) de células no 64° dia pós infecção.....	65
4.9 Contagem diferencial de eosinófilos no 64° dia pós infecção .....	67
4.10 Contagem diferencial de células mononucleares no 64° dia pós infecção .....	69
4.11 Contagem global (total) de células no 100° dia pós infecção.....	71
4.12 Contagem diferencial de eosinófilos no 100° dia pós infecção .....	73
4.13 Contagem diferencial de mononucleares no 100° dia pós infecção .....	75
4.14 Avaliação das citocinas no 12° dia pós infecção .....	77
4.15 Avaliação das citocinas no 64° dia pós infecção .....	79

4.16 Avaliação da citocina IL-10 no 64° e 100° dia pós infecção.....	81
4.17 Avaliação dos anticorpos circulantes no 64° e 100° dia pós infecção.....	83
4.18 Avaliação da Carga Parasitária no 48° dia pós infecção .....	86
4.19 Avaliação da Carga Parasitária no 85° dia pós infecção .....	88
4.20 Viabilidade dos ovos.....	90
4.21 Número de vermes recuperados no 64° dia pós infecção .....	92
4.22 Número de vermes recuperados no 100° dia pós infecção .....	94
4.23 Histologia hepática no 64° dia pós infecção .....	96
4.24 Histologia hepática no 100° dia pós infecção .....	99
4.25 Avaliação do tratamento de bloqueio das moléculas coestimulatórias CTLA4 e CD28 em células de linfonodo mesentérico .....	102
5.DISSCUSSÃO .....	106
6.CONCLUSÕES .....	116
7.REFERÊNCIAS .....	117
ANEXO 1 .....	126

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**9H10** – Hibridoma secretor de anticorpos anti-CTLA4

**APC** – *Antigen-presenting cell*

**Ag** – Antígeno

**CD** – *Cluster of differentiation*

**CO<sub>2</sub>** – Dióxido de carbono

**CTLA 4** – *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*

**D. O.** – Densidade óptica

**EDTA** - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

**ELISA** - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

**EPM** - Erro padrão da média

**FDA** - *Food and Drug Administration*

**FITC** – *Fluorescein isothiocyanate*

**FIG.** – Figura

**GITR** - *Glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*

**H.E** - Hematoxilina/Eosina

**Ig** – Imunoglobulina

**IL**- Interleucina

**IFN- $\gamma$**  – *Interferon gama*

**i.p.** – intraperitoneal

**LBA** – Lavado da cavidade broncoalveolar

**LCP** – Lavado da cavidade peritoneal

**mAb** – *Monoclonal antibodies*

**MHC** – *Major histocompatibility complex*

**NaCl** – Cloreto de sódio

**NOD** - *Non-obese diabetic*

**OMS** - Organização Mundial de Saúde

**PBMC** – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

**PBS** - *Phosphate Buffered Saline*

**PE** - *Phycoerythrin*

**PELLET** - *Small particles typically created by compressing an original material*

**PM** – Peso molecular

**PV-1** – Hibridoma secretor de anticorpos anti-CD28

**PZQ** – Praziquantel

**RPMI 1640**- *Roswell Park Memorial Institute* - série 1640

**SBF** – Soro bovino fetal

**s.c.** – Subcutânea

**SEA** – *Soluble egg antigens*

**SWAP** – *Adult worm antigen preparations*

**TCR** – *T Cell Receptor*

**Th** – Células T helper

**TM** - Tricrômico de Masson

**TNF- $\alpha$**  – *Tumor necrosis factor-alpha*

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Distribuição da esquistossomose no Brasil .....	17
FIGURA 2. Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	19
FIGURA 3. O granuloma na Esquistossomose mansônica.....	21
FIGURA 4. Ativação e Inibição de Células T .....	22
FIGURA 5. Caracterização do desenvolvimento da Resposta Imune durante a infecção por <i>S. mansoni</i> .....	33
FIGURA 6. Biorreator de 500mL frasco tipo spinner .....	36
FIGURA 7. LBA - lavado broncoalveolar – pulmão.....	41
FIGURA 8. LCP - lavado da cavidade peritoneal – peritônio.....	41
FIGURA 9. Sangria por punção cardíaca .....	42
FIGURA 10. Representação: avaliação da Carga Parasitária .....	46
FIGURA 11. Kit Kato-Katz: Contagem de Ovos nas fezes.....	47
FIGURA 12. Contagem de Ovos nas fezes.....	47
FIGURA 13. Viabilidade dos ovos – Oograma: Lâmina.....	49
FIGURA 14. Representação: viabilidade dos ovos – Oograma: Estágios .....	49
FIGURA 15. Aparelho FACSCanto, FCFRP-USP.....	51
FIGURA 16. Aparelho FACSCanto, FCFRP-USP.....	52
FIGURA 17. Densidade óptica dos Anticorpos anti-CD28 .....	54
FIGURA 18. Densidade óptica dos Anticorpos anti-CTLA4 .....	54
FIGURA 19. Avaliação da viabilidade e crescimento do hibridoma PV1 .....	56
FIGURA 20. Avaliação da viabilidade e crescimento do hibridoma 9H10.....	56
FIGURA 21. Contagem global (total) de células 12 dias pós infecção no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.....	60
FIGURA 22. Contagem diferencial de eosinófilos 12 dias pós infecção no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.....	62
FIGURA 23. Contagem diferencial de células mononucleares 12 dias pós infecção no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.....	64
FIGURA 24. Contagem global (total) de células 64 dias pós infecção no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.....	66
FIGURA 25. Contagem diferencial de eosinófilos 64 dias pós infecção no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.....	68
FIGURA 26. Contagem diferencial de células mononucleares 64 dias pós infecção no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.....	70
FIGURA 27. Contagem global (total) de células 100 dias pós infecção no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal .....	72

FIGURA 28. Contagem diferencial de eosinófilos 100 dias pós infecção no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.....	74
FIGURA 29. Contagem diferencial de células mononucleares 100 dias pós infecção no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.....	76
FIGURA 30. Avaliação das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e IL-12 pg/mL no 12 <sup>o</sup> dia pós infecção.....	78
FIGURA 31. Avaliação das citocinas IL-4, IL-5 e INF-gama pg/mL no 64 <sup>o</sup> dia pós Infecção...	80
FIGURA 32. Avaliação da citocina IL-10 pg/mL no 64 <sup>o</sup> e 100 <sup>o</sup> dia pós infecção.....	82
FIGURA 33. Níveis de anticorpos anti- <i>S. mansoni</i> presentes no plasma no 64 <sup>o</sup> dia pós infecção .....	84
FIGURA 34. Níveis de anticorpos anti- <i>S. mansoni</i> presentes no plasma no 100 <sup>o</sup> dia pós infecção .....	85
FIGURA 35. Número de ovos por grama de fezes, 48 dias pós infecção.....	87
FIGURA 36. Número de ovos por grama de fezes, 85 dias pós infecção.....	89
FIGURA 37. Estágio de desenvolvimento dos ovos no 64 <sup>o</sup> dia pós infecção .....	91
FIGURA 38. Estágio de desenvolvimento dos ovos no 100 <sup>o</sup> dia pós infecção .....	91
FIGURA 39. Número de vermes recuperados 64 dias pós infecção.....	93
FIGURA 40. Número de vermes recuperados 100 dias pós infecção.....	95
FIGURA 41. Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> e tratados ou não 64 <sup>o</sup> dia pós infecção (HE).....	97
FIGURA 42. Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> tratados ou não 64 <sup>o</sup> dia pós infecção (TM).....	98
FIGURA 43. Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> e tratados ou não 100 <sup>o</sup> dia pós infecção (HE).....	100
FIGURA 44. Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> tratados ou não 64 <sup>o</sup> dia pós infecção (TM).....	101
FIGURA 45. Avaliação do tratamento de bloqueio da molécula coestimulatória CD28 em células de linfonodo mesentérico.....	104
FIGURA 46. Avaliação do tratamento de bloqueio da molécula coestimulatória extracelular CTLA4 em células de linfonodo mesentérico .....	104
FIGURA 47. Avaliação do tratamento de bloqueio da molécula coestimulatória intracelular CTLA4 em células de linfonodo mesentérico .....	105



LISTA DE TABELA

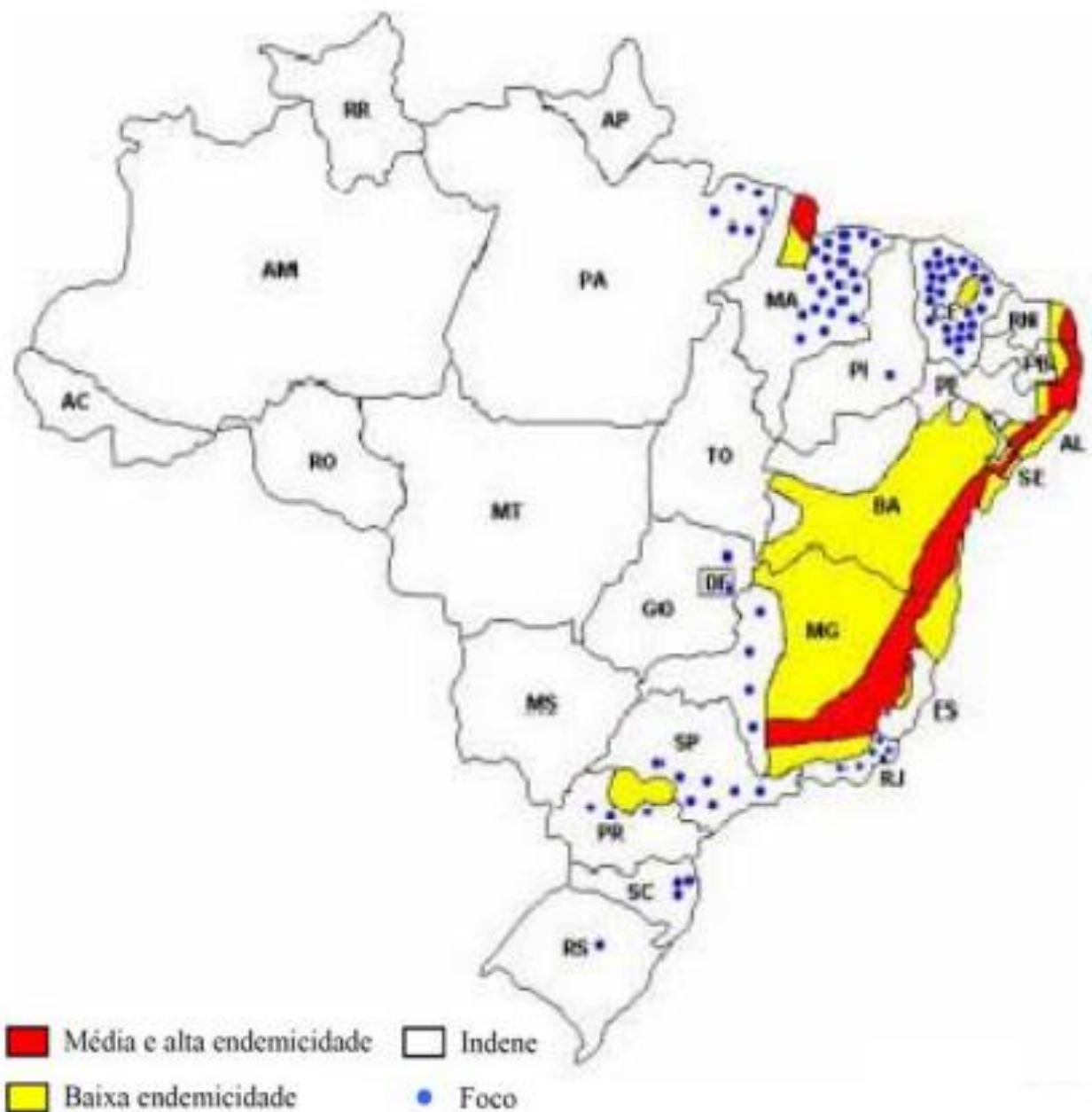
TABELA 1. Quantificação dos anticorpos .....58

## **1. INTRODUÇÃO**

Estudos da Organização Mundial da Saúde (O.M.S.) demonstram que, as doenças infecciosas, considerando o alto impacto devido ao número de pessoas afetadas e importante alteração na qualidade de vida dessas pessoas, recebem pouco investimento para pesquisas e desenvolvimento de tratamentos. Portanto, essas doenças são denominadas negligenciadas, no qual estas são promovidas em condições de pobreza e falta de saneamento, ocorrendo principalmente em áreas rurais em países das Américas, África e Ásia. Em geral produzem infecções crônicas, resultando em longos períodos de inaptidão, com significativo impacto no desenvolvimento econômico e educacional de populações. (BOTTAZI et al., 2006; HOTEZ et al., 2006) Entre as doenças negligenciadas que ocorrem no Brasil está a esquistossomose mansônica. Neste contexto, a esquistossomose mansônica aparece como uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo, sendo endêmicas em 76 países e territórios distribuídos pela África, Ásia e Américas. (ENGELS et al., 2002)

### **1.1 Esquistossomose mansônica**

Popularmente conhecida como xistose, doença do caramujo ou barriga d'água, a esquistossomose mansônica é considerada uma das mais importantes doenças helmínticas, endêmica em muitas regiões no mundo. Esta representa um dos grandes problemas de Saúde Pública, acometendo 210 milhões de indivíduos em todo o mundo. Aproximadamente 779 milhões vivem em áreas de risco em 76 países, segundo a O.M.S.(WHO, 2010) Dentre estes 60 milhões apresentam manifestações anatômicas e 6 a 12 milhões têm manifestações clínicas graves da doença. (SOARES, 2007) No Brasil, a doença está distribuída em 18 estados (Figura 1), com maior prevalência nas regiões Nordeste e Sudeste e mais de 25 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas, sendo os estados de Minas Gerais e Bahia os que apresentam maior incidência. (KATZ & PEIXOTO, 2000; BINA & PRATA, 2003)



**FIGURA 1. Distribuição da esquistossomose no Brasil.**

Fonte: Gerência do Programa Nacional de Controle da Esquistossomose- Secretaria de Vigilância em Saúde/MS, 2008.

Na clínica médica, a esquistossomose mansônica apresenta causa etiológica e modelo biológico de transmissão. Esta doença parasitária é causada por um trematódeo do gênero *Schistosoma*, da espécie *mansoni* pertencente à família Schistosomatidae e seu diagnóstico é realizado com base em exames parasitológicos, clínicos e laboratoriais. (DINIZ, 2009)

O modelo biológico envolve a contaminação de coleções hídricas por fezes de

indivíduos infectados contendo ovos de *Schistosoma mansoni*. A contaminação pode ocorrer em função da eliminação de dejetos próximos às margens de rios, córregos, lagoas e açudes ou por despejo direto dos dejetos nas coleções hídricas. Seja qual for a forma de contaminação, esta se dá onde não há rede adequada de esgoto sanitário. Ao entrar em contato com a água, os ovos de *S. mansoni* eclodem liberando as larvas ciliadas, os miracídios, que possuem afinidade quimiotática com o hospedeiro intermediário, o caramujo (família Planorbidae), e os infectam, este pertencente ao gênero *Biomphalaria* e uma espécie de grande importância é a *glabrata*. Porém no Brasil as espécies *glabrata*, *straminea* e *tenagophila* também estão envolvidas na disseminação da esquistossomose. Depois de passado o estágio de maturação são liberadas as formas infectantes para os seres humanos, as cercárias. Quando os hospedeiros entram em contato com a água contaminada, ficam expostos à infecção (Figura 2). (BARBOSA et al., 2008)

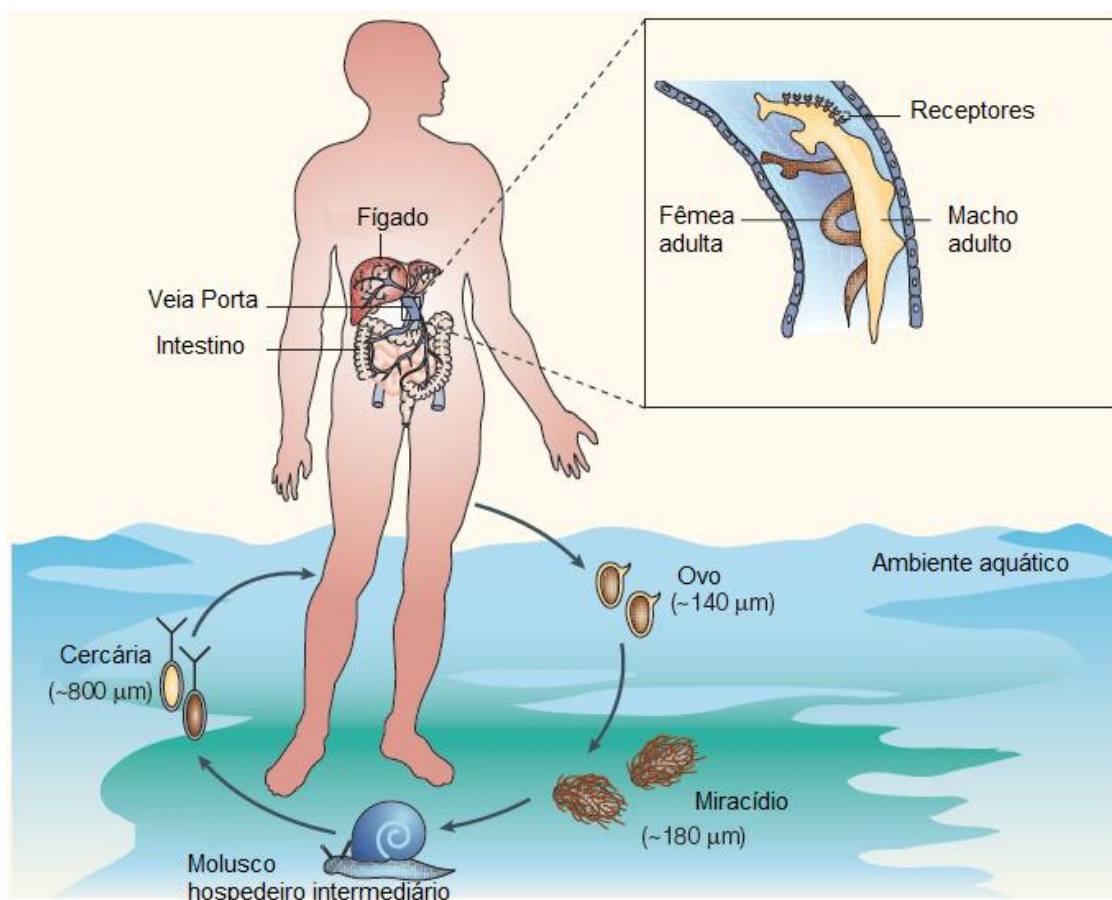
Após a invasão das cercárias na pele inicia-se a transformação destas em esquistossômulos, devido à perda da cauda, assim o parasito necessita se deslocar da epiderme em direção à derme e sair para via sanguínea ou linfática. Após saírem da pele, os esquistossômulos invadem o vaso sanguíneo, passam pela pequena circulação e chegam aos pulmões, por volta de quatro a cinco dias após a infecção. Permanecem no pulmão cerca de dois a três dias e começam as mudanças de dimensões e atividades, sendo estes talvez pré-requisitos para a migração em direção ao fígado. (REY, 2001)

Os primeiros esquistossômulos chegam ao fígado com cerca de uma semana após o início da infecção. Nesta migração ocorrem mudanças fisiológicas e morfológicas capacitando os esquistossômulos a se transformar em vermes adultos. No fígado ocorre a diferenciação dos vermes para a fase adulta. Os machos maturam antes das fêmeas com a formação do canal ginecóforo e definição dos lobos testiculares para posterior acasalamento com as fêmeas. (SILVA et al., 2008)

Após maturação em vermes adultos no hospedeiro definitivo, ocorre a migração até os vasos venosos mesentéricos, próximos ao intestino, onde há o acasalamento e início da postura de ovos. Parte dos ovos é eliminada pelo lúmen intestinal e parte fica retida em vários órgãos (parede intestinal, fígado, pâncreas, pulmões e outros). Os ovos, uma vez retidos nos tecidos, começam a liberar antígenos provocando uma reação inflamatória chamada de reação granulomatosa, ou granuloma. (DINIZ, 2009)

A esquistossomose apresenta duas fases durante a infecção: fase aguda e fase crônica. (PEARCE, 2002) A fase aguda se desenvolve a partir de uma dermatite cercariana provocada pela penetração das cercárias na pele e a intensidade dessa resposta varia desde um quadro assintomático até o surgimento de dermatite urticariforme, com erupção papular, eritema, edema e prurido, persistindo até cinco dias após a infecção. (REY, 2001) A febre ocorre após três a sete semanas de exposição, sendo essa fase da doença caracterizada por febre, anorexia, dor abdominal e cefaléia. O paciente pode apresentar, em menor frequência, diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca. Durante o exame físico detecta-se a hepatoesplenomegalia e eosinofilia elevada, caracterizando o diagnóstico da esquistossomose aguda. (BARBOSA, 2004)

A fase crônica começa a partir dos seis meses após a infecção podendo permanecer por muitos anos. Os sinais e sintomas variam de acordo com a localização do parasito e da intensidade da carga parasitária podendo apresentar as formas intestinais, hepatointestinal, hepatoesplênica e até neurológica. (BECK, 2004)



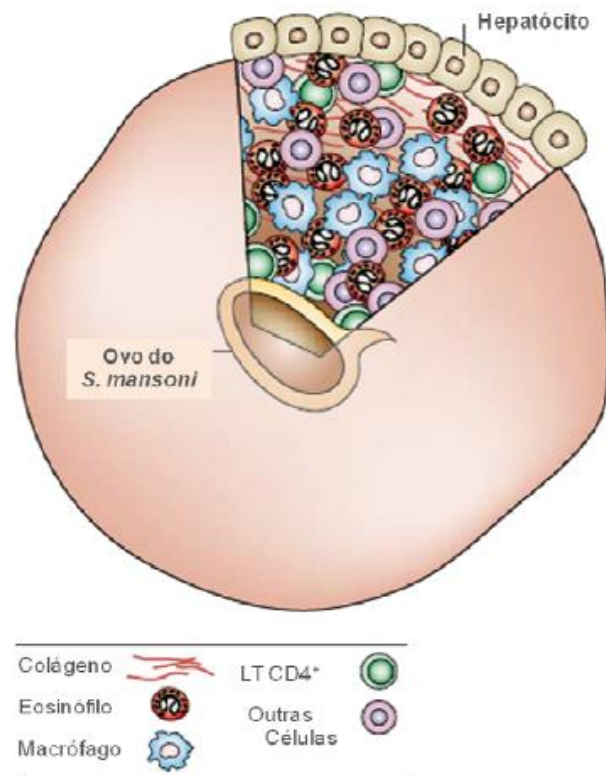
**FIGURA 2. Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni***  
 Fonte: Adaptado DUNNE e COOKE, 2005.

## 1.2 Granuloma na esquistossomose

A patologia na esquistossomose é mediada, principalmente, pela deposição de ovos de *S. mansoni* nos tecidos dos hospedeiros (fígado e intestino) e desenvolvem uma inflamação granulomatosa, levando a indução de reação imunológica contra os ovos alojados e eventualmente progride para fibrose, hipertensão portal e hepatoesplenomegalia. (ZOUAIN, 2003) Vários estudos têm demonstrado a participação por células T neste tipo de resposta. (CAMPI-AZEVEDO, 2007)

No granuloma são encontradas diversas células migrantes do sistema imune, proteínas de adesão, componentes de matriz extracelular e fatores de crescimento e angiogênese, formando uma estrutura esférica, que circunda cada ovo individualmente (Figura 3). A formação do granuloma é relacionada com a resposta por células T contra os SEA dos ovos depositados. A formação do granuloma na esquistossomose é dependente de células T CD4+, linfócitos T (TCR  $\alpha\beta$ ) sensibilizados com antígenos de ovos do parasito (SEA). (GOUNNI, 1994) GAZZINELLI e colaboradores (1985) demonstraram que PBMC (células mononucleares de sangue periférico) de pacientes na fase aguda da infecção apresentaram resposta de proliferação linfocitária *in vitro* a antígenos solúveis do ovo (SEA). Vários estudos têm demonstrado a participação de células T neste tipo de resposta, que se apresenta como uma reação inflamatória mista, com infiltrado celular composto de células mononucleares, polimorfonucleares, eosinófilos, células epitelioides e fibroblastos. (PEARCE, 2002)

O verme, por si só, não é capaz de induzir uma significativa patologia no homem, porém, a deposição de ovos no fígado e outros órgãos são responsáveis pela vigorosa resposta inflamatória do tipo granulomatosa. (LA FLAMME, 2004) Assim que o ovo morre, o granuloma diminui, deixando placas fibrosas em seu lugar. Essas placas aumentam a pressão sanguínea portal, assim como o diâmetro da veia porta. (LENZI et al., 2008; PEARCE e MACDONALD, 2002)



**FIGURA 3. O granuloma na Esquistossomose mansônica.** O fígado é o principal órgão afetado, uma vez que os ovos frequentemente são depositados nesse tecido. Os antígenos dos ovos são responsáveis pelo estímulo da resposta imune granulomatosa.

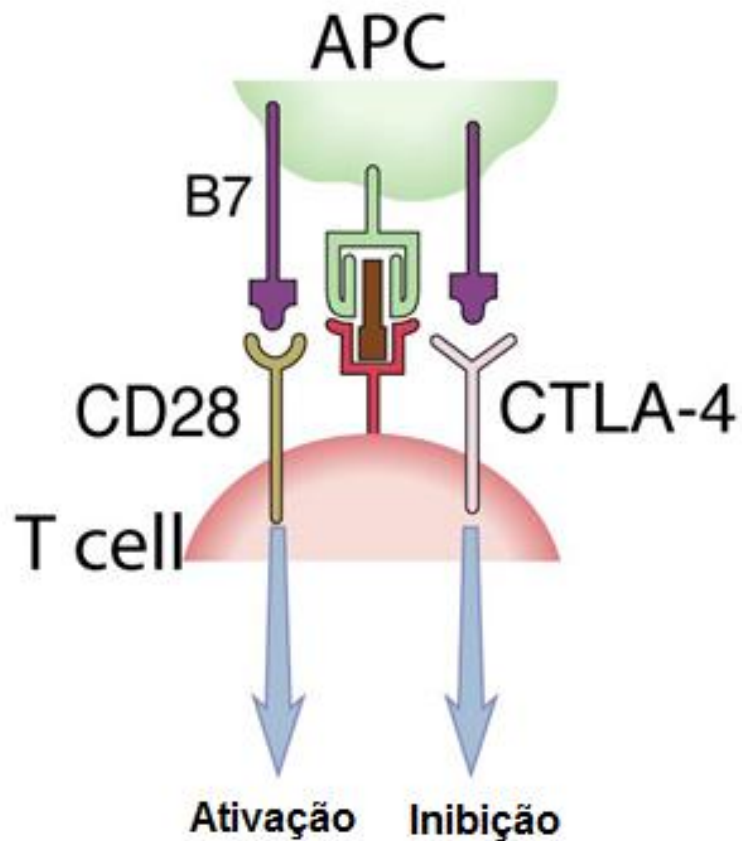
Fonte: Adaptado de PEARCE; MACDONALD, 2002.

### 1.3 Ativação e inibição de Células T

A ativação das células T requer pelo menos dois sinais independentes. O primeiro é dado pela ligação do complexo peptídeo-complexo de histocompatibilidade principal (MHC) ao receptor de células T, o TCR. O segundo é dado por um sinal coestimulatório que é emitido pela ligação de moléculas B7 (B7-1 (CD80) ou B7-2 (CD86)), presentes nas células apresentadoras de antígenos (APC), com os seus receptores nas células T, a molécula CD28 (Figura 4). (BRETSCHER, 1970)

Em células T virgens (*naive*), CD28 é o único receptor para moléculas B7. Após ativação das células T, estas passam a exibir um receptor adicional, homólogo ao CD28, chamado CTLA4 (CD152). (WALUNAS et al., 1994) Este se liga às moléculas B-7,

emitindo um sinal inibitório à célula T ativada. Assim, a ligação de CTLA4 às moléculas B7 limita a resposta proliferativa de células T ativadas (Figura 4). (MANDELBROT et al., 1999)



**FIGURA 4. Ativação e Inibição de Células T**  
Fonte: SONDAK, 2011.

#### 1.4 Imunobiologia da Esquistossomose mansônica

Os eventos imunológicos descritos para a fase aguda pré-ovular incluem hipersensibilidade mediada por anticorpos IgE, resposta imune celular e humoral antiesquistossômulos (IgM e/ou IgG) e anticorpos contra antígenos de ovos e vermes adultos. (RABELLO, 1995) Na fase aguda da esquistossomose, a resposta celular de linfócitos T auxiliares é claramente Th1, dominada por alta produção das citocinas



proinflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, e baixa produção das citocinas Th2 como IL-4 e IL-5. (ARAÚJO et al., 1996)

O papel do IFN-  $\gamma$ , na esquistossomose murina parece estar relacionado à morte de esquistossômulos, sendo que experimentos *in vitro* demonstraram o envolvimento de macrófagos na morte destas larvas. Além disso, a administração de anticorpos anti-IFN-  $\gamma$  em camundongos vacinados com cercárias atenuadas diminuiu parcialmente a proteção contra a infecção. (SMYTHIES et al.,1992)

Em estudos sobre a resposta imune celular foram observadas intensa resposta proliferativa de PBMC direcionada contra antígenos derivados de ovos (SEA) e fraca resposta direcionada contra antígenos de preparações de vermes adultos (SWAP). Todavia, na fase crônica da esquistossomose a resposta imune celular e humoral contra SWAP torna-se predominante. Além disso, a resposta contra SWAP é dependente da parasitemia, apresentando-se reduzida em indivíduos com altas cargas parasitárias. (ELLNER et al.,1981)

A progressão natural da doença gera a reposta imune do tipo Th2 induzida pelos antígenos do ovo de *S. mansoni*, a qual é capaz de regular de forma negativa a produção e as funções efetoras dos mediadores liberados na fase aguda da doença, com a participação importante da interleucina IL-10 neste processo. (MONTENEGRO et. al., 1999) O papel da IL- 10 na modulação da resposta Th1 específica para antígenos de verme adulto do *S. mansoni* foi demonstrado em experimento no qual a neutralização da IL-10 pelo uso de anticorpo monoclonal (mAb) contra esta citocina, em culturas de células de sangue periférico, resultou em restauração da produção de IFN- $\gamma$ . (ARAÚJO et al., 1996) Esta fase da doença é caracterizada por baixa produção de IFN- $\gamma$ , e elevados níveis de citocinas Th2, a exemplo da L-4, IL-5, IL-13 e outras reguladoras como IL-10. (FINKELMAN et al., 1997) Embora, o início da resposta Th2 pareça ter um papel crucial na modulação da resposta inflamatória da fase aguda, uma resposta Th2 prolongada contribui para o desenvolvimento de fibrose hepática e aumenta a morbidade da doença. (CHEEVER, et. al., 2000) Como consequência da resposta Th2, ocorre aumento do número de eosinófilos, mastócitos e produção de anticorpos IgE. Os antígenos parasitários funcionam como potentes alérgenos e isso poderia explicar os níveis elevados de IgE policlonal, IgG1 e IgG4 encontrados nos indivíduos infectados de área endêmica. Apesar da elevada produção de IgE e da presença de mastócitos e eosinófilos, em indivíduos cronicamente infectados pelo *Schistosoma* residentes em

área endêmica não se observam fenômenos de anafilaxia, provavelmente devido a fatores moduladores da resposta imune induzidos pelo parasito, a exemplo da produção de IL-10. (HUSSAIN et. al., 1992)

Na fase crônica da esquistossomose no qual prevalece a resposta com perfil de citocinas Th2, os títulos de anticorpos IgG1, IgE e IgG4 tem sido amplamente demonstrado que tais citocinas podem influenciar na seleção de classes e subclasses destas imunoglobulinas, produzidas por células B. (FINKLEMAN et al., 1990) A citocina IL-4, secretada pelas células Th2, induz as células B a secretarem IgG1, enquanto que a IFN- $\gamma$ , citocina do tipo Th1, aumenta a produção de IgG2a. A produção de anticorpos IgE e IgG4 é dependente inicialmente de IL-4 ou IL-13 produzidos por células Th2. (AKDIS et al., 1997)

Vários trabalhos também demonstraram um aumento na relação IgG4:IgE em pacientes com altas cargas parasitárias. Além disso, um estudo avaliando a resposta imune humoral contra antígenos de *S. mansoni* demonstrou padrões de agregação familiar na resposta dos isotipos IgE e IgG4 específicos, reforçando o papel destes anticorpos na resistência/susceptibilidade à esquistossomose. (BETHONY et al., 1999) Entretanto, o papel biológico destas imunoglobulinas na infecção por *S. mansoni* ou por outros helmintos ainda não está bem esclarecido. Porém, as evidências sugerem que IgG4 pode interferir na imunidade protetora adquirida por bloquear a ativação específica da cascata do complemento competindo com IgG1 e, também, por bloquear a degranulação de mastócitos ao competir com a ligação de IgE aos antígenos do parasito. (BUTTERWORTH et al., 1987) Esta hipótese é favorecida pelas características bioquímicas do isotipo IgG4 que não apresenta sítios de ligação para proteínas do sistema do complemento na sua porção Fc, além de apresentar a capacidade de se ligar a mastócitos sem, contudo, induzir o processo de degranulação. (BURTON & WOOF, 1992; JEFFERIS et al. 1995)

### 1.5 Moléculas coestimulatórias, células T e a esquistossomose

Mecanismos imunorreguladores foram descritos na esquistossomose mostrando que indivíduos infectados possuem linfócitos T, que *in vitro* são capazes de induzir funções supressoras, como a inibição da resposta de proliferação de PBMC estimuladas por mitógenos ou por SEA. (COLLEY et al., 1978; ELLNER et al., 1980; ROCKLIN et al., 1981) ROCKLIN e colaboradores (1981) apresentaram estudos com células supressoras capazes de inibir a reatividade de linfócitos a antígenos desse parasito. O experimento conclusivo sobre o papel de linfócitos T na resposta imune foi realizado em camundongos atímicos, que não apresentaram resposta granulomatosa típica e a resposta anti-SEA foi significativamente menor, com a presença marcante de monócitos, raros neutrófilos e, ausência de células epiteliais. (BRYAN & VON LINCHTENBERG; 1977; PHILLIPS et al., 1977; WELLHAUSEN & BOROS, 1981; DOUGHTY & PHILLIPS, 1982)

Outros trabalhos utilizam modelo de camundongos infectados com *S. mansoni* para estudar a interação do sistema imune e o papel da resposta Th1 e Th2 para a proteção, progressão da patologia e estabelecimento do granuloma. (CHIARAMONTE, 1999) Estudos em camundongos deficientes para algumas moléculas coestimulatórias mostraram que a resposta do tipo Th2 é, em grande parte, dependente da ativação de CD28, uma vez que, nos camundongos CD28 <sup>-/-</sup>, a produção de IL-4 e IL-5 foi significativamente diminuída e a produção de IFN- $\gamma$  não foi alterada. Outros estudos realizados em camundongos infectados por *S. mansoni* mostraram que as células Th2 são as principais mediadoras na formação do granuloma e as Th1 possuem propriedades inibidoras. (HECTOR, 1997) E também foi observado que a interação entre CD28 e CD80/CD86 são essenciais na formação do granuloma nesse modelo. (ZOUAIN, 2004)

Tipicamente as células Th CD4<sup>+</sup> respondem para antígenos (Ags) exógenos apresentados por células acessórias (APC) que expressam um sinal primário por moléculas do complexo de MHC de classe II e peptídeos específicos de Ags, que se ligam ao TCR. (HERNANDEZ, 1999) No entanto, ativação de células Th CD4<sup>+</sup> requerem um sinal secundário, proveniente de moléculas coestimulatórias. A família de proteínas B7, B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), fornecem um sinal coestimulatório principal para amplificação e manutenção da resposta de células T via interação com receptor coestimulatório CD28. Moléculas coestimulatórias B7 também se ligam ao CTLA4,

que podem fornecer um sinal negativo e baixa regulação da ativação de células T. A dupla especificidade da molécula B7 para CD28 e CTLA4 tem sido um desafio para elucidar a função chave da via coestimulatória. (HERNANDEZ, 1999)

Estudos têm sugerido que em alguns modelos o estado de anergia de células T é devido à interação de B7 – CTLA4, vez que induz a ausência de coestimulação B7. O papel e a via de B7: CD28/CTLA4 tem sido extensivamente investigado doenças autoimunes e infecciosas *in vivo*. (HERNANDEZ, 1999) No início da infecção pelo *S. mansoni* a expressão das moléculas B7 tem sido observada no granuloma hepático induzido por ovos através da análise imunocitoquímica *in situ*. Além disso, a alta regulação “*up-regulation*” de moléculas B7 em macrófagos de granulomas *in vitro*, seguidas de neutralização de IL-10, resultou na estimulação da resposta celular Th mono e policlonal aos Ag-específico-ovos. (HERNANDEZ, 1999) Há relatos da dependência crítica da formação do granuloma através da apresentação de Ags por MHC de classe II *in vivo*, camundongos sem expressão do MHC de classe II não desenvolvem células Th CD4+. (HERNANDEZ, 1999)

Alguns estudos de interação entre moléculas B7 de APC e receptores CD28/CTLA4 contidos em células T modulam e podem bloquear a resposta imunopatológica *in vivo*. A administração de anticorpo anti-CTLA4 prolongam a sobrevivência em aloenxerto prevenindo rejeição em xenoenxerto. (LENSCHOW, 1995) Em outros modelos foi observada essa interação suprimindo lúpus murino e prevenindo o desenvolvimento de hiperglicemia em ratos diabéticos não obesos (NOD), entre outras doenças autoimunes. (LENSCHOW, 1995)

Em doenças infecciosas, o tratamento com anticorpo anti-CTLA4 inibe a progressão da infecção com *Leishmania major* em camundongos susceptíveis. (CORRY, 1994) Estudos *in vitro* realizados através do bloqueio seletivo de CD28 inibiu a ativação de clones Th1, mas não clones de células Th2, sugerindo que a interação de CD28/B7 mostra-se crítica na geração da resposta mediada por células Th1. (CORRY, 1994)

No entanto, outros estudos demonstraram que o sinal através do receptor CD28 poderia ter efeito na produção de citocinas Th2, incluindo IL-4 e IL-5. Por exemplo, *in vitro* a diferenciação de células Th0 para Th2, é dependente da estimulação de CD28. CD28 pode estimular o desenvolvimento de células Th2 pela produção de IL-4, mas isto não é essencial para o desenvolvimento de células Th1. (PHILIP, 1998)

Foi aprovada uma nova droga pelo FDA (*Food and Drug Administration*) Ipilimumab (mAb anti-CTLA4), para o tratamento do melanoma. Esta droga atua modulando e, conseqüentemente, aumentando a resposta imune contra o tumor. Ipilimumab atua como antagonista de CTLA4 e impede que este sistema de autocontrole negativo dos linfócitos continuem o seu estado efetor, e conseqüentemente, torna o sistema imune mais atuante sobre as células tumorais. Os resultados parecem positivos, contudo, ainda não estão bem descritos os efeitos colaterais, o aumento de sobrevida dos pacientes, estudos de custo-efetividade e outras utilizações desta nova droga. (SONDAK, 2011)

Estudos *in vivo* e *in vitro* realizados por Finck e colaboradores (1994) demonstraram que o tratamento *in vivo* com anticorpos mAb anti-CTLA4 inibiu a produção de autoanticorpos e inibiu a secreção de citocinas Th2, além de suprimir o desenvolvimento de lúpus em camundongos NZB/NZW. (FINCK, 1994)

Outros autores investigaram o papel das células que expressam CTLA4 ou GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*) na regulação da resposta imune e resistência na infecção por *Trichinella spiralis*. Neste estudo foi observado que a expressão de CTLA4 e GITR no baço e nódulos de linfonodos mesentéricos favorece o aumento de células CD4+ no início da fase aguda da infecção. (FURZE, 2006) Na fase crônica, GITR tem baixa expressão enquanto CTLA4 está elevado. Tratamento de camundongos com mAb para CTLA4 e GITR resultou em diferentes efeitos na produção de anticorpos, proliferação de linfócitos, produção de citocinas e sobrevivência do parasito. Interessantemente o tratamento com mAb anti-CTLA4 diminuiu o número de larvas presentes na musculatura esquelética, sugerindo que CTLA4 modula resposta imune e promove sobrevivência do parasito. (FURZE, 2006)

O bloqueio de CTLA4 potencializa a ativação de células T, enquanto que, CTLA4 *cross-linking* impede a progressão do ciclo celular T *in vitro*. (METZLER, 1999) A fundamental função inibitória de CTLA4 tem sido demonstrada em camundongos deficientes de CTLA4 no qual sofrem uma desordem linfoproliferativa. O principal papel de coestimulação para imunorregulação tem como principal alvo CD28/CTLA4-B7 para intervenção imune. Dependendo do modelo e da fase da doença, o bloqueio de CD80/CD86 pode-se ter resultados diferentes, seja melhorando ou agravando a doença. (METZLER, 1999)

Em geral CD28 é constitutivamente expresso em níveis moderados em células T murinas e modulam a sua ativação, enquanto a expressão de CTLA4 é dependente da ativação de células T e envolve um padrão característico intracelular. O nível de CTLA4 na superfície de células T é pequeno quando comparado com CTLA4 presentes em vesículas intracelulares mesmo em máxima expressão protéica. (METZLER, 1999)

No entanto, pouco se sabe sobre o papel dessas moléculas (CD28 e CTLA4) na regulação e controle da esquistossomose mansônica. Dessa forma, a intervenção imune durante a esquistossomose poderá contribuir com novas opções para melhorar a terapia utilizada atualmente. (ABBAS, 2005) Sendo que, o único medicamento usado para essa doença é o Praziquantel (PZQ). (REY, 2001)

## **1.6 Tratamento da Esquistossomose mansônica**

O PZQ é a droga utilizada no tratamento dos indivíduos com esquistossomose mansônica, porém apresenta efeitos colaterais mutagênicos e teratogênicos, bem como o surgimento de linhagens resistentes. Mas, como é o único disponível para tratar todas as espécies de *Schistosoma*, a O.M.S recomenda para o tratamento a administração maciça de PZQ em áreas endêmicas em diferentes áreas no mundo. (BOROS, 1989) Desse modo, a busca de novas terapias, vacinas e de outros fármacos para aumentar as possibilidades de novos tratamentos da esquistossomose é de fundamental importância para a erradicação dessa doença.

As lesões causadas pelo *S. mansoni* variam de acordo com a fase evolutiva do parasito, sua cepa e o número de infecções. Dentre os fatores determinantes no desenvolvimento da patogênese mais agressiva estão: liberação de antígenos dos vermes e ovos, formação de imunocomplexo, reação inflamatória ao parasito e formação do granuloma em vários tecidos, além da fibrose, podendo induzir quadros de neoplasias. Dessa forma, o conhecimento de mecanismos imunomoduladores que favoreça a diminuição do processo inflamatório na esquistossomose é de grande importância para menor morbidade e mortalidade causada por essa parasitose. Portanto o tratamento com anticorpos monoclonais como anti-CTLA4 (9H10) e anti-CD28 (PV-1) poderão contribuir para regulação da síntese e liberação de citocinas que favorecem a formação do granuloma e fibrose durante a esquistossomose. Assim, poderão favorecer e modular

a resposta inflamatória induzida pelo *S. mansoni*. Além disso, esses resultados poderão também auxiliar no desenvolvimento de novas alternativas para terapêutica da esquistossomose mansônica, visto que muitos anos de estudos serão necessários para que se encontre uma vacina eficaz.

## 2.OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o tratamento com os anticorpos monoclonais (mAb) anti-CTLA4 e anti-CD28 em animais infectados com *S. mansoni*.

### 2.2 Objetivos específicos

1. Avaliar a reposta leucocitária no pulmão, na cavidade peritoneal e no sangue dos animais infectados com *S. mansoni*, tratados ou não com anticorpos monoclonais (mAb) anti-CTLA4 e anti-CD28;
2. Avaliar a produção das citocinas TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-12, IL-4, IL-5 e IL-10 e anticorpos (IgG1, IgG2a e IgE) nos animais infectados com *S. mansoni*, tratados ou não com anticorpos monoclonais (mAb) anti-CTLA4 e anti-CD28;
3. Avaliar o efeito antiparasitário do tratamento com anticorpos monoclonais (mAb) anti-CTLA4 e anti-CD28 através da recuperação de vermes adultos, contagem de ovos nas fezes e viabilidade dos ovos presentes no intestino;
4. Avaliar o perfil histopatológico no fígado dos animais infectados, tratados ou não com anticorpos monoclonais (mAb) anti-CTLA4 (9H10) e anti-CD28 (PV-1);
5. Avaliar o bloqueio das moléculas coestimulatórias CTLA4 e CD28 de linfócitos T, com os respectivos anticorpos monoclonais (mAb) anti-CTLA4 e anti-CD28, através da técnica de citometria de fluxo.



### 3.MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

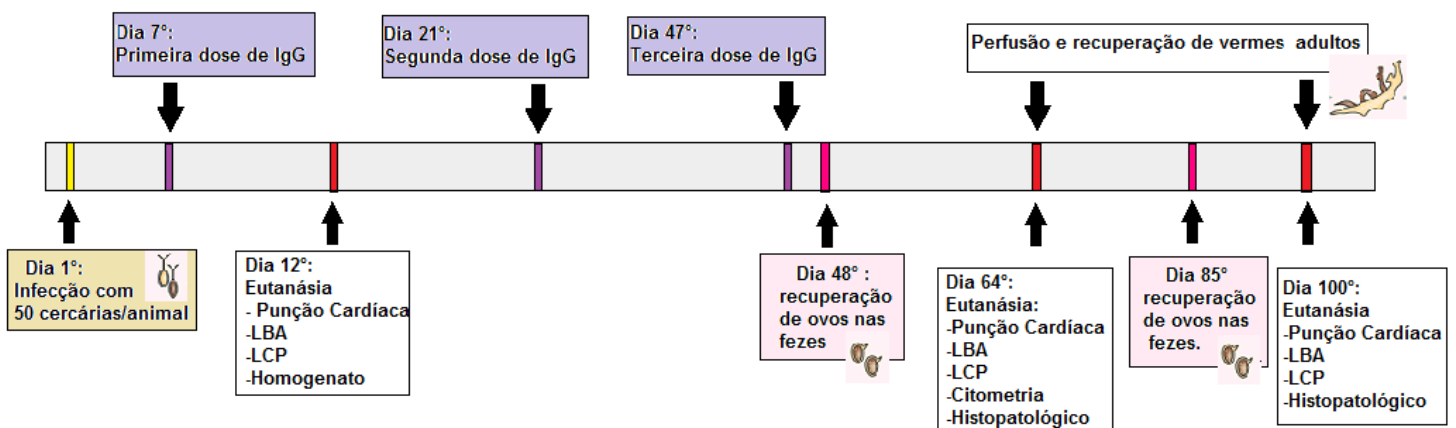
Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Balb/c, pesando entre 15 e 18 gramas (4 semanas de idade) e provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP–USP), livres de patógenos (*Specific Pathogen Free-SPF*) e com livre acesso à água e alimento. Os grupos experimentais tinham 10 animais cada grupo, e foram divididos em: (G1) grupo controle sem tratamento, (G2) grupo controle, o qual recebeu através de injeção via intraperitoneal (i.p.) IgG total de hamster, pois, os hibridomas secretores dos anticorpos anti-CD28 e anti-CTLA4 são de hamster; (G3) grupo somente infectado com *Schistosoma mansoni*; (G4) grupo infectado e tratado com IgG anti-CTLA4 i.p. (9H10); (G5) grupo infectado e tratado com IgG anti-CD28 intraperitoneal (i.p.) (PV-1); (G6) grupo infectado com *Schistosoma mansoni* tratado com a dose de 500mg/Kg/animal de Praziquantel (PZQ) por via oral (gavagem) e não i.p., pois, de acordo com HELMY, 2009 esta dose e via de administração foram consideradas como melhores controles. O PZQ é a droga de escolha, de acordo com OMS, para indivíduos com esquistossomose mansônica em áreas endêmicas, usou-se o mesmo como parâmetro nesta pesquisa para comparar com a resposta ao tratamento proposto. Foram realizados dois experimentos independentes sendo que, todos os animais foram mantidos no Biotério do DMP-UFSCar com livre acesso à água e alimento, e este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação (n° 066/2009) (anexo1).

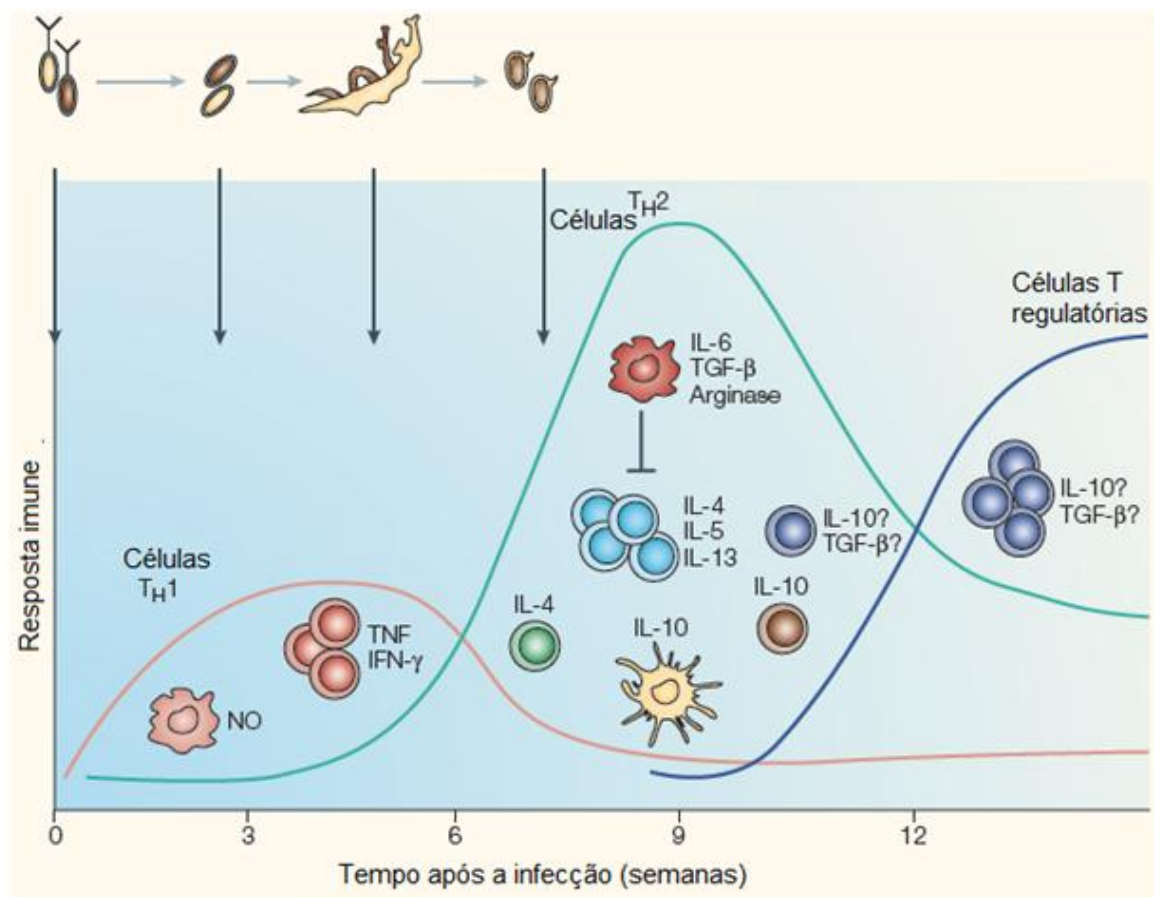
#### 3.2 Obtenção das larvas infectantes do *Schistosoma mansoni*

As larvas (cercárias), cepa LE (BH-MG), foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Vanderlei Rodrigues do Departamento de Bioquímica e Imunologia da Faculdade de Medicina (FMRP-USP), e foram retiradas de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com o *Schistosoma mansoni* mantidos no Moluscário da mesma instituição.

### 3.3 Infecções dos camundongos com as larvas infectantes (cercárias) do *Schistosoma mansoni*

Os camundongos foram infectados via subcutânea (s.c.) com as cercárias do *S. mansoni*, nos quais foram inoculadas 50 cercárias /0,3 mL solução fisiológica 0,9 % NaCl/animal, com o auxílio de uma seringa de 1 mL. Este volume e concentração (solução fisiológica) são incapazes de afetar a viabilidade das cercárias. O método de infecção foi previamente padronizado pela técnica de laboratório Olinda Mara Brigoto, do Departamento de Bioquímica e Imunologia da FMRP-USP, onde demonstrou-se eficácia, pela recuperação de vermes adultos do sistema porta, e pela persistente infecção por longo período. Os animais foram eutanasiados com anestésico Tionembutal (North Chigaco, Illinois, USA) e tratados nos tempos estabelecidos de acordo com as respostas de células T, esquematicamente na figura 5, ou seja, tratamentos no 7º dia, 21º dia e 47º dias pós infecção. As eutanásias foram: no 12º dia (entre 1-2 semanas), que avaliou-se a fase pulmonar pré - ovular e início de uma resposta Th1; no 64º dia (entre 9-10 semanas), avaliou-se a fase pós-ovular, a resposta Th1 mais estabilizada e o início e pico de uma resposta Th2, e também no 100º dia (entre 14-15 semanas) pós infecção, caracterizando a cronicidade da esquistossomose com uma resposta mais T reguladora.





**FIGURA 5.** Caracterização do desenvolvimento da Resposta Imune durante a infecção por *S. mansoni*

Fonte: Adaptado DUNNE e COOKE, 2005.

### 3.4 Procedimento experimental utilizado na obtenção dos anticorpos anti-CTLA4 e Anti-CD28 através do cultivo dos hibridomas (PV-1 e 9H10)

A produção dos anticorpos foi realizada a partir dos hibridomas, que foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Auro Nomizo (FCFRP-USP), Laboratório de Imunorregulação, e posteriormente desenvolvido no laboratório de Tecnologia de Cultivos Celulares (LATECC-UFSCar), sob a supervisão do Prof. Dr. Cláudio A. T. Suazo. Os hibridomas PV-1(anti-CD28) e 9H10(anti-CTLA4) foram cultivados em biorreator frasco tipo *spinner* de 500 mL, com volume de trabalho de 400mL, adaptado para oxigenação com baixo cisalhamento mediante membrana tubular de silicone. Primeiramente foi feito um banco de células dos hibridomas PV-1 (anti-CD28) e 9H10 (anti-CTLA4) que permanecem estocadas e mantidas em nitrogênio líquido (-196 °C) onde houve preservação das características deste material durante o período de duração da pesquisa.

Os hibridomas foram ativados em frascos de cultura celular (frascos T) de 25 cm<sup>2</sup> de área de crescimento. Utilizou-se 5 mL de meio RPMI 1640 (GIBCO Lot. N° 554362) contendo 7,5% de soro bovino fetal (SBF) e demais suplementos (Hepes (Sigma Lot.019k54261) e antibiótico (1mL de Gentamicin – GIBCO Lot.753365 para cada 500mL de meio). Quando recuperado a viabilidade de cada hibridoma na faixa 90 – 95%, inoculou-se 5mL de meio e  $2 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup> em novo frasco de cultura de 75 cm<sup>2</sup> e, incubou-se a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Finalmente, cada linhagem foi transferida para o biorreator frasco tipo *spinner*, figura 6, de 500 mL devidamente oxigenado fazendo uso de uma membrana tubular de silicone em cujo interior circula ar pressurizado. O oxigênio do ar possuindo uma alta permeabilidade atravessa facilmente a parede de silicone e depois chega ao meio de cultura onde, depois de dissolvido, é consumido pelas células. O meio de cultura que foi utilizado para o cultivo, depois de preparado, foi devidamente acondicionado em geladeira sob temperatura de 4 °C no intuito de evitar degradação dos reagentes. Quando reutilizado, o mesmo foi previamente aquecido à temperatura do cultivo.

Colocou-se o inóculo de  $2 \times 10^5$  células/mL<sup>-1</sup> de cada hibridoma nos biorreatores frasco tipo *spinner* com 400 mL de meio de cultura RPMI-1640, preparado com 7,5% de soro bovino fetal (SBF), sendo que, os procedimentos foram realizados assepticamente dentro do fluxo laminar. Os biorreatores contendo os hibridomas

suspensos no meio de cultura foram colocados sob agitação magnética de 64 rpm numa incubadora de CO<sub>2</sub> para controle do pH entre 7,0 - 7,4 e retirou-se alíquotas de 2 mL de cada frasco, duas vezes ao dia no intervalo de 12h. Colocou-se em tubos de 15mL e separou-se 70 µL em tubo de 2mL. Em seguida foi mensurado o pH de cada amostra contida no tubo de 15mL e posteriormente centrifugou-se esta alíquota e armazenou para posterior análise – ELISA Direto. Realizou-se a contagem dos hibridomas da amostra contidas, no tubo de 2mL e determinou-se a concentração e viabilidade celular.

O acompanhamento da concentração e da viabilidade celular de cada hibridoma durante o cultivo foi realizado através do método de exclusão de corante, utilizando-se de solução aquosa de 0,4% de azul de trypan. (Doyle & Griffiths, 1998)

A concentração dos hibridomas foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer. Para tal foram retiradas 20µL dos 70µL de amostra de cada cultivo contidas no tubo de 2mL e em seguida foram misturadas com 20 µL da solução de corante. Com a ajuda de uma micropipeta colocou-se uma alíquota de 10 µL de cada amostra corada numa câmara de Neubauer previamente montada e realizou-se a contagem no microscópio óptico com magnificação de 20 vezes. As células não coradas foram classificadas como células viáveis, já as células coradas com azul de trypan foram classificadas como células inviáveis. A concentração celular foi calculada com o número de células totais de acordo com a Equação 1. Já a viabilidade celular foi calculada pela razão entre o número de células viáveis e o número de células totais no meio, de acordo com a Equação 2.

$$N_t \times D \times 10^4 = X_T \text{ (Células Totais} \times \text{mL}^{-1}\text{)} \quad \text{Equação 1}$$

$$\frac{n_v}{N_t} \times 100 = Y \% \text{ (Células Viáveis)} \quad \text{Equação 2}$$

Onde:

$N_t$  = número de células totais

$n_v$  = número de células viáveis

$X_T$  é o número de células totais por mL

$Y$  é o valor em porcentagem da viabilidade celular

$D$  = fator de diluição para hibridomas:  $D = 2$



**FIGURA 6. Biorreator de 500mL frasco tipo *spinner*:** Frasco com o volume de trabalho de 200mL utilizado para o cultivo dos hibridomas, LATECC-UFSCar.

Fonte: Laís C. de Souza, 2010.

Centrifugaram-se os cultivos de cada biorreator e congelaram-se os sobrenadantes para posteriores análises e purificação. O sobrenadante da cultura realizada em biorreator frasco tipo *spinner* dos mAb anti-CTLA4 (9H10) e anti-CD28 (PV-1) foram lavados com tampão fosfato PBS 1x pH 7,4, concentrados. Posteriormente foram purificados no laboratório de bioquímica da FCFRP-USP, com apoio da Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim e auxílio técnico de Ana Elisa Caleiro Seixas Azzolini. Os sobrenadantes que estavam congelados com o volume total de 300mL cada, foram descongelados em Banho Maria a 37 °C e colocados no ultrafiltrador tangencial – Millipore Labscale (TFFsystem). Os sobrenadantes foram lavados seis vezes em tampão (PBS 1x pH 7,4) para a retirada de todos os constituintes de coloração vermelha do meio de cultura RPMI 1640 (vermelho de fenol). Foram obtidas as amostras límpidas, que foram concentradas com volume final de 75 mL. Os hibridomas são de hamster, então foi preparado IgG total de hamster para utilização no tratamento do grupo experimental controle/tratado com IgG de hamster. Dez Hamsters golden sírio foram eutanasiados através do método de guilhotinamento, para obtenção de grande volume de sangue e posteriormente soro, o sangue obtido foi colocado em tubo de 50mL na posição horizontal para que houvesse o contato do sangue com o plástico do tubo e ocorresse a coagulação do sangue e posterior separação do soro, que foi retirado e armazenado em tubos de 15mL, pois neste continham as imunoglobulinas de interesse.

Após a concentração das amostras que continham os anticorpos e a obtenção do soro dos hamsters estes foram, separadamente, precipitados em solução de sulfato de amônio à 40% de saturação e posteriormente centrifugado a 5000 g por 30 minutos. Cada resíduo foi ressuspensionado em PBS 1x pH 7,4 e dialisados a temperatura de 4 - 10°C. As amostras foram colocadas separadamente em membrana de diálise (Dialysis Tub 14000MW DIA: Dry 22mm MD34-14/1 Viskase Corporation) e amarradas com barbante em formato de saquinho, por 4 dias em PBS 1x pH 7,4, com trocas a cada 24 horas. Este processo é similar a osmose e favorece a passagem de íons, água e moléculas pequenas pela membrana para o meio que contém PBS 1x (pH 7,4) e restringe a passagem de proteínas (ex. imunoglobulinas), as quais ficam presas na membrana. Através deste método obtivemos uma amostra mais purificada.

Posteriormente, as amostras contidas na membrana foram purificadas através de cromatografia de afinidade, em coluna de troca iônica (2,6 cm de diâmetro x 67 cm de

altura - utilizadas para hibridomas e 2,6 cm de diâmetro x 40 cm de altura - utilizada para o soro do hamster e Resina DEAE celulose Sigma D6418 Lot 90K1465) e quantificadas através da leitura espectrométrica no comprimento de onda de 280nm. Posteriormente concentradas em AMICON (Amicon Ultrafiltration Cell Modelo 8010), utilizando membrana PM 30 (Membrana PM 30 25mm Lot AF 3098E - DIAFLO Ultrafiltration Membranes - Amicon – USA) e aliquotadas em tubos com volumes de 1mL e armazenados em freezer -20° C.

### **3.5. Tratamento com anticorpos monoclonais**

A literatura mostrou-se bastante variada quanto à dose exata desses anticorpos que poderia promover uma depleção eficiente em camundongos. De acordo com os estudos feitos decidiu-se avaliar a dose de 100 µg/anticorpo/kg/animal. Os camundongos foram pesados e a partir da média de peso do grupo preparou-se o tratamento. A administração dos anticorpos foi realizada intraperitonealmente e a do PZQ por via oral (gavagem) utilizando cânula apropriada, no qual foi administrado o volume de 0,2 mL por animal, no 7° dia, 21° dia e 47° dia pós infecção. Nos períodos 12° (avaliação pulmonar – pré - ovular), 64° e 100° dias (pós-ovular), os animais foram eutanasiados e realizadas as análises.

### **3.6 Avaliação Pulmonar: Fase pré – ovular**

No 12° dia pós infecção, 10 animais de cada grupo: (G1) grupo controle sem tratamento, (G2) controle, o qual recebeu através de injeção via intraperitoneal (i.p.) IgG total de hamster; (G3) grupo somente infectado com *Schistosoma mansoni*; (G4) grupo infectado e tratado com IgG anti-CTLA4 i.p. (9H10); (G5) grupo infectado e tratado com IgG anti-CD28 i.p. (PV-1); (G6) grupo infectado com *Schistosoma mansoni* e tratado com Praziquantel (PZQ) por via oral (gavagem), foram eutanasiados nos períodos já descritos.

Coletou-se sangue através de punção cardíaca, realizaram-se as técnicas de Lavagem Broncoalveolar (LBA) e Peritoneal (LCP) e recuperou-se as células da cavidade pulmonar e peritoneal, respectivamente. Realizaram-se as contagens globais



(totais) e diferenciais das células do sangue e lavados. O pulmão esquerdo dos animais de cada grupo foi retirado para realização da técnica homogenato e o pulmão direito dos animais de cada grupo foi retirado e mantido em formol tamponado para posterior análise histopatológica.

### **3.6.1 Homogenato do pulmão**

O pulmão esquerdo de cada animal foi removido, lavado em salina 1x, pesado, mantido em tubo criogênico e congelado inicialmente em freezer -20°C e posteriormente em -80°C até a análise das amostras. Para a realização da técnica de ELISA para a detecção de citocina, os pulmões foram descongelados e para cada 100 mg de tecido foi adicionado 1 mL de PBS 1x. Os tecidos foram submetidos à homogeneização em velocidade média durante 30 segundos (Homogenizer Workcenter, modelo: Ika T10 Basic), em seguida, os tubos com os tecidos homogeneizados foram centrifugados em centrífuga refrigerada 4°C, durante 20 minutos a velocidade de 4000 rpm, o sobrenadante foi removido cuidadosamente e mantido a -20°C.

### **3.7. Fase pós – ovular**

Nos 64° e 100° dias pós infecção, 10 animais de cada grupo: (G1) grupo controle sem tratamento, (G2) controle o qual recebeu através de injeção via intraperitoneal (i.p.) IgG total de hamster; (G3) grupo somente infectado com *Schistosoma mansoni*; (G4) grupo infectado e tratado com IgG anti-CTLA4 i.p. (9H10); (G5) grupo infectado e tratado com IgG anti-CD28 i.p. (PV-1); (G6) grupo infectado com *Schistosoma mansoni* e tratado com Praziquantel (PZQ) por via oral (gavagem), foram eutanasiados.

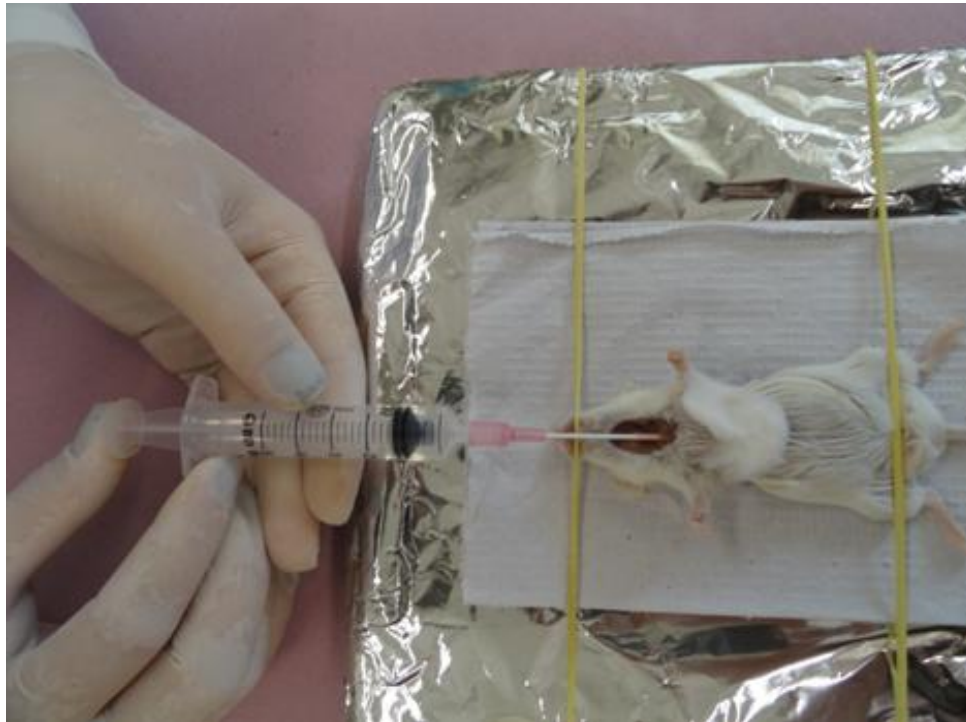
Coletou-se sangue através de punção cardíaca, realizaram-se as técnicas de Lavagem Broncoalveolar (LBA) e Peritoneal (LCP) e recuperaram-se as células da cavidade pulmonar e peritoneal respectivamente. Realizaram-se as contagens globais (totais) e diferenciais das células do sangue e lavados. Foi feito também a recuperação de vermes adultos do sistema porta e parte do intestino de cada animal foi coletado e duas lâminas por animal foram preparadas para a observação da viabilidade dos ovos

aderidos na mucosa intestinal (oograma) dos animais infectados, tratados ou não. Os linfonodos mesentéricos foram retirados de cada camundongo dos grupos e preparados para posterior análise do tratamento proposto através de Citometria de Fluxo. O fígado dos animais de cada grupo foi retirado e mantido em formol tamponado para posterior análise histopatológica.

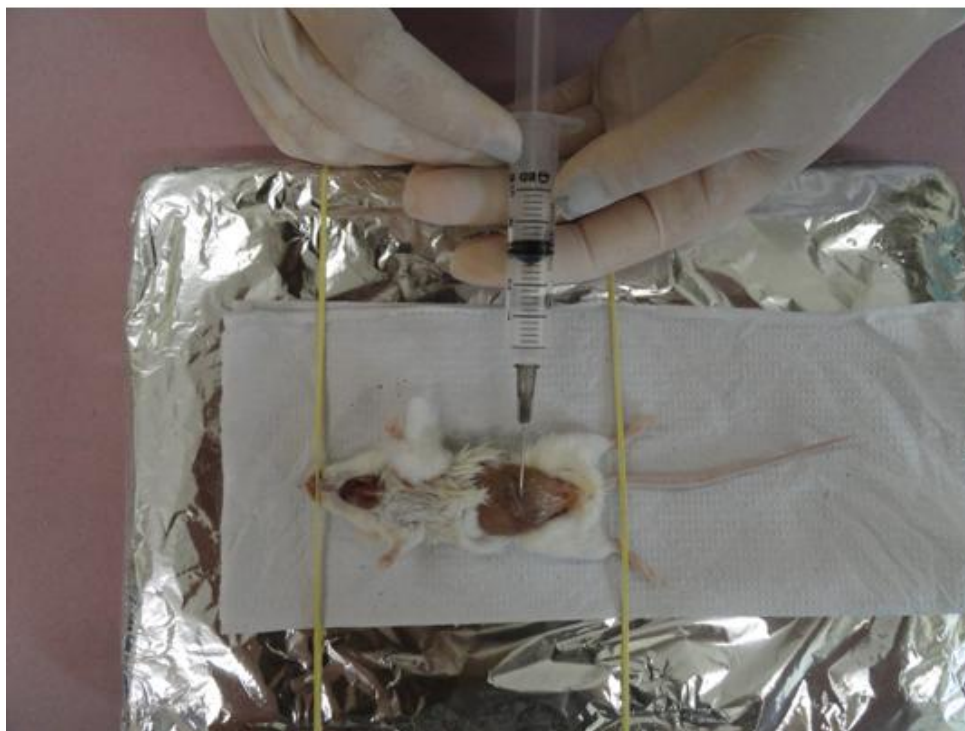
### **3.8. Avaliação Celular**

#### **3.8.1 Obtenções das células do LBA, do LCP e do Sangue**

Nos períodos 12<sup>o</sup>, 64<sup>o</sup> e 100<sup>o</sup> dia pós infecção, os animais foram eutanasiados com anestésico Tionembutal (North Chigaco, Illinois, USA) e realizou LBA (lavado da cavidade broncoalveolar - pulmão), LCP (lavado da cavidade peritoneal – peritônio) e sangria dos animais infectados, tratados ou não, e dos animais controles. Para a obtenção do LBA, figura 7, utilizou-se 1,0 mL de PBS1x pH 7,4, contendo 0,5 % de citrato de sódio (PBS/Citrato), por meio de cânulas de polietileno introduzidas na parte superior da traquéia. O procedimento foi repetido duas vezes totalizando um volume final de 2 mL. Para o lavado da cavidade peritoneal (LCP), figura 8, foram utilizados 3 mL de PBS1x pH 7,4, contendo 0,5 % de citrato de sódio (PBS/Citrato), com o uso de uma agulha intraperitoneal. O sangue foi obtido com auxílio de uma seringa edetalizada (com EDTA) após sangria total dos animais, por punção cardíaca, como mostra a figura 9. As células obtidas do lavado da cavidade peritoneal (LCP), lavado broncoalveolar (LBA) e sangue total foram analisados para avaliação celular. As técnicas utilizadas para a avaliação foram através das contagens globais em câmara de Neubauer e diferencial em esfregaço sanguíneo corado com Panótico (Instant-Prov Lot.11111003E).



**FIGURA 7. LBA - lavado broncoalveolar – pulmão:** Procedimento realizado nos animais infectados, tratados ou não, e dos animais controles, LAP - UFSCar.  
Fonte: Laís C. de Souza, 2010



**FIGURA 8. LCP - lavado da cavidade peritoneal – peritônio:** Procedimento realizado nos animais infectados, tratados ou não, e dos animais controles, LAP - UFSCar.  
Fonte: Laís C. de Souza, 2010



**FIGURA 9. Sangria por punção cardíaca:** Procedimento realizado nos animais infectados, tratados ou não, e dos animais controles, LAP - UFSCar.  
Fonte: Laís C. de Souza, 2010

### **3.8.2 Contagem global (total) e diferencial de leucócitos dos lavados LBA e LCP e do Sangue**

O número total de leucócitos nos diferentes compartimentos foi determinado através do líquido diluidor Turk (ácido acético 3% + corante azul de metileno) que tem a função de lisar (destruir) as hemácias e conservar apenas os leucócitos, que foram contados na câmara de Neubauer. A contagem diferencial foi feita nos esfregaços sanguíneos e naqueles preparados em citocentrífuga por 3min. a 10000 rpm (Citospin-FANEM São Paulo-Brasil, Laboratório de citologia - FCF-UNESP/ Laboratório de Parasitologia UFSCar) (LBA e LCP) e corados pelo corante Panótico (Instant-Prov Lot.11111003E). Em cada lâmina foram contadas 100 células através da microscopia de luz com aumento final de 1000x.

## **3.9 Ensaio Imunoenzimático – ELISA**

### **3.9.1 Para detecção de citocinas**

Para o ELISA (Kits: R&D e BD) utilizamos placas de microtitulação com 96 poços. Inicialmente foi feita a sensibilização da placa com 100 µL/poço de solução contendo o anticorpo de captura (0.5 µg/mL) diluído em PBS. As placas do Kit BD foram incubadas por 18h a 4°C e as da R&D por 18h a temperatura ambiente. Após este período, o sobrenadante foi desprezado, a placa foi lavada (PBS+Tween) e o bloqueio dos sítios de ligações inespecíficos foi feito adicionando-se 200 µL de PBS 10% de soro bovino fetal. Novamente as placas foram incubadas por 1h em temperatura ambiente e em seguida lavadas. A seguir foram adicionadas as diferentes diluições das amostras em estudo: 1:2 do plasma (100 µL/poço), 1:10 do homogenato (100 µL/poço), e as citocinas recombinantes padrão (100 µL/poço) diluídas em tampão PBS-SBF 10% (Kit BD) e Tampão R&D (Kit R&D). A primeira concentração das citocinas recombinante padrão IL-4, IL-5, IL-12, IL-10 - Kit BD foi de 4000 pg/mL, a qual foi sucessivamente diluída na base 2 até 7,8 pg/mL e INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  - Kit R&D foi de 5000 pg/mL, a qual foi sucessivamente diluída na base 2 até 9,76 pg/mL. Após incubação por 2h, foi feito novo ciclo de lavagem e adicionado 100 µL/poço do anticorpo de detecção (anticorpo secundário biotilado 0.125 µg/mL). Após nova incubação de 1h (Kit BD) e 2h (Kit R&D) a temperatura ambiente e novo ciclo de lavagem, foram adicionados (100

$\mu\text{L}/\text{poço}$ ) da enzima estrepto-avidina (1:1000) diluída em PBS e soro bovino fetal 10%, depois de 30 minutos (Kit BD) e 20 minutos (Kit R&D) a placa foi novamente lavada e adicionou-se 100  $\mu\text{L}/\text{poço}$  do substrato. O substrato utilizado foi uma mistura 1:1 de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e tetrametilbenzidina (TMB) (BD-OpTEIA). Finalmente, a reação foi bloqueada adicionando-se 50  $\mu\text{L}/\text{poço}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1M. A leitura da absorbância foi feita no comprimento de onda 450 nm (MicroQuant-Sellex, Inc.).

### 3.9.2 Para detecção de anticorpos

O extrato protéico de antígenos de *S. mansoni*, foi gentilmente doado pelo aluno Ricardo Oliveira Correia LAP-DMP-UFSCar. Para o preparo do mesmo foram utilizados 80 vermes adultos de *S. mansoni*, estes foram recuperados de camundongos Balb/c infectados com 200 cercárias. A extração de proteínas foi feita com 40mM de Tris (0,24g), pH 7,4, 2% SDS e coquetel inibidor de proteases (Etanol 100%, Aprotinina, Leupeptina, Pepstatina A e PMSF 100mM) utilizado 10  $\mu\text{L}$  para cada 1 mL da amostra. Posteriormente foi feita a sonicação com ultra-som, 2 ciclos de 2 minutos, com pulso de 1 segundo à 40% de amplitude, após a sonicação foi feita a precipitação da amostra com acetona. Posteriormente centrifugada 12000g por 30 minutos a temperatura de 4°C, o “*pellet*” foi recuperado e quantificado a proteína através do método de “*Bradford*” (BRADFORD, 1976). O método de Bradford (Bradford, 1976) é uma técnica para a determinação de proteínas totais que utiliza o corante de “*Coomassie brilliant blue*” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante BG-250 e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante BG-250 provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em 595 nm. (COMPTON, 1985).

Para detecção das imunoglobulinas (IgE, IgG1, IgG2a), foi feito um ELISA (Kit BD) teste para padronização da melhor diluição da amostra e concentração do antígeno, sendo padronizado para IgG1 (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína do antígeno para diluição de 1:64 da amostra) e para IgG2a e IgE (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína do antígeno para diluição de 1:4 da amostra). Desta forma, para a detecção das imunoglobulinas na amostra (plasma) utilizou-se placas de microtitulação com 96 poços, recobertas com 5 ou 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de proteína do antígeno total de *S. mansoni* (diluídos em tampão carbonato 0.1M, pH 9,6 e

aplicados 100 µL/poço). Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS-Tween 20 0,05%, acrescentou-se 200 µL de tampão bloqueio (PBS-BSA 1%), posteriormente as placas permaneceram por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, lavou-se novamente e adicionou-se 50 µL das amostras diluídas em tampão carbonato (1:4 para IgG2a/IgE e 1:64 para IgG1), as placas permaneceram 2h a temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a placa e adicionou-se 100 µL de Ac secundário conjugado com biotina (4 µL Ac + 10 mL de tampão carbonato). Após 1h, lavou-se a placa e adicionou-se 100 µL da enzima estreptoavidina (diluição 1:200). Após 30 minutos, lavou-se a placa e 100 µL do substrato, uma mistura 1:1 de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e tetrametilbenzidina (TMB) (BD-OpTEIA), foi adicionado. Logo após, a reação foi bloqueada com 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M. A leitura da absorbância foi feita em comprimento de onda de 450 nm em leitor de ELISA (MicroQuant-Sellex, Inc.).

### **3.10 Avaliação da Carga Parasitária**

#### **3.10.1 Recuperação de vermes adultos do sistema porta-hepático**

Para a avaliação da eficácia das estratégias terapêuticas propostas, os vermes adultos acasalados, figura 10, foram recuperados dos camundongos através da perfusão do sistema porta no 64° dia e no 100° dia pós infecção. A porcentagem (%) de redução da carga parasitária foi medida pela comparação entre o número de vermes adultos acasalados recuperados em cada grupo experimental e seu respectivo controle (infectado não tratado), de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ RCP} = \frac{\text{RCPC} - \text{RCPE}}{\text{RCPC}} \times 100$$

Onde % RCP é porcentagem de redução da carga parasitária, RCPC é recuperação no grupo controle e RCPE é a recuperação no grupo experimental (FONSECA et al., 2004).



**FIGURA 10. Representação: avaliação da Carga Parasitária:** Vermes adultos recuperados através da perfusão do sistema porta realizados no 64° dia e no 100° dia pós infecção. Procedimento realizado nos animais infectados e infectados tratados, LAP - UFSCar.

Fonte: Laís C. de Souza, 2010.

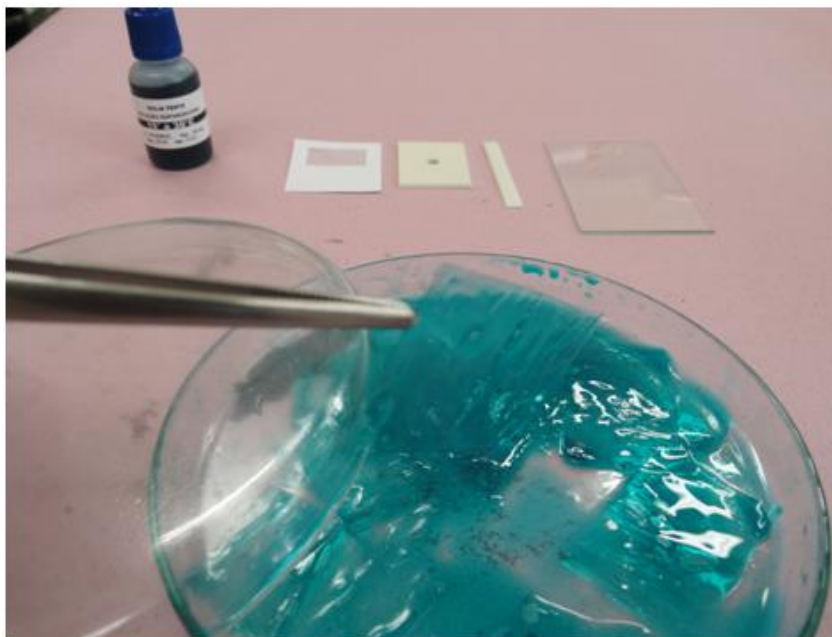
### 3.10.2 Contagem de ovos nas fezes

Os camundongos foram analisados quanto à eliminação de ovos nas fezes pelo método de Kato-Katz (KATZ and PEIXOTO, 2000), no 48° dia e 85° dia pós infecção, figura 11. As fezes foram submetidas ao peneiramento em filtro-Test (Helm-Test-Biomanguinhos-Fiocruz), montadas em lâminas de microscopia, figura 12, com quantidade determinada pela forma do kit Helm-Test, e cobertas com lamínula de papel celofane impregnada de verde malaquita, objetivando a conservação das fezes e o clareamento dos ovos do *S. mansoni*. Depois de feita a leitura das lâminas e contagem dos ovos calcularam-se as quantidades de ovos por grama de fezes seguindo a seguinte fórmula:

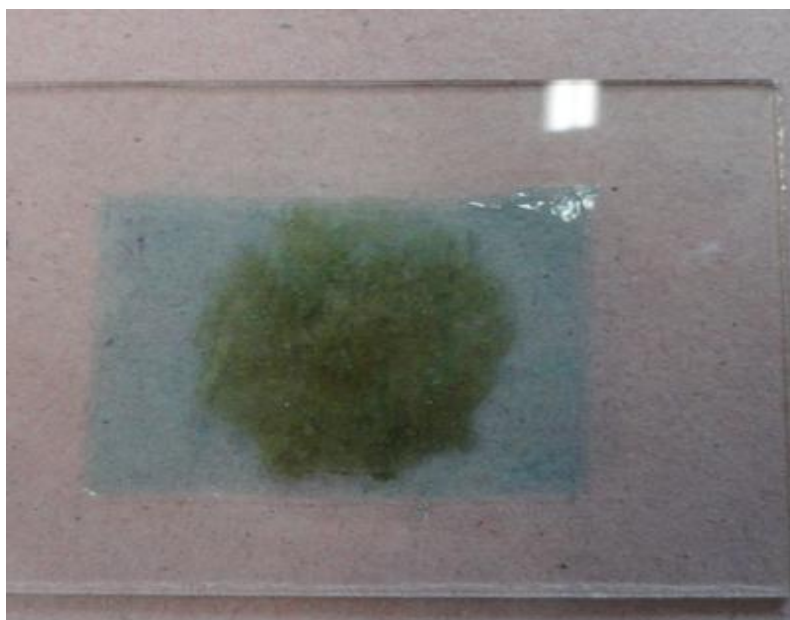
$$\text{N}^\circ \text{ de ovos da amostra} = \text{n}^\circ \text{ de ovos encontrados na lâmina} \times \text{fator 24 (fator varia de acordo com cada Kit)}$$

O Kit de Kato-Katz foi gentilmente doado pela Fundação Oswaldo Cruz-Biomanguinhos, Rio de Janeiro-RJ.





**FIGURA 11. Kit Kato-Katz: Contagem de Ovos nas fezes:** As fezes dos camundongos foram preparadas com auxílio dos materiais presentes no Kit e posteriormente analisou-se à eliminação de ovos nas fezes, no 48º dia e 85º dia pós infecção. Procedimento realizado nos animais infectados e infectados tratados, LAP - UFSCar. Fonte: Laís C. de Souza, 2010.



**FIGURA 12. Contagem de Ovos nas fezes:** Lâmina de fezes de camundongo confeccionada pelo método Kato-Katz, no 48º dia e 85º dia pós infecção. Procedimento realizado nos animais infectados e infectados tratados, LAP - UFSCar. Fonte: Laís C. de Souza, 2010.

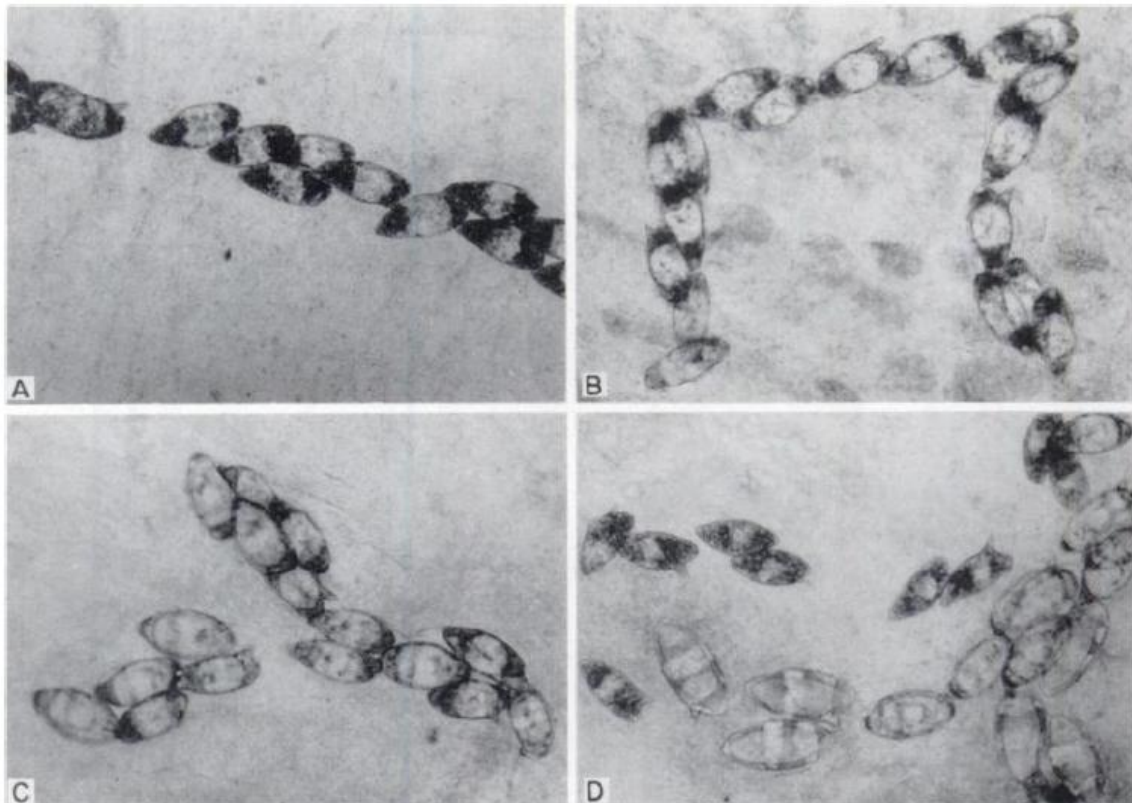
### 3.10.3 Viabilidade dos ovos – Oograma

Retiraram-se fragmentos de intestino grosso nos 64° e 100° dias pós infecção que foram usados para a análise através da técnica Oograma, figura 13. Foram lavados em solução salina (NaCl 0,9%) e ligeiramente secos em papel absorvente (papel higiênico). Posteriormente, os mesmos foram comprimidos entre lâmina e lamínula e realizou-se a leitura (PELLEGRINO & FARIA, 1965). Os fragmentos foram microscopicamente analisados, contou-se 300 ovos/camundongo, os quais foram classificados de acordo com os seus estádios de desenvolvimento. Os ovos foram classificados em: (i) ovos imaturos viáveis (de 1° a 4° estágio); (ii) ovos maduros viáveis; e, (iii) ovos inviáveis (calcificados, com miracídio retraído, semi-transparentes), figura 14, (PELLEGRINO and KATZ, 1969).



**FIGURA 13. Viabilidade dos ovos – Oograma:** Lâmina do fragmentos do intestino grosso no 64° dia e 100° dia pós infecção e usados para a análise através da técnica Oograma. Procedimento realizado nos animais infectados e infectados tratados, LAP - UFSCar.

Fonte: Laís C. de Souza



**FIGURA 14. Representação: viabilidade dos ovos – Oograma:** Estágios dos ovos microscopicamente analisados no 64° dia e 100° dia pós infecção. A e B ovos imaturos e de 2° e 3° estágio, C, ovos imaturos e de 3° e 4° estágio, D, ovos imaturos (1° ao 4° estágio) e ovos maduros. Procedimento realizado nos animais infectados e infectados tratados.

Fonte: PELLEGRINO & FARIA, 1965

### **3.11 Estudos Histológicos e Microfotografias**

Os fígados foram removidos dos camundongos no 64<sup>o</sup> e 100<sup>o</sup> dia pós infecção, e foram imediatamente fixados em formol tamponado 10%. Em seguida, esses tecidos foram fixados em tampão fosfato contendo 10% de formalina durante 24 horas, e em seguida foram submetidos ao processo de desidratação em álcool 70% e clarificação em xilol e posteriormente incluídos em blocos de parafina, seccionados em cortes de 5 µm, e então dispostos em lâminas e incubados a 58-60°C para fixação. Posteriormente, foram lavados em xilol para retirar o excesso de parafina e reidratados com concentrações decrescentes de álcool (do absoluto aos 80%). Sendo que, foram produzidas duas lâminas, a primeira foi corada com H.E. (Hematoxilina/Eosina), para a avaliação qualitativa das células periovular de granuloma, a segunda foi corada com T.M. (Tricrômico de Masson), para avaliação da fibrose hepática, as mesmas foram analisadas por microscopia óptica. As lâminas foram gentilmente confeccionadas no laboratório de Anatomia Patológica, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Edson Garcia Soares do Departamento de Patologia da FMRP-USP. As lâminas foram fotografadas, com o auxílio de microscópio (NIKON) contendo máquina fotográfica adaptada (SONY – CYBER - SHOT DSC-H55). As lâminas foram fotografadas em aumento de 100x e 400x.

### **3.12 Análise Por Citometria de Fluxo Para Receptor de Linfócitos: CTLA4 e CD28 (facsanto)**

Após a eutanásia dos animais os linfonodos mesentéricos foram retirados de cada animal e macerados com auxílio de uma peneira e uma placa de petri contendo 2mL de tampão PBS 1x pH 7,4, e feito um “pool” dos animais de cada grupo experimental. Transferiu-se cada “pool” para tubo de 15mL e centrifugou-se 10 minutos a 1500rpm em seguida ressuspendeu-se o “pellet” em 8mL de meio RPMI1640, e realizou-se a contagem das células. Após preparou-se  $2 \times 10^7$  células/mL em cada tubo (de 5mL). Sendo que em cada grupo experimental tinha-se 1 tubo somente com células, 1 com células + isotipo controle e outros 2 tubos que tinham 2 tipos de anticorpos em cada tubo, totalizando 4 tubos por grupo. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo bloqueador de ligação inespecífica (“Fc block”), durante 40 minutos, no

escuro. Após este tempo, 2 tubos com células foram incubados com anticorpos marcados com compostos fluorescentes (FITC e/ou PE) anti-CTLA4<sup>+</sup> FITC + anti-CD4<sup>+</sup> PE e anti-CD4<sup>+</sup> PE + anti-CD28<sup>+</sup> FITC durante 30 minutos. Todos os anticorpos foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Auro Nomizo (FCFRP-USP). Logo após esta incubação, as células foram lavadas com PBS/FACS pH 7,4 e a análise da expressão destas moléculas foram feitas por citometria de fluxo no aparelho FACSCanto da FCFRP-USP, figuras 15 e 16. Os resultados foram expressos na forma de dot-blot, e representou a percentagem da intensidade de fluorescência.



**FIGURA 15. Aparelho FACSCanto, FCFRP-USP:**  
Utilizado para fazer análise de citometria de fluxo.  
Fonte: Laís C. de Souza, 2010.



**FIGURA 16. Aparelho FACSCanto, FCFRP-USP:** Utilizado para fazer análise de citometria de fluxo.

Fonte: Laís C. de Souza, 2010.

### 3.13 Análise Estatística

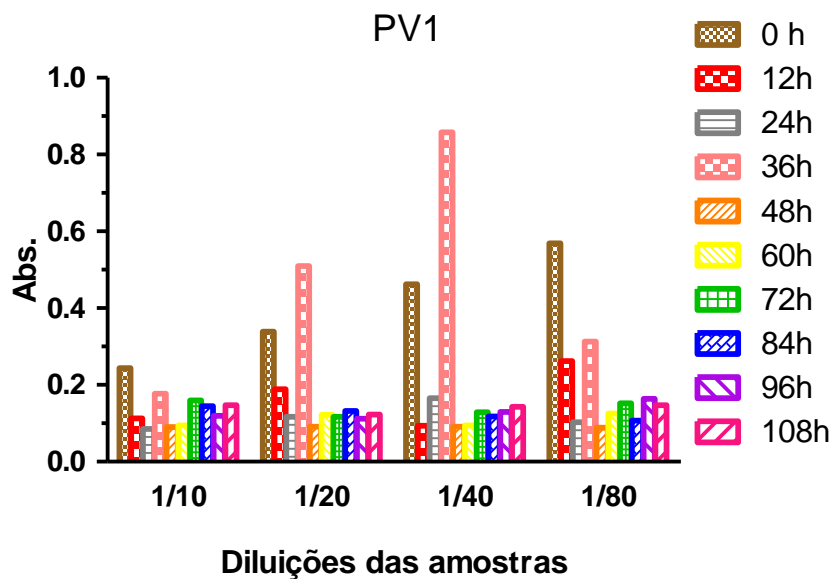
Os resultados foram expressos com média  $\pm$  EPM. Os resultados obtidos nos diferentes experimentos foram analisados utilizando o programa PRISMA, versão 5 - Graph Pad (2005) (San Diego, Califórnia, USA) através do teste não - paramétrico One-way ANOVA (*One-Way analysis of variance*), pós-teste pelo método de Tukey (*Compare all pairs of columns*). A significância estatística foi estabelecida em valores de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

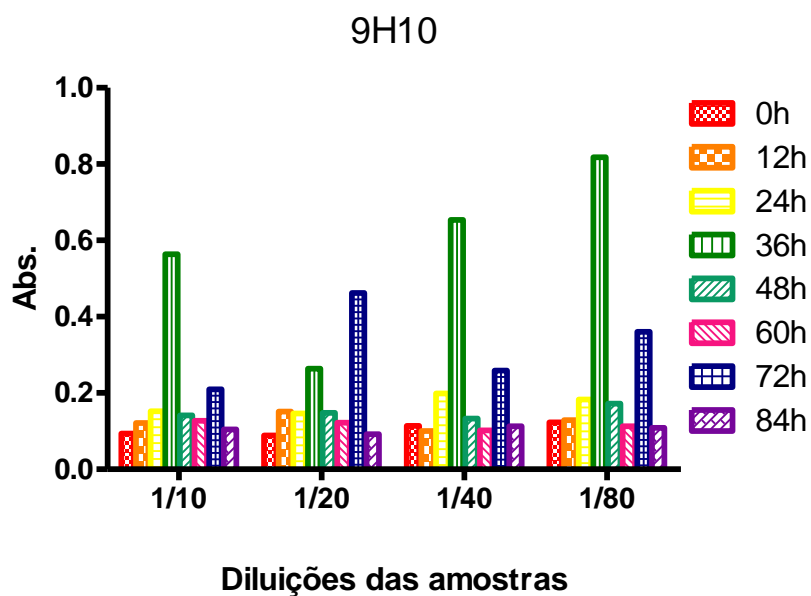
### 4.1 Pesquisa dos Anticorpos anti-CTLA4 e anti-CD28, produzidos pelos hibridomas 9H10 e PV1 respectivamente, através do Ensaio Imunoenzimático - ELISA

Após a produção dos anticorpos através da metodologia já descrita, as alíquotas dos intervalos que foram armazenadas a temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$ , foram previamente descongeladas e utilizadas para a pesquisa de IgG, anti-CTLA4 e anti-CD28 através do ensaio imunoenzimático-ELISA. A placa contendo 96 poços foi sensibilizada com alíquotas obtidas do sobrenadante da cultura, onde esperava encontrar IgG, anti-CTLA4 e anti-CD28. As mesmas foram diluídas 1/10, 1/20, 1/40 e 1/80, e incubadas com anticorpo secundário biotilado anti-IgG. De acordo com as figuras 17 e 18 as alíquotas continham os anticorpos IgG, anti-CTLA4 e anti-CD28, e a produção dos mesmos foram eficientes. Porém em determinados pontos de retirada das alíquotas do frasco tipo *spinner* observamos uma melhor e maior D.O. dos anticorpos. Isto demonstra que, se fosse necessário realizar nova produção dos anticorpos saberíamos o melhor momento de interromper o cultivo e obter uma boa quantidade de anticorpos.

Em relação ao hibridoma PV1, como mostra a figura 17, observamos que há uma escala gradativa no pico inicial, como já era esperado e o melhor pico foi de 36h quando diluído 1/40. Já na figura 18 (hibridoma 9H10) tivemos problemas com seu pico inicial, pois seu crescimento não foi de forma gradativa como esperávamos, porém, o melhor pico foi de 36h quando diluído 1/80. Ressaltamos que, as análises das alíquotas retiradas apresentaram anticorpos em todos os intervalos avaliados.



**FIGURA 17. Densidade óptica dos Anticorpos anti-CD28:** Através do Ensaio Imunoenzimático – ELISA realizado com as alíquotas retiradas nos intervalos de 12h do biorreator frasco tipo *spinner* para avaliar a produção dos anticorpos anti-CD28 através do cultivo do hibridoma PV1.

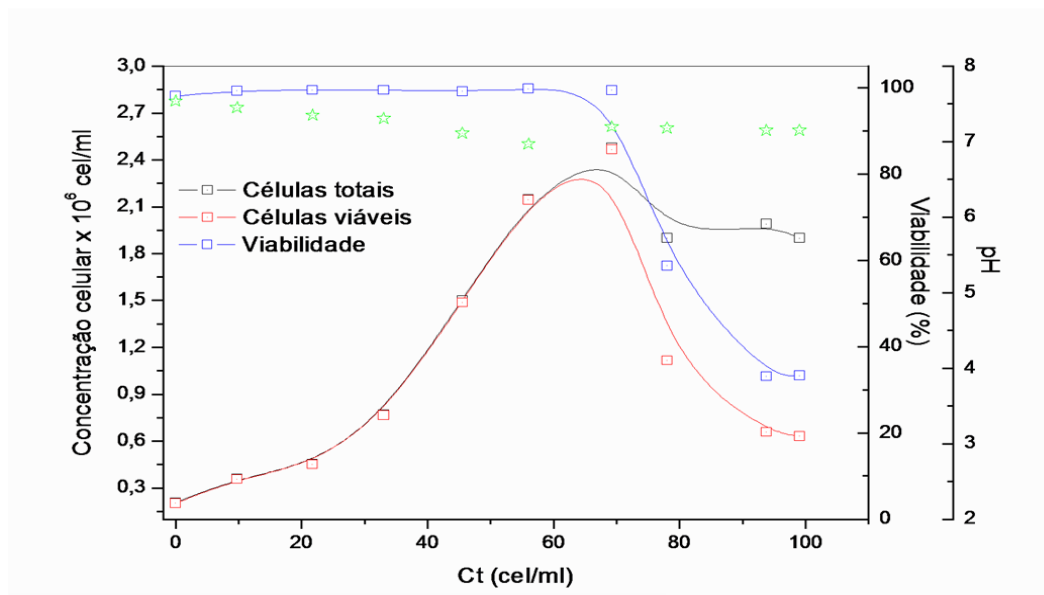


**FIGURA 18. Densidade óptica dos Anticorpos anti-CTLA4:** Através do Ensaio Imunoenzimático – ELISA realizado com as alíquotas retiradas nos intervalos de 12h do biorreator frasco tipo *spinner* para avaliar a produção dos anticorpos anti-CTLA4 através do cultivo do hibridoma 9H10.

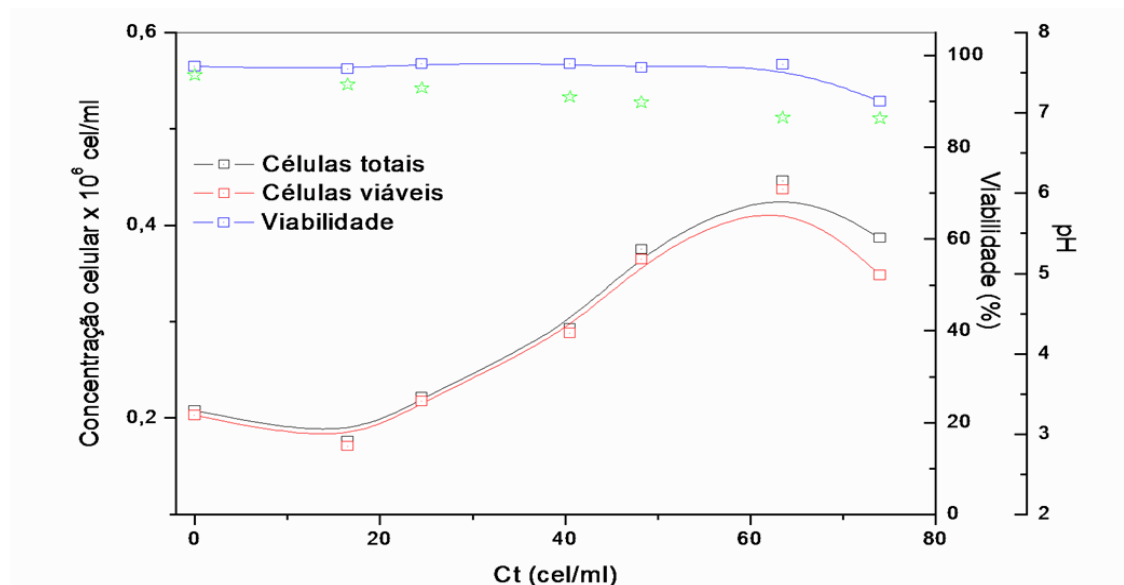


## **4.2 Viabilidade dos hibridomas para produção dos anticorpos**

As alíquotas retiradas nos intervalos de 12h do frasco foram mensurados quanto pH. A partir de todas as alíquotas, depois de mensurado o pH, foram feitas as contagens de células viáveis e inviáveis, através da metodologia de azul de trypan. Podemos observar nas figuras 19 e 20 as condições de crescimento e desenvolvimento de cada hibridoma. A viabilidade (linha azul) só se mantém elevada quando o pH permanece nas faixas de 7,4 -7,8.



**FIGURA 19. Avaliação da viabilidade e crescimento do hibridoma PV1:** Avaliação feita para produção dos anticorpos anti-CD28, a linha preta representa as células totais, a vermelha as células viáveis e a azul a viabilidade.



**FIGURA 20. Avaliação da viabilidade e crescimento do hibridoma 9H10:** Avaliação feita para produção dos anticorpos anti-CTLA4, a linha preta representa as células totais, a vermelha as células viáveis e a azul a viabilidade.

### **4.3 Purificação do sobrenadante da cultura de biorreator e soro de hamster em coluna de troca iônica**

As amostras obtidas tanto da cultura de biorreator e soro total dos hamsters, foram lavadas com tampão fosfato (PBS1x) pH 7,4 e concentradas no ultrafiltrador até atingirem o volume final de 75mL e em seguida foram eluídas em coluna de troca iônica e feita a leitura D.O. em 280nm. De cada purificado obtido foi feita a quantificação dos mesmos. Nossos resultados demonstram que foi possível purificar os anticorpos em estudo, sendo o hibridoma 9H10 mais eficiente em secretar anticorpos do que o hibridoma PV1 (Tabela 1).

**TABELA 1. Quantificação dos anticorpos:** Quantificação dos anticorpos presentes nos sobrenadantes da cultura de biorreator frasco tipo *spinner* e soro dos hamsters após eluição em coluna de troca iônica e leitura espectrofotométrica.

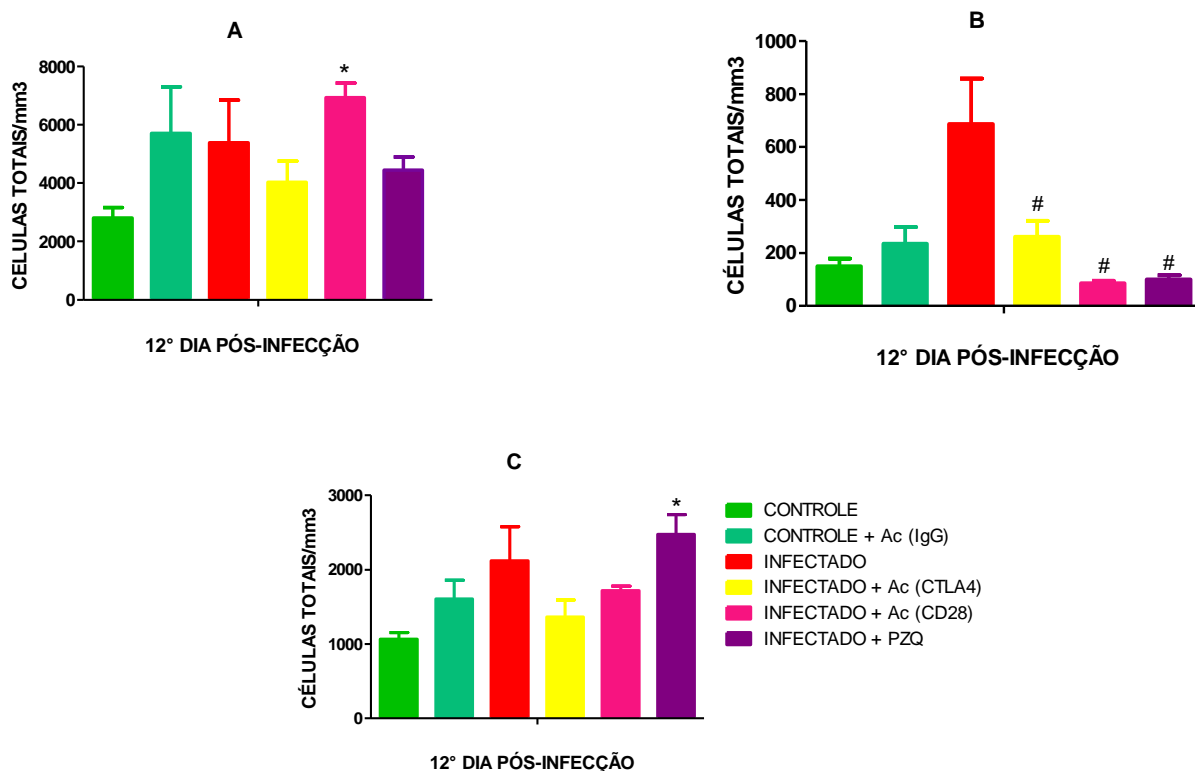
Quantificação das amostras através da leitura espectrofotométrica – 280nm					
	Leitura no espectrofotômetro	Diluição	Fator	mg/mL	Volume Final da amostra
<b>Soro de Hamster</b>	0,217	1:10	0,715	1,55	7,5mL
<b>Hibridoma PV-1 (anti-CD28)</b>	0,15	--	0,715	0,10725	3mL
<b>Hibridoma 9H10 (anti CTLA4)</b>	3,048	--	0,715	2,18	10mL

#### 4.4 Avaliação Celular

O número total e diferencial de células por  $\text{mm}^3$  foi determinado em períodos distintos da infecção: 12° (fase pré-ovular), 64° e 100° (pós-ovular) dia pós infecção, no sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e lavado da cavidade peritoneal (LCP). O objetivo foi avaliar a resposta celular à infecção, nos diferentes períodos aos diferentes tratamentos e principalmente diferenciar os tipos celulares envolvidos na resposta imune celular contra a infecção, classificando as células em mononucleares (linfócitos e monócitos) no sangue, (linfócitos e macrófagos) nos lavados e eosinófilos em ambos.

#### 4.5 Contagem global (total) de células no 12° dia pós infecção

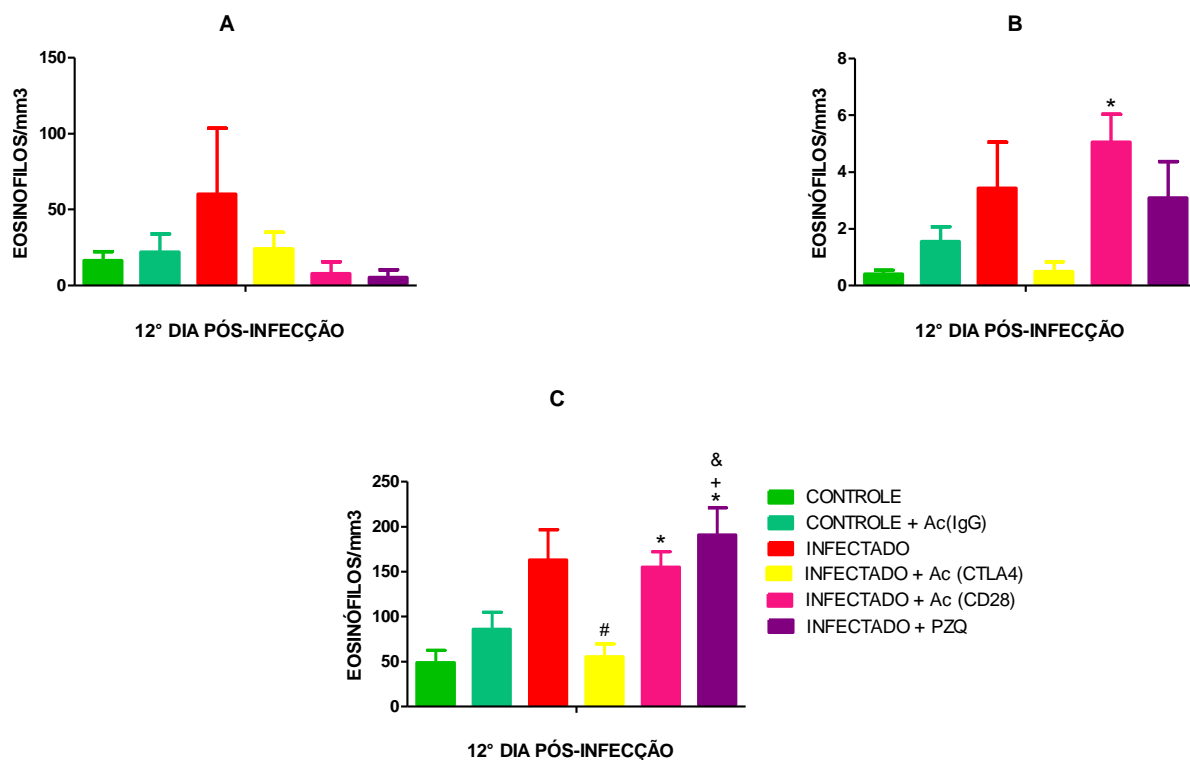
A figura 21 demonstra o número de células totais/ $\text{mm}^3$  no sangue, espaço broncoalveolar (pulmão) e cavidade peritoneal (peritônio) de camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ. No sangue o número de células/ $\text{mm}^3$  (Fig. 21A) apresentou aumento significativo no grupo infectado tratado com anti-CD28 quando comparado com o grupo controle. No espaço broncoalveolar (Fig. 21B) o número de células/ $\text{mm}^3$  nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ apresentaram diminuições significativas quando comparados com o grupo somente infectado. E na cavidade peritoneal (Fig. 21C) observamos aumento significativo de células/ $\text{mm}^3$  no grupo infectado tratado com PZQ quando comparado com o grupo controle.



**FIGURA 21. Contagem global (total) de células no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.** Células totais/mm<sup>3</sup> no sangue (A), Células/mm<sup>3</sup> no espaço broncoalveolar (B), e células/mm<sup>3</sup> na cavidade peritoneal (C), no 12° dia de infecção. Os dados representam a média ± EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. \* p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo controle. # p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

#### 4.6 Contagem diferencial de eosinófilos no 12º dia pós infecção

A figura 22 demonstra o número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> no sangue, no espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal dos camundongos infectados com *S.mansoni* e tratados com os anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ. No sangue (Fig. 22A) o número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> não apresentou alterações significativas entre os grupos, apesar de nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ ser observado diminuição de eosinófilos/mm<sup>3</sup> quando comparados ao grupo somente infectado. No espaço broncoalveolar (Fig. 22B) podemos observar um aumento significativo de eosinófilos/mm<sup>3</sup> no grupo infectado tratado com anti-CD28 quando comparado com o grupo controle. Na cavidade peritoneal (Fig. 22C) há aumento significativo de eosinófilos/mm<sup>3</sup> no grupo infectado tratado com anti-CD28 quando comparado com o grupo controle. Já o grupo infectado tratado com anti-CTLA4 apresentou diminuição significativa quando comparado com o grupo somente infectado. E o grupo infectados tratado com PZQ apresentou aumento significativo quando comparado com os grupos controle, controle tratado com IgG e infectado tratado com anti-CTLA4 (Fig. 22C).

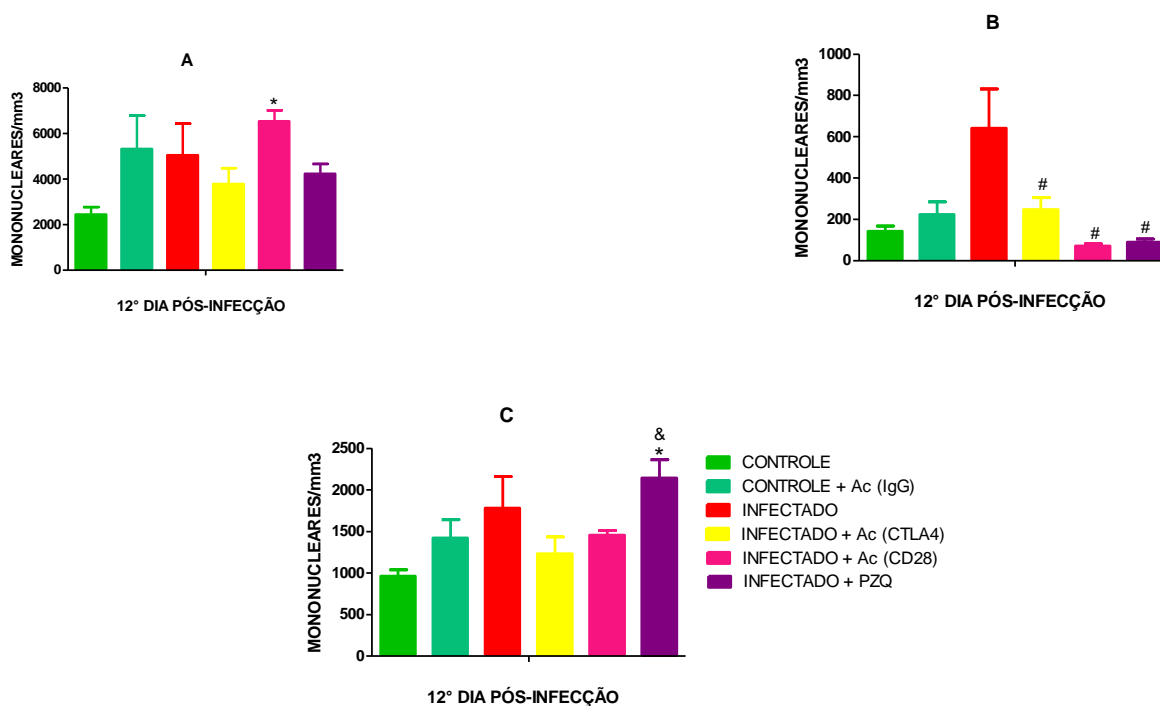


**FIGURA 22. Contagem diferencial de eosinófilos no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.** Eosinófilos/mm<sup>3</sup> no sangue (A), eosinófilos/mm<sup>3</sup> no espaço broncoalveolar (B), e eosinófilos/mm<sup>3</sup> na cavidade peritoneal (C), no 12º dia de infecção. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. \* p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo controle. + p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparado com o grupo controle/tratado IgG. # p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. & p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.



#### 4.7 Contagem diferencial de células mononucleares no 12º dia pós infecção

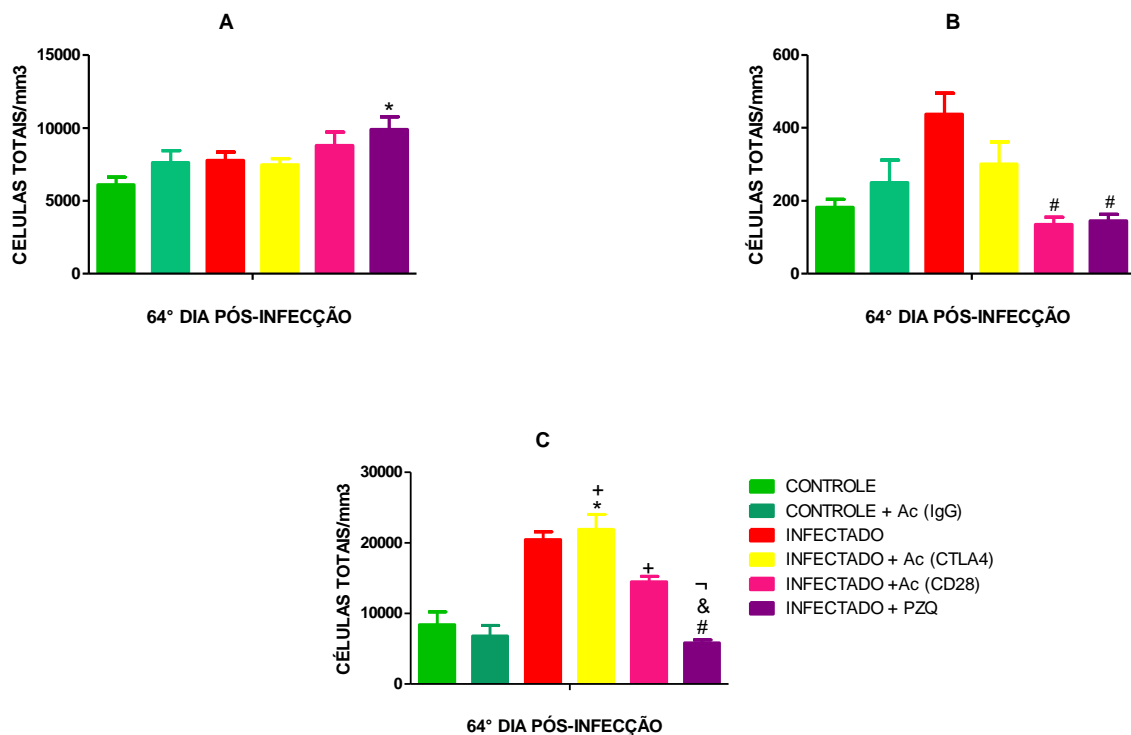
A figura 23 demonstra o número de células mononucleares/mm<sup>3</sup> no sangue, no espaço broncoalveolar (pulmão) e cavidade peritoneal (peritônio) dos camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com os anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ. No sangue (Fig. 23A) o número de células mononucleares/mm<sup>3</sup> apresentou aumento significativo no grupo infectado tratado com anti-CD28 quando comparado com o grupo controle. No espaço broncoalveolar (Fig. 23B) podemos observar uma diminuição significativa de células mononucleares/mm<sup>3</sup> entre os grupos infectados tratados com anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ quando comparados com o grupo somente infectado. Na cavidade peritoneal (Fig. 23C) houve aumento significativo de células mononucleares/mm<sup>3</sup> entre o grupo infectado tratado com PZQ quando comparado com os grupos controle e infectado tratado com anti-CTLA4.



**FIGURA 23. Contagem diferencial de mononucleares no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.** Células mononucleares/mm<sup>3</sup> no sangue (A), mononucleares/mm<sup>3</sup> no espaço broncoalveolar (B), e mononucleares/mm<sup>3</sup> na cavidade peritoneal (C), no 12° dia de infecção. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo controle. #  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. &  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre o resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

#### 4.8 Contagem global (total) de células no 64° dia pós infecção

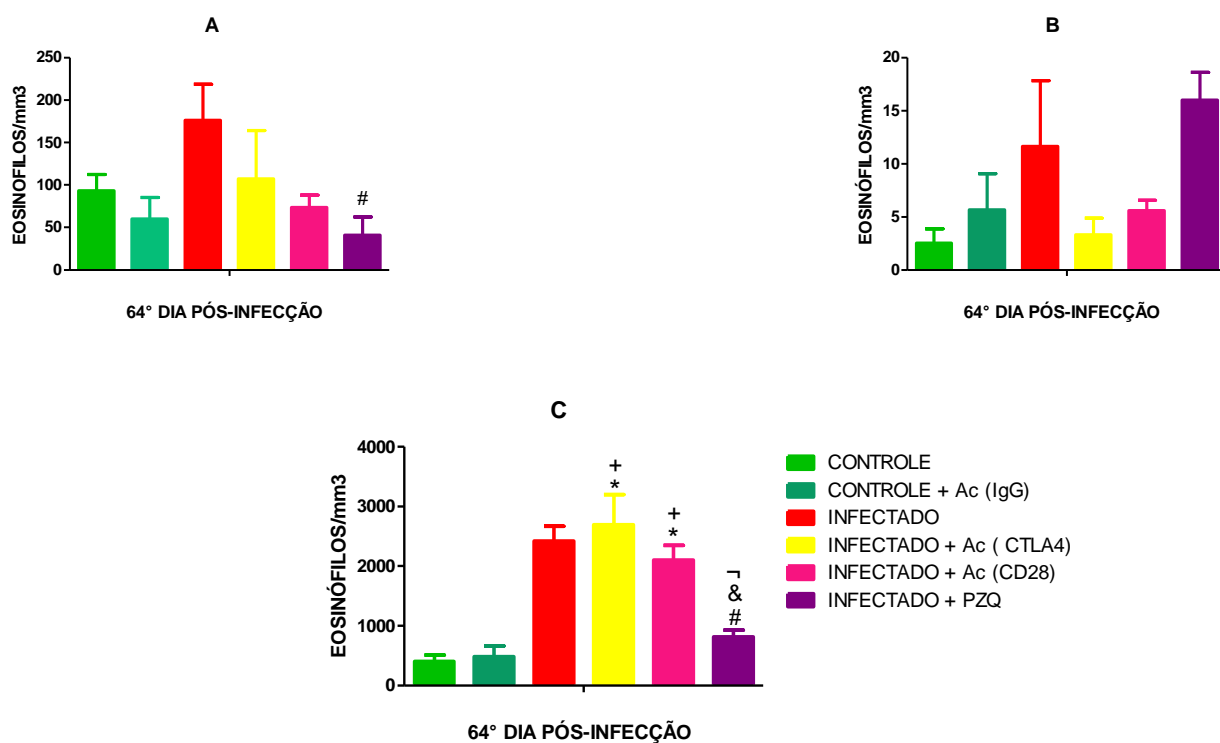
A figura 24 demonstra o número de células totais/mm<sup>3</sup> no sangue, espaço broncoalveolar (pulmão) e cavidade peritoneal (peritônio) de camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com os anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ. No sangue o número de células totais/mm<sup>3</sup> (Fig. 24A) apresentou aumento significativo no grupo infectado tratado com PZQ quando comparado com o grupo controle. No espaço broncoalveolar (Fig. 24B) o número de células totais/mm<sup>3</sup> nos grupos infectados tratados com anti-CD28 e PZQ apresentaram diminuições significativas quando comparados com o grupo somente infectado. Na cavidade peritoneal (Fig. 24C) observamos aumento significativo de células totais/mm<sup>3</sup> no grupo infectado tratado com anti-CTLA4 quando comparado com o grupo controle e controle tratado com IgG, além de aumento significativo de células totais/mm<sup>3</sup> no grupo infectado tratado com anti-CD28 quando comparado com o grupo controle tratado com IgG. E o grupo infectado tratado com PZQ apresentou uma diminuição significativa de células totais/mm<sup>3</sup> quando comparado com os grupos somente infectado, infetado tratado com anti-CTLA4 infectado tratado com anti-CD28 (Fig. 24C).



**FIGURA 24. Contagem global (total) de células no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.** Células totais/mm<sup>3</sup> no sangue (A), células/mm<sup>3</sup> no espaço broncoalveolar (B), e células/mm<sup>3</sup> na cavidade peritoneal (C), no 64º dia de infecção. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo controle. +  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparado com o grupo controle/tratado IgG. #  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. &  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4.  $\neg$   $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

#### 4.9 Contagem diferencial de eosinófilos no 64° dia pós infecção

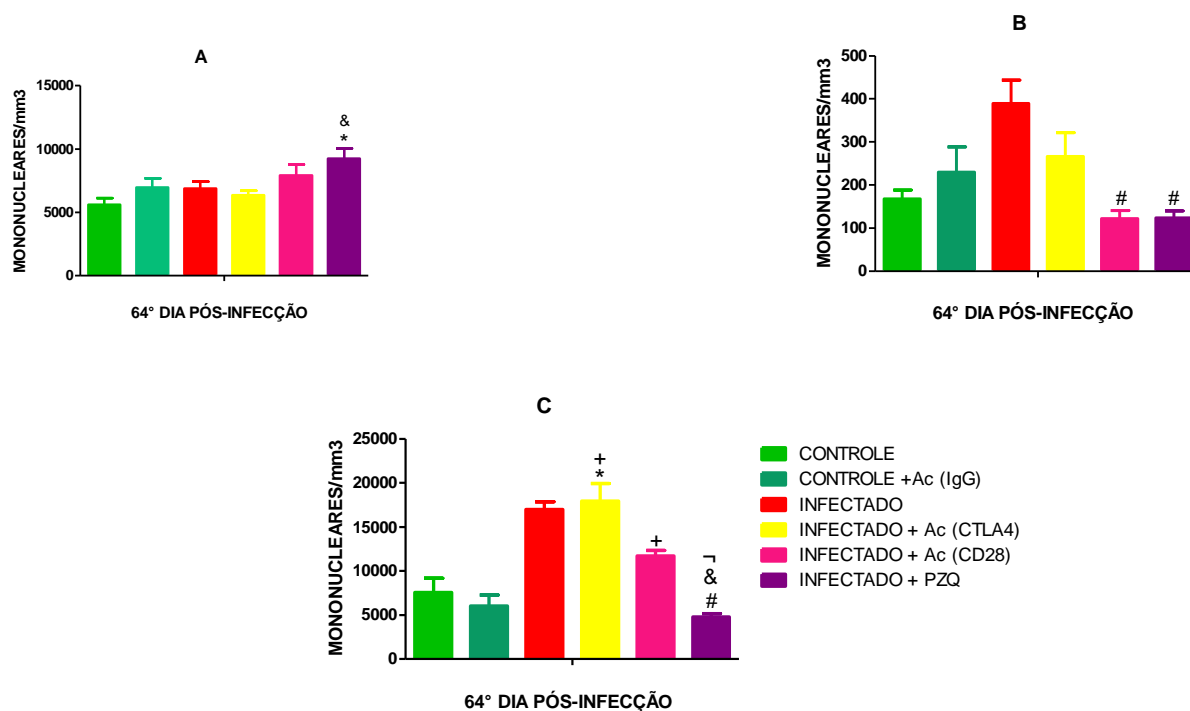
A figura 25 demonstra o número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> no sangue, no espaço broncoalveolar (pulmão) e cavidade peritoneal (peritônio) dos camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com os anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ. No sangue (Fig. 25A) o número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> apresentou diminuição significativa no grupo infectado tratado com PZQ quando comparado ao grupo somente infectado. No espaço broncoalveolar (Fig. 25B) o número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> não apresentou alterações significativas entre os grupos, apesar de, nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28 observarmos diminuição de eosinófilos/mm<sup>3</sup> quando comparados com o grupo somente infectado. Na cavidade peritoneal (Fig. 25C) há um aumento significativo de eosinófilos/mm<sup>3</sup> nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28 quando comparado com os grupos controle e controle tratado com IgG, e o grupo infectados tratado com PZQ apresentou diminuição significativa de eosinófilos/mm<sup>3</sup> quando comparado com os grupos somente infectado e infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28.



**FIGURA 25. Contagem diferencial de eosinófilos no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.** Eosinófilos/mm<sup>3</sup> no sangue (A), eosinófilos/mm<sup>3</sup> no espaço broncoalveolar (B), e eosinófilos/mm<sup>3</sup> na cavidade peritoneal (C), no 64° dia de infecção. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. \* p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo controle. + p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparado com o grupo controle/tratado IgG. # p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. & p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4. ⊃ p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

#### 4.10 Contagem diferencial de células mononucleares no 64<sup>o</sup> dia pós infecção

A figura 26 demonstra o número de células mononucleares/mm<sup>3</sup> no sangue, no espaço broncoalveolar (pulmão) e cavidade peritoneal (peritônio) dos camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com os anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ. No sangue (Fig. 26A) o número de células mononucleares/mm<sup>3</sup> apresentou aumento significativo no grupo infectado tratado com PZQ quando comparado com os grupos controle e infectado tratado com anti-CTLA4. No espaço broncoalveolar (Fig. 26B) podemos observar diminuição significativa de células mononucleares/mm<sup>3</sup> nos grupos infectados tratados com anti-CD28 e PZQ quando comparados com o grupo somente infectado. Na cavidade peritoneal (Fig. 26C) há um aumento significativo de células mononucleares/mm<sup>3</sup> no grupo infectado tratado com anti-CTLA4 quando comparado com os grupos controle e controle tratado com IgG, no grupo infectado tratado com anti-CD28 apresentou aumento significativo de células mononucleares/mm<sup>3</sup> quando comparado com o grupo controle tratado com IgG, e no grupo infectado tratado com PZQ apresentou diminuição significativa de células mononucleares/mm<sup>3</sup> quando comparado com os grupos somente infectado e infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28.

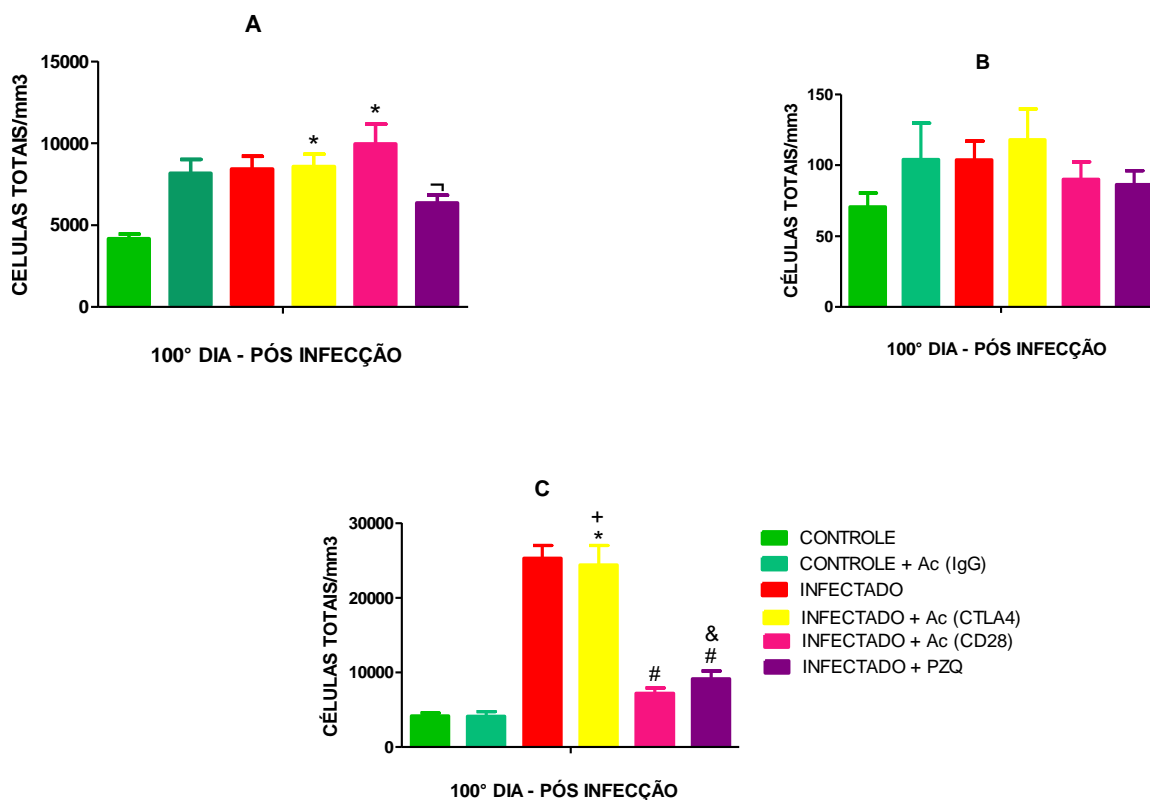


**FIGURA 26. Contagem diferencial de mononucleares no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.** Células mononucleares/mm<sup>3</sup> no sangue (A), mononucleares/mm<sup>3</sup> no espaço broncoalveolar (B), e mononucleares/mm<sup>3</sup> na cavidade peritoneal (C), no 64° dia de infecção. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo controle. +  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparado com o grupo controle/tratado IgG. #  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. &  $p < 0,05$  representam a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4. J  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.



#### 4.11 Contagem global (total) de células no 100° dia pós infecção

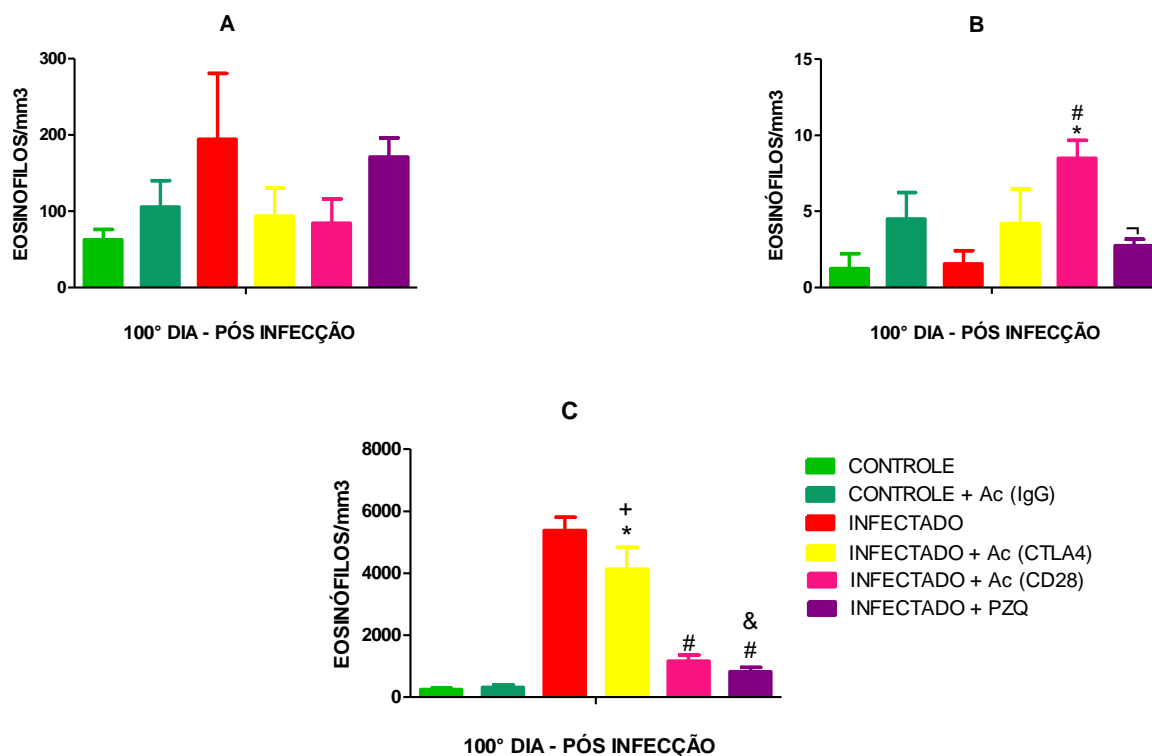
A figura 27 demonstra o número de células totais/mm<sup>3</sup> no sangue, espaço broncoalveolar (pulmão) e cavidade peritoneal (peritônio) de camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com os anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ. No sangue o número de células totais/mm<sup>3</sup> (Fig. 27A) apresentou aumento significativo nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28 quando comparado com o grupo controle, e no grupo infectado tratado com PZQ apresentou diminuição significativa no número de células totais/mm<sup>3</sup> quando comparado com o grupo infectado tratado com anti-CD28. No espaço broncoalveolar (Fig. 27B) não foram observadas alterações significativas no número de células totais/mm<sup>3</sup> entre os grupos. Na cavidade peritoneal (Fig. 27C) observamos aumento significativo de células totais/mm<sup>3</sup> no grupo infectado tratado com anti-CTLA4 quando comparado com o grupo controle e controle tratado com IgG, observamos também diminuição significativa de células totais/mm<sup>3</sup> no grupo infectado tratado com anti-CD28 quando comparado com o grupo somente infectado. E no grupo infectado tratado com PZQ houve diminuição significativa de células totais/mm<sup>3</sup> quando comparado com os grupos somente infectado e infectado tratado com anti-CTLA4 (Fig. 27C).



**FIGURA 27. Contagem global (total) de células no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.** Células totais/mm<sup>3</sup> no sangue (A), células totais/mm<sup>3</sup> no espaço broncoalveolar (B), e células totais/mm<sup>3</sup> na cavidade peritoneal (C), no 100º dia de infecção. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. \* p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo controle. + p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparado com o grupo controle/tratado IgG. # p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. & p < 0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4. <sup>⊃</sup> p < 0,05 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

#### 4.12 Contagem diferencial de eosinófilos no 100° dia pós infecção

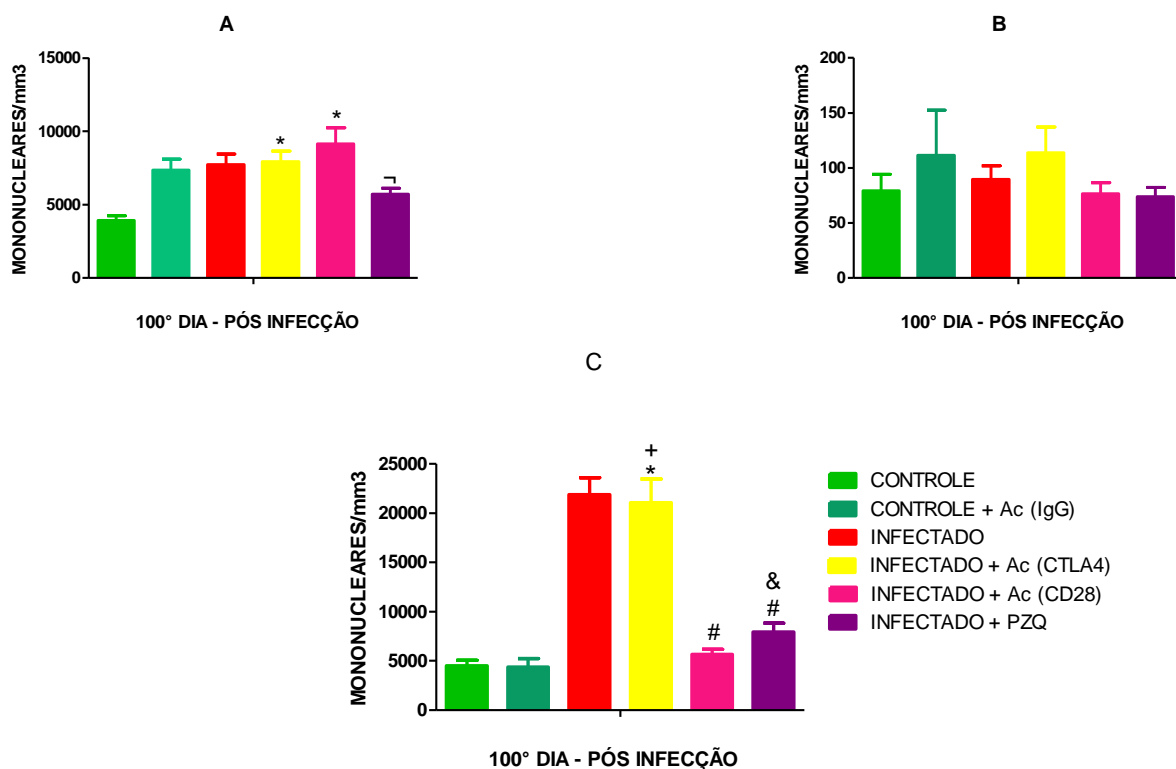
A figura 28 demonstra o número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> no sangue, no espaço broncoalveolar (pulmão) e cavidade peritoneal (peritônio) dos camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com os anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ. No sangue (Fig. 28A) o número de eosinófilos/mm<sup>3</sup> não apresentou alterações significativas entre os grupos, apesar de, nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ observamos diminuição de eosinófilos/mm<sup>3</sup> quando comparados ao grupo somente infectado. No espaço broncoalveolar (Fig. 28B) podemos observar aumento significativo de eosinófilos/mm<sup>3</sup> no grupo infectado tratado com anti-CD28 quando comparado com os grupos controle e somente infectado. E o grupo infectado tratado com PZQ foi observado diminuição significativa de eosinófilos/mm<sup>3</sup> quando comparado com o grupo infectado tratado com anti-CD28 (Fig. 28B). Na cavidade peritoneal (Fig. 28C) podemos observar aumento significativo de eosinófilos/mm<sup>3</sup> no grupo infectado tratado com anti-CTLA4 quando comparado com os grupos controle e controle tratado com IgG, e há diminuição significativa de eosinófilos/mm<sup>3</sup> no grupo infectado tratado com anti-CD28 quando comparado com o grupo somente infectado. E o grupo infectado tratado com PZQ apresentou diminuição significativa de eosinófilos/mm<sup>3</sup> quando comparado com os grupos somente infectado e infectado tratado com anti-CTLA4 (Fig. 28C).



**FIGURA 28. Contagem diferencial de eosinófilos no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.** Eosinófilos/mm<sup>3</sup> no sangue (A), eosinófilos/mm<sup>3</sup> no espaço broncoalveolar (B), e eosinófilos/mm<sup>3</sup> na cavidade peritoneal (C), no 100° dia de infecção. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo controle. +  $p < 0,05$  representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparado com o grupo controle/tratado IgG. #  $p < 0,05$  representam a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. &  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4.  $\neg$   $p < 0,05$  representam a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

#### 4.13 Contagem diferencial de mononucleares no 100° dia pós infecção

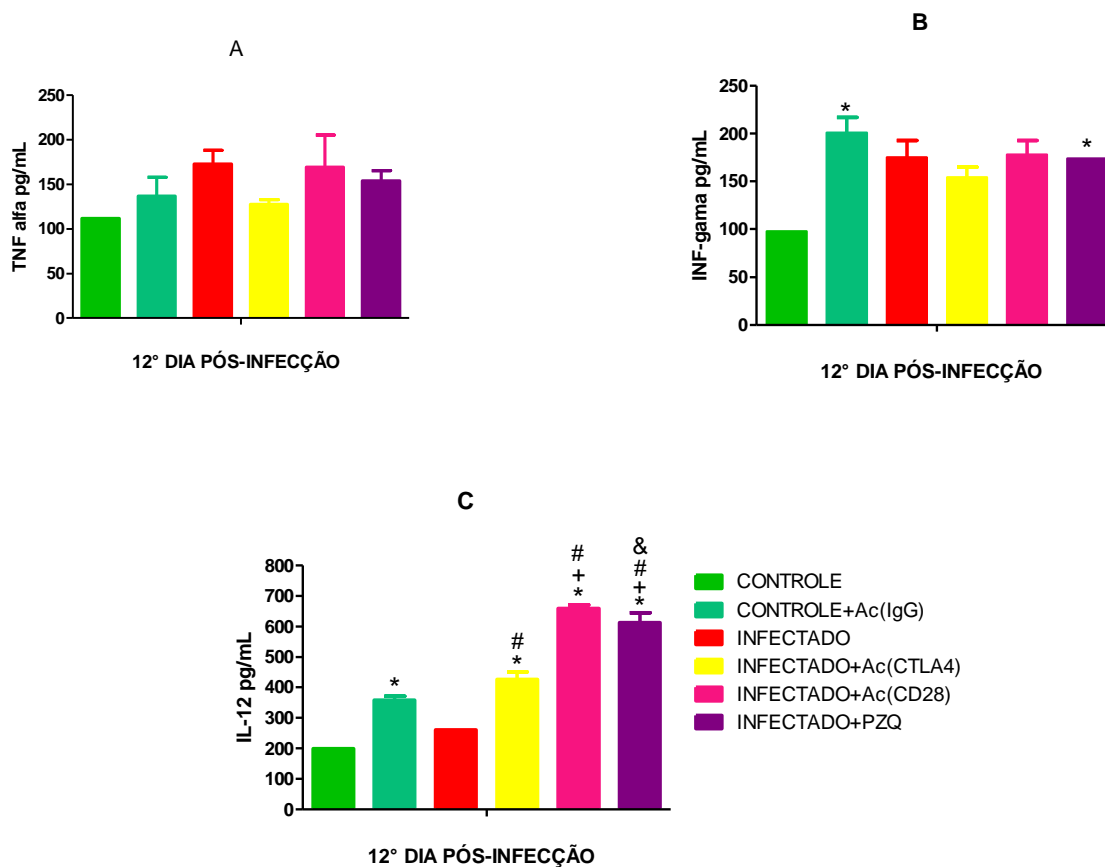
A figura 29 demonstra o número de células mononucleares/mm<sup>3</sup> no sangue, no espaço broncoalveolar (pulmão) e cavidade peritoneal (peritônio) dos camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com os anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ. No sangue (Fig. 29A) o número de células mononucleares/mm<sup>3</sup> apresentou aumento significativo nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28 quando comparado com o grupo controle, e no grupo infectado tratado com PZQ apresentou diminuição significativa de células mononucleares/mm<sup>3</sup> quando comparado com o grupo infectado tratado com anti-CD28. No espaço broncoalveolar (Fig. 29B) podemos observar que não houve alterações significativas de células mononucleares/mm<sup>3</sup> entre os grupos. Na cavidade peritoneal (Fig. 29C) foi observado aumento significativo de células mononucleares/mm<sup>3</sup> no grupo infectado tratado com anti-CTLA4 quando comparado com os grupos controle e controle tratado com IgG, no grupo infectado tratado com anti-CD28 observou-se diminuição significativa de células mononucleares/mm<sup>3</sup> quando comparado com o grupo somente infectado. No grupo infectado tratado com PZQ apresentou diminuição significativa de células mononucleares/mm<sup>3</sup> quando comparado com os grupos somente infectado, infectado tratado com anti-CTLA4 (Fig. 29C).



**FIGURA 29. Contagem diferencial de mononucleares no sangue, espaço broncoalveolar e cavidade peritoneal.** Células mononucleares/mm<sup>3</sup> no sangue (A), mononucleares/mm<sup>3</sup> no espaço broncoalveolar (B), e células mononucleares/mm<sup>3</sup> na cavidade peritoneal (C), no 100° dia de infecção. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo controle. <sup>+</sup>  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparado com o grupo controle/tratado IgG. <sup>#</sup>  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. <sup>&</sup>  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4.  $\neg$   $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

#### 4.14 Avaliação das citocinas no 12º dia pós infecção

As concentrações das citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  foram determinadas no sobrenadante do homogenato de pulmão, e a IL-12 no plasma dos camundongos infectados ou não com *S.mansoni* e tratados ou não com anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ. No 12º dia pós infecção, os valores em pg/mL das interleucinas dos diferentes grupos estão representados na figura 30. Os grupos infectados tratados apresentaram alterações na concentração das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12. No entanto o grupo infectado tratado com PZQ e controle + Ac (IgG) apresentaram aumento significativo de IFN- $\gamma$  quando comparados com o grupo controle. Os grupos infectados tratados com os anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28 apresentaram aumento significativo de IL-12 quando comparados com os grupos somente infectado, controle e controle + Ac (IgG). Já o grupo infectado tratado com PZQ apresentou aumento significativo de IL-12 quando comparado com os grupos somente infectado, controle, controle + Ac (IgG) e infectado tratado com anti-CTLA4.



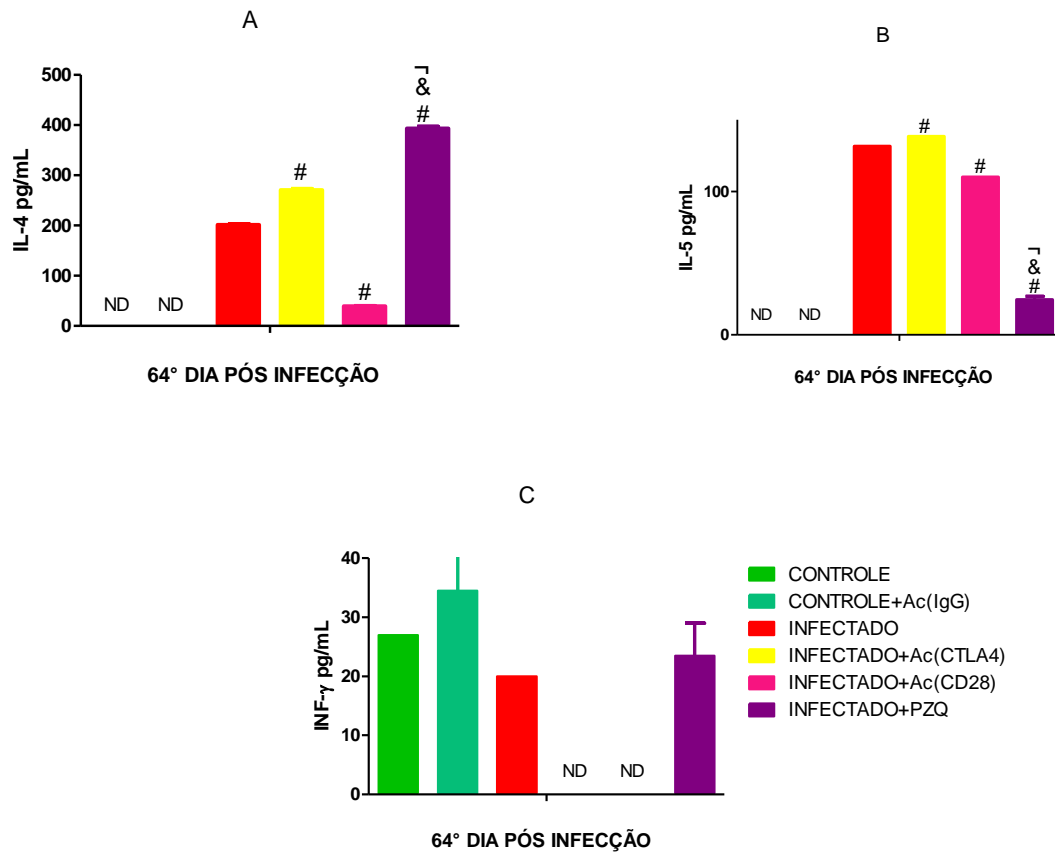
**FIGURA 30. Avaliação das citocinas TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-12 pg/mL no 12º dia pós infecção.**

TNF- $\alpha$  pg/mL em Homogenato de pulmão (A), INF- $\gamma$  pg/mL em Homogenato de pulmão (B), e IL-12 pg/mL em plasma (C), no 12º dia de infecção. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo controle. +  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparado com o grupo controle/tratado IgG. #  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. &  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.



#### 4.15 Avaliação das citocinas no 64° dia pós infecção

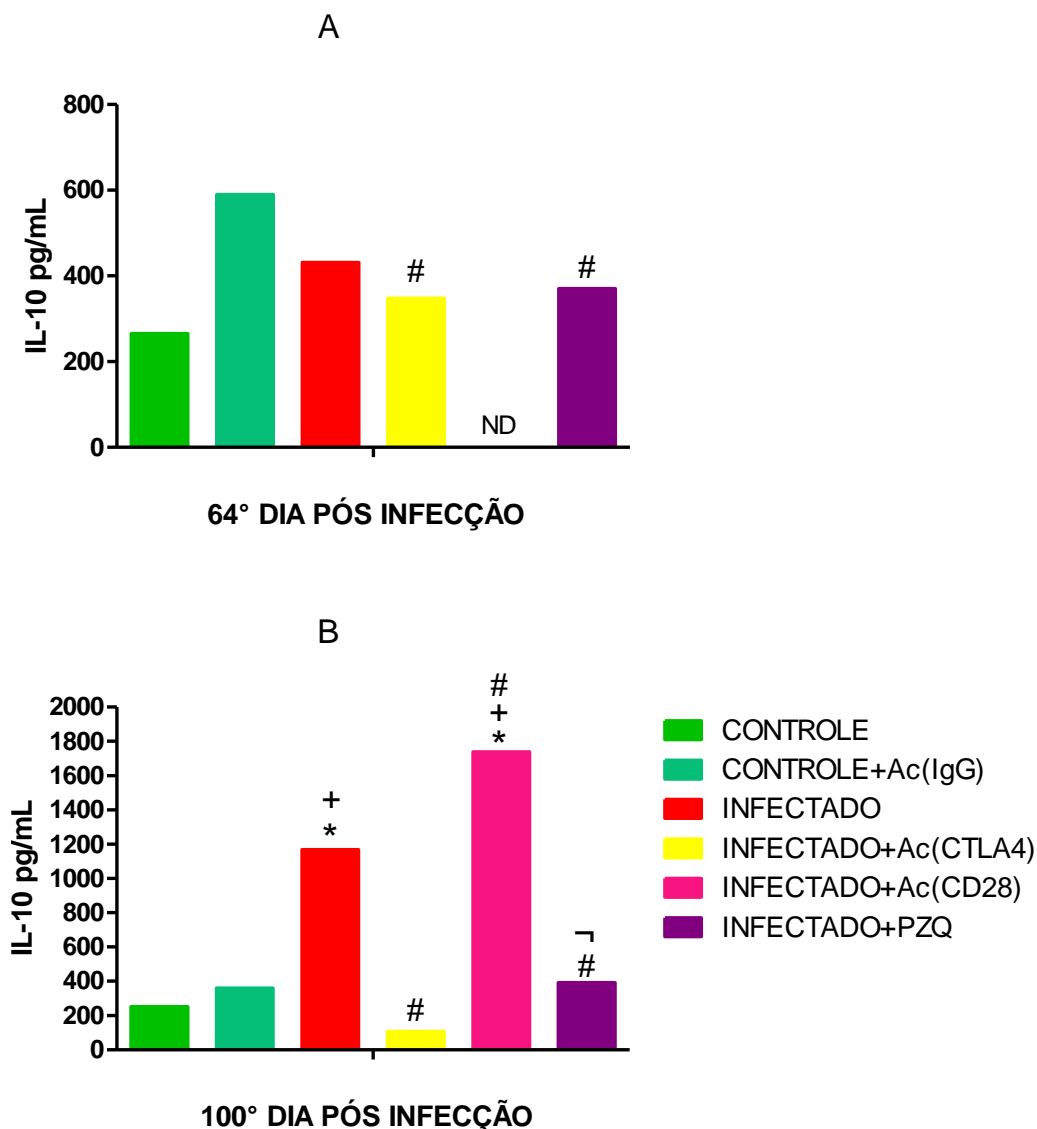
As concentrações das citocinas IL-4, IL-5 e IFN- $\gamma$  foram determinadas no plasma dos camundongos infectados ou não com *S. mansoni* e tratados ou não com os anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ. No 64° dia pós infecção, os valores em pg/mL das interleucinas dos diferentes grupos estão representados na figura 31. Os grupos infectados e infectados tratados apresentaram alterações nos níveis das citocinas IL-4, IL-5 e INF-gama. No entanto, o grupo infectado tratado com anti-CTLA4 apresentou aumento significativo de IL-4 e IL-5 quando comparados com seus respectivos grupos somente infectado. Já o grupo infectado tratado com anti-CD28 apresentou diminuição significativa de IL-4 e IL-5 quando comparado com o grupo somente infectado e o grupo infectado tratado com PZQ apresentou aumento significativo de IL-4 e diminuição significativa de IL-5 quando comparado com o grupo somente infectado, enquanto que os grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28 não apresentaram de INF- $\gamma$  no plasma, já o grupo infectado tratado com PZQ apresentou alterações na concentração de INF- $\gamma$ , porém não significativa.



**FIGURA 31. Avaliação das citocinas IL-4, IL-5 e INF- $\gamma$  pg/mL no 64° dia pós infecção.** IL-4 pg/mL no plasma (A), IL-5 pg/mL no plasma (B), INF- $\gamma$  pg/mL em plasma (C), no 64° dia de infecção. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. #  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. &  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4.  $\neg$   $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA. ND (não detectado).

#### 4.16 Avaliação da citocina IL-10 no 64° e 100° dia pós infecção

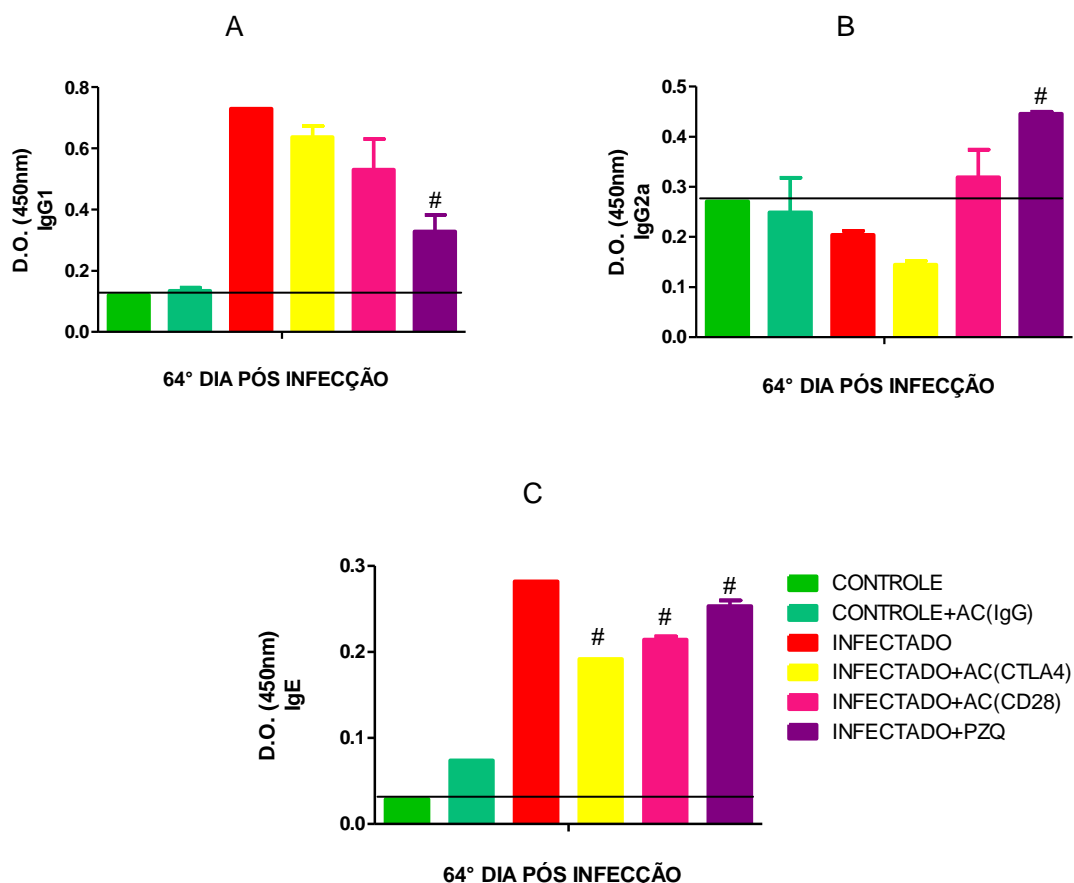
A concentração da citocina IL-10 foi determinada no plasma dos camundongos infectados ou não com *S. mansoni* e tratados ou não com anticorpos anti-CTLA4, anti-CD28, IgG total de hamsters e PZQ, no 64° e 100° dia pós infecção. O valor em pg/mL das interleucinas dos diferentes grupos estão representados na figura 32. Os grupos infectados e infectados tratados apresentaram alterações na concentração das citocinas. O grupo infectado tratado com anti-CTLA4 e PZQ apresentou diminuição significativa de IL-10 no 64° dia pós infecção quando comparados com o grupo somente infectado. Já no 100° dia pós infecção observamos que os grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e PZQ apresentaram diminuição significativa de IL-10 quando comparado com o grupo somente infectado e o grupo infectado tratado com anti-CD28 apresentou aumento significativo de IL-10 quando comparado com o grupo somente infectado.



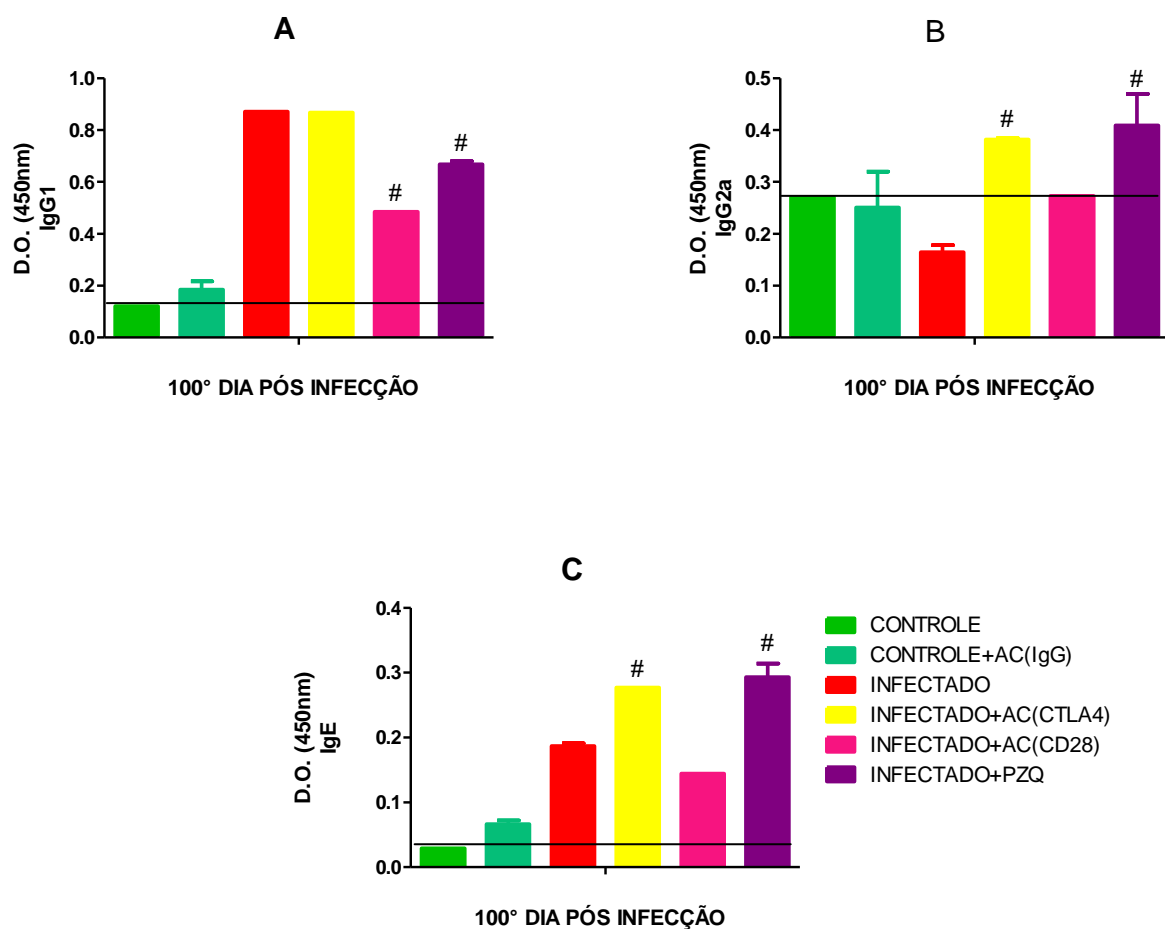
**FIGURA 32. Avaliação da citocina IL-10 pg/mL no 64° e 100° dia pós infecção.** IL-10 pg/mL no plasma no 64° dia pós infecção (A), IL-10 pg/mL no plasma no 100° dia pós infecção (B). Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. \*  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo controle. +  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparado com o grupo controle/tratado IgG. #  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado.  $\sqsupset$   $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA. ND (não detectado).

#### 4.17 Avaliação dos anticorpos circulantes no 64° e 100° dia pós infecção

As Figuras 33 e 34 representam a densidade óptica (D.O. 450nm) dos anticorpos IgG1, IgG2a e IgE reativos a antígenos dos vermes adultos presentes no plasma dos animais infectados ou não com *S. mansoni* e tratados ou não com IgG total de hamsters, anticorpos (mAb) anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ, no 64° e 100° dia pós infecção. O plasma dos animais do grupo controle (não infectado e não tratado) foi utilizado como controle negativo (ligações inespecíficas), determinando-se assim a D.O. de corte. Foram observadas diminuição nos níveis de IgG1 nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ (significativo) quando comparados ao grupo somente infectado no 64° dia pós infecção (Fig. 33 A), entretanto, no 100° dia pós infecção foram observadas diminuição significativa nos grupos infectados tratados com anti-CD28 e PZQ quando comparados ao grupo somente infectado (Fig. 34 A). Em relação aos níveis de IgG2a foi observado aumento nos grupos infectados tratados com anti-CD28 e PZQ (significativo) e diminuição não significativa no grupo infectado tratado com anti-CTLA4 quando comparados ao grupo somente infectado no 64° dia pós infecção (Fig. 33B), já no 100° dia pós infecção foram observadas aumento significativo nos níveis de IgG2a nos grupos infectados tratado com anti-CTLA4 e PZQ quando comparados ao grupo somente infectado e no grupo infectado tratado com anti-CD28 os níveis permaneceram iguais ao controle (Fig. 34 B); e os níveis de IgE foram observadas diminuição significativa nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ quando comparados ao grupo somente infectado no 64° dia pós infecção (Fig. 33C), no entanto no 100° dia pós infecção foi observado aumento significativo nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e PZQ e diminuição não significativa no grupo infectado tratado com anti-CD28 quando comparados ao grupo somente infectado (Fig. 34C).



**FIGURA 33. Níveis de anticorpos anti-*S. mansoni* presentes no plasma no 64° dia pós infecção.** Níveis de IgG1(A); IgG2a (B) e IgE (C) no plasma. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. #  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado.  $\neg$   $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

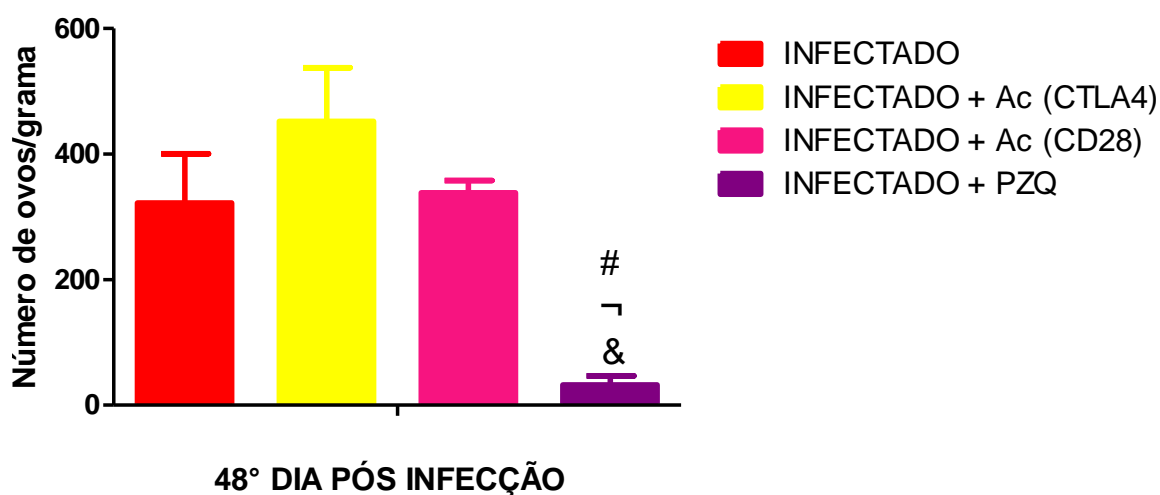


**FIGURA 34. Níveis de anticorpos anti-*S. mansoni* presentes no plasma no 100° dia pós infecção.** Níveis de IgG1(A); IgG2a (B) e IgE (C) no plasma. Os dados representam a média  $\pm$  EPM (n= 10 animais) de 2 experimentos independentes. #  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado.  $\sphericalangle$   $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

#### **4.18 Avaliação da Carga Parasitária no 48º dia pós infecção**

O número de ovos por grama de fezes foi determinado pela técnica de Kato-Katz, 48º dia após a infecção. As respectivas médias  $\pm$  EPM, dos grupos: somente infectado ( $322 \pm 78.9$ ,  $n=10$ ); infectado tratado com anti-CTLA4 ( $452 \pm 85.8$ ,  $n=10$ ), infectado tratado com anti-CD28 ( $338.6 \pm 19.7$ ,  $n=10$ ) e infectado tratado com PZQ ( $32.7 \pm 14.2$ ,  $n=10$ ). O grupo infectado tratado com PZQ apresentou diminuição significativa no número de ovos por grama de fezes quando comparado aos grupos somente infectado e infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28 (Fig. 35).

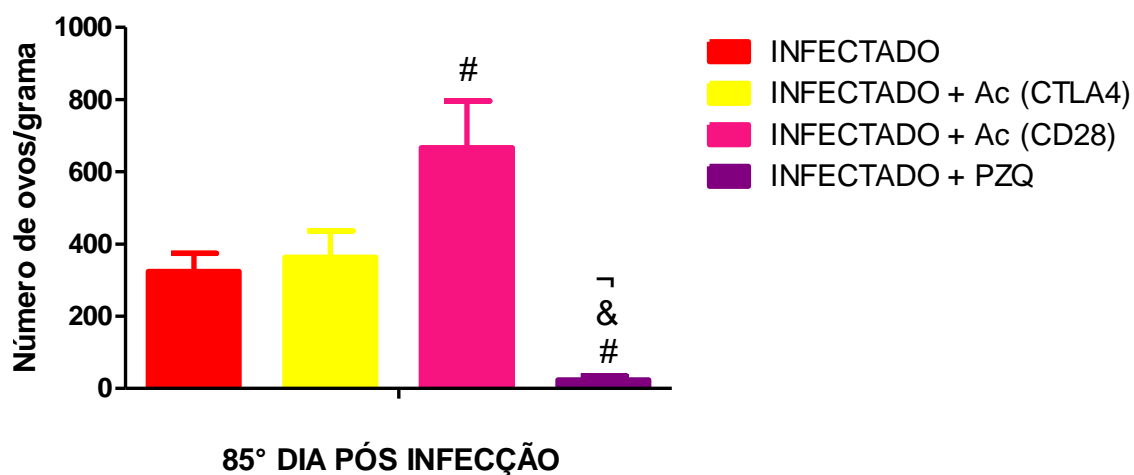




**FIGURA 35. Número de ovos por grama de fezes, 48° dia pós infecção.** A cor vermelha representa o grupo infectado não tratado, a amarela o grupo infectado e tratado com anti-CTLA4, a rosa o grupo infectado e tratado com anti-CD28 e a roxa representa o grupo infectado e tratado com Praziquantel. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 2 experimentos independentes. #  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. &  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre o resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4. †  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

#### 4.19 Avaliação da Carga Parasitária no 85° dia pós infecção

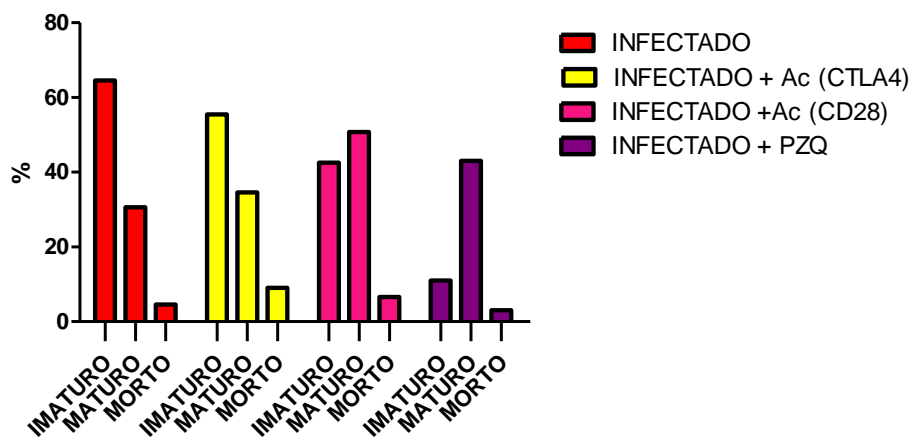
O número de ovos por grama de fezes foi determinado pela técnica de Kato-Katz, 85° dia após a infecção. As respectivas médias  $\pm$  EPM, dos grupos: somente infectado ( $324.9 \pm 50$ ,  $n=10$ ); infectado tratado com anti-CTLA4 ( $363.6 \pm 72.7$ ,  $n=10$ ), infectado tratado com anti-CD28 ( $666.6 \pm 129.9$ ,  $n=10$ ) e infectado tratado com PZQ ( $24 \pm 10.7$ ,  $n=10$ ). O grupo infectado tratado com anti-CD28 apresentou um aumento significativo no número de ovos por grama de fezes quando comparado ao grupo somente infectado. Já no grupo infectado tratado com PZQ apresentou diminuição significativa no número de ovos por grama de fezes quando comparado aos grupos somente infectado e infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28 (Fig. 36).



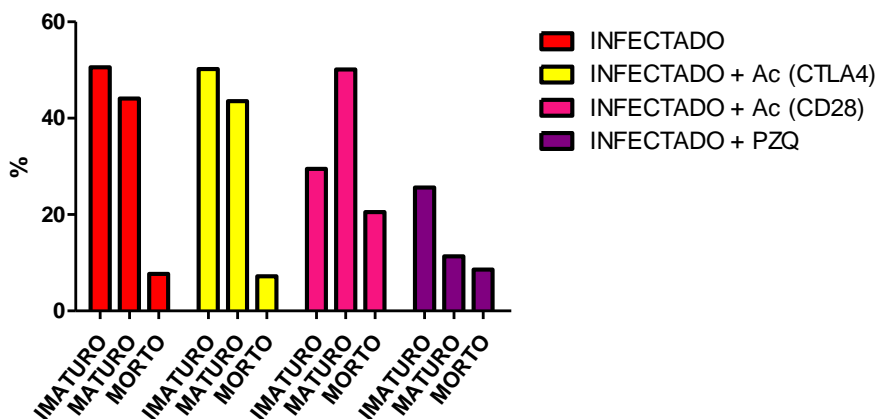
**FIGURA 36. Número de ovos por grama de fezes, 85° dia pós infecção.** A cor vermelha representa o grupo infectado não tratado, a amarela o grupo infectado e tratado com anti-CTLA4, a rosa o grupo infectado e tratado com anti-CD28 e a roxa representa o grupo infectado e tratado com Praziquantel. Os dados representam a média  $\pm$  EPM de 2 experimentos independentes. #  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos dos grupos infectados/tratados quando comparados com o grupo infectado não tratado. &  $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CTLA4.  $\neg$   $p < 0,05$  representa a diferença significativa entre os resultados obtidos do grupo infectado/tratado com PZQ quando comparado com o grupo infectado/tratado com anti-CD28 usando o teste não paramétrico One-way teste Tukey's ANOVA.

#### 4.20 Viabilidade dos ovos

Após retirar fragmentos de intestino grosso no 64° e 100° dia pós infecção os mesmos foram avaliados e a viabilidade dos ovos foi determinada pela técnica Oograma (PELLEGRINO and FARIA, 1965). Os fragmentos foram microscopicamente analisados, contou-se 300 ovos/camundongo, os quais foram classificados de acordo com os seus estágios de desenvolvimento, como mostra de forma representativa e respectivamente nas figuras 37 e 38. Os ovos foram classificados em: ovos imaturos viáveis (1° a 4° estágio); ovos maduros viáveis; e, ovos inviáveis (calcificados, com miracídio retraído, semi-transparentes) (PELLEGRINO and KATZ, 1969). Podemos observar alterações não significativas no estágio de desenvolvimento dos ovos no 64° dia pós infecção (Fig. 37) como a diminuição de ovos imaturos nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ quando comparados com o grupo somente infectado, e o aumento de ovos maduros nos grupos infectados tratados com anti-CD28 e PZQ quando comparados com o grupo somente infectado e um aumento de ovos mortos nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28 quando comparados com ao grupo somente infectado. No 100° dia pós infecção (Fig. 38) observamos alterações não significativas no estágio de desenvolvimento dos ovos como aumento de ovos maduros no grupo infectado tratado com anti-CD28 quando comparado com o grupo somente infectado e aumento de ovos mortos nos grupo infectado tratado com anti-CD28 quando comparados com o grupo somente infectado.



**FIGURA 37. Estágio de desenvolvimento dos ovos no 64º dia pós infecção.** A cor vermelha representa o grupo infectado não tratado, a amarela o grupo infectado e tratado com anti-CTLA4, a rosa o grupo infectado e tratado com anti-CD28 e a roxa representa o grupo infectado e tratado com Praziquantel.

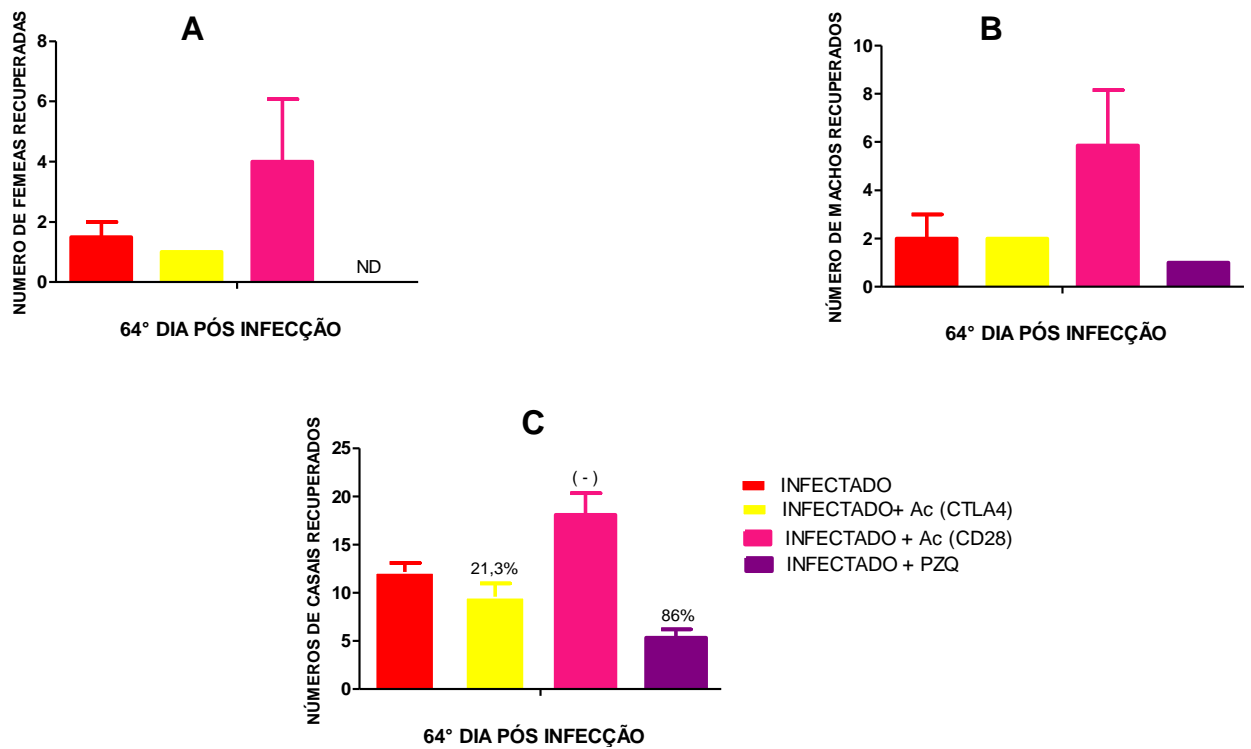


**FIGURA 38. Estágio de desenvolvimento dos ovos no 100º dia pós infecção.** A cor vermelha representa o grupo infectado não tratado, a amarela o grupo infectado e tratado com anti-CTLA4, a rosa o grupo infectado e tratado com anti-CD28 e a roxa representa o grupo infectado e tratado com Praziquantel.

#### 4.21 Número de vermes recuperados no 64º dia pós infecção

Após 64 dias de infecção, realizou-se a técnica de perfusão do sistema porta-hepático para recuperação de vermes adultos, na figura 39 estão representados os vermes recuperados dos grupos: somente infectado, infectado tratado com anti-CTLA4, infectado tratado com anti-CD28 e infectado tratado com PZQ. O número de vermes adultos fêmeas encontradas separadas do macho (Fig. 39A), o número de vermes adultos machos encontrados separados da fêmea (Fig. 39B) e o número de vermes adultos encontrados acasalados e com suas respectivas porcentagens (%) de redução da carga parasitária (Fig. 39C), que foi calculada segundo FONSECA et al., 2004.

A média de vermes acasalados recuperados no grupo somente infectado foi de 12,2, no grupo infectado tratado com anti-CTLA4 foi de 9,6, no grupo infectado tratado com anti-CD28 foi de 16,3 e no grupo infectado tratado com PZQ foi de 1,7. Já a % de redução da carga parasitária no grupo de animais infectado tratado com anti-CTLA4 em relação ao grupo somente infectado foi 21,3%, no grupo de animais infectado tratado com anti-CD28 % de redução da carga parasitária em relação ao grupo somente infectado foi -37,7% e no grupo de animais infectado tratado com PZQ % de redução da carga parasitária em relação ao grupo somente infectado foi 86% (Fig. 39C).



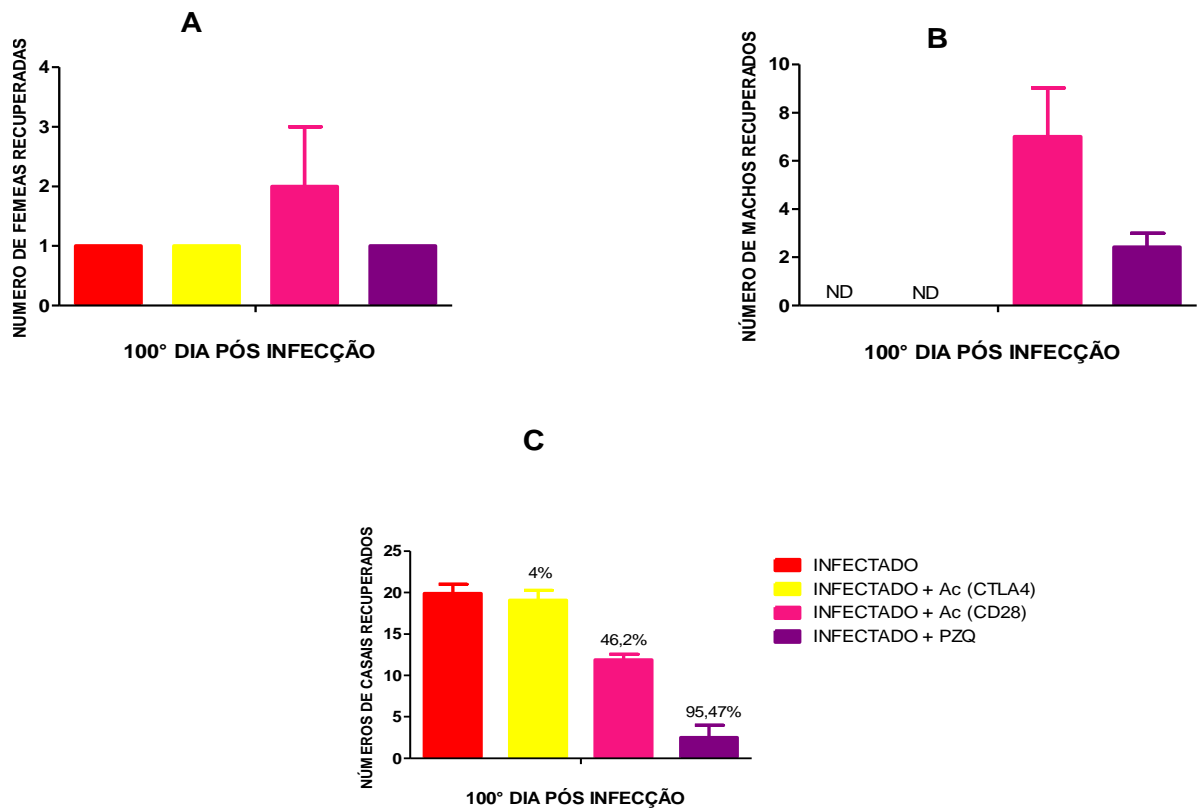
**FIGURA 39. Número de vermes recuperados no 64° dia pós infecção:** Número de vermes adultos fêmeas separados do macho recuperado (A), Número de vermes adultos machos separados da fêmea recuperados (B), e Número de vermes adultos acasalados e suas respectivas % de redução da carga parasitária (C). Os vermes foram recuperados através do sistema porta-hepático dos grupos: controle infectado não tratado, infectado/tratado com anti-CTLA4, infectado/tratado com anti-CD28 e infectado tratado com PZQ, no 64° dia pós infecção. Os dados representam n= 10 animais de 2 experimentos independentes. ND (não detectado).

#### 4.22 Número de vermes recuperados no 100º dia pós infecção

Após 100 dias de infecção, realizou-se a técnica de perfusão do sistema porta-hepático para recuperação de vermes adultos. Na figura 40 estão representados os vermes recuperados dos grupos: somente infectado, infectado tratado com anti-CTLA4, infectado tratado com anti-CD28 e infectado tratado com PZQ. O número de vermes adultos fêmeas encontradas separadas do macho (Fig. 40A), o número de vermes adultos machos encontrados separados da fêmea (Fig. 40B) e o número de vermes adultos encontrados acasalados e com suas respectivas porcentagens (%) de redução da carga parasitária (Fig. 40C), que foi calculada segundo FONSECA et al., 2004.

A média de vermes recuperados no grupo infectado não tratado foi de 19,9, no grupo infectado tratado com anti-CTLA4 foi de 19,1, no grupo infectado tratado com anti-CD28 foi de 10,7 e no grupo infectado tratado com PZQ foi de 0,9. Já a % de redução da carga parasitária no grupo de animais infectado tratado com anti-CTLA4 em relação ao grupo somente infectado foi 4%, no grupo de animais infectado tratado com anti-CD28 a % de redução da carga parasitária em relação ao grupo somente infectado foi 46,2% e no grupo de animais infectado tratado com PZQ a % de redução da carga parasitária em relação ao grupo somente infectado foi 95,47% (Fig. 40C).

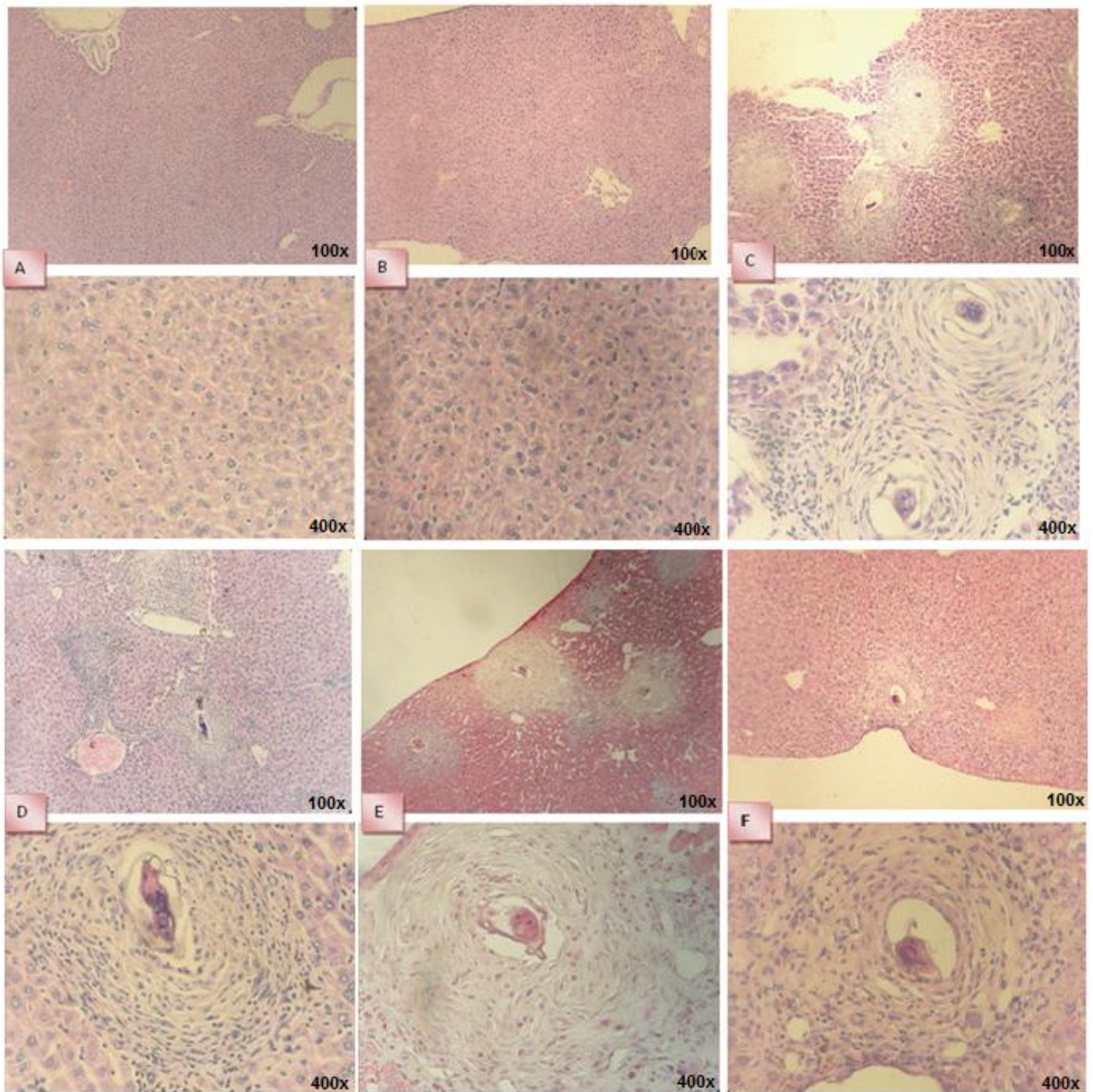




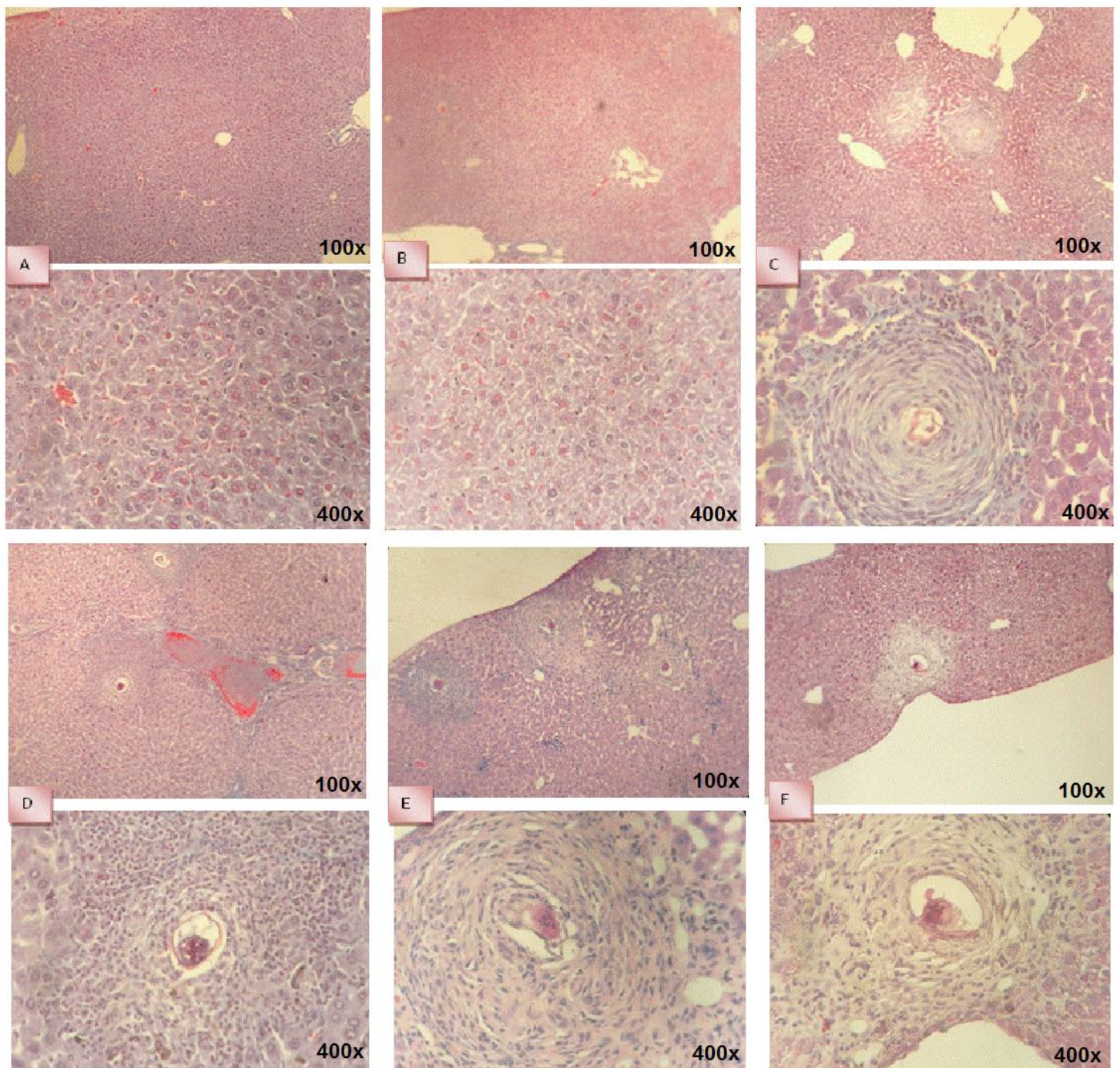
**FIGURA 40. Número de vermes recuperados no 100° dia pós infecção:** Número de vermes adultos fêmeas separados do macho recuperado (A), Número de vermes adultos machos separados da fêmea recuperados (B), e Número de vermes adultos acasalados e suas respectivas % de redução da carga parasitária (C). Os vermes foram recuperados através do sistema porta-hepático dos grupos: controle infectado não tratado, infectado/tratado com anti-CTLA4, infectado/tratado com anti-CD28 e infectado tratado com PZQ, no 100° dia pós infecção. Os dados representam n= 10 animais de 2 experimentos independentes. ND (não detectado).

#### 4.23 Histologia hepática no 64° dia pós infecção

Nas figuras a seguir, pode-se observar o granuloma hepático em animais dos grupos infectados, tratados ou não. Na Figura 41, podemos observar as lâminas coradas com H.E. (Hematoxilina/Eosina) e na figura 42 podemos observar as lâminas coradas com T.M. (Tricrômico de Masson) no 64° dia pós infecção, sendo que, as mesmas foram coradas com H.E. para a observação das características celulares e com Tricrômico de Masson para a observação de fibrose. Nos animais do grupo controle e controle tratado com Ac (IgG), o fígado apresentou-se preservado sem a presença de granuloma ou ovos (Fig. 41 A e B respectivamente); nos animais dos grupos infectados, tratados ou não (somente infectado, infectado tratado com anti-CTLA4, infectado tratado com anti-CD28 e infectado tratado com PZQ) (Fig. 41C, 41D, 41E e 41F, respectivamente), observou-se a formação de granuloma hepático periovular, com infiltrado celular misto (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos). Na Figura 42, (coloração pelo Tricrômico de Masson), pode-se observar a presença de depósito de colágeno (azul) no fígado dos animais infectados, tratados ou não (somente infectado, infectado tratado com anti-CTLA4, infectado tratado com anti-CD28 e infectado tratado com PZQ). Observou-se a presença de depósito de colágeno nas áreas granulomatosas, principalmente periovulares, que corresponde à fibrose (Fig. 42C, 42D, 42E e 42F, respectivamente). Nos grupos infectado tratado com anti-CD28 e PZQ (Fig. 42E e 42F), observou-se ainda, depósito de colágeno aparentemente mais discreto em relação aos demais grupos somente infectado e infectado tratado com anti-CTLA4 (Fig. 42C e 42D).



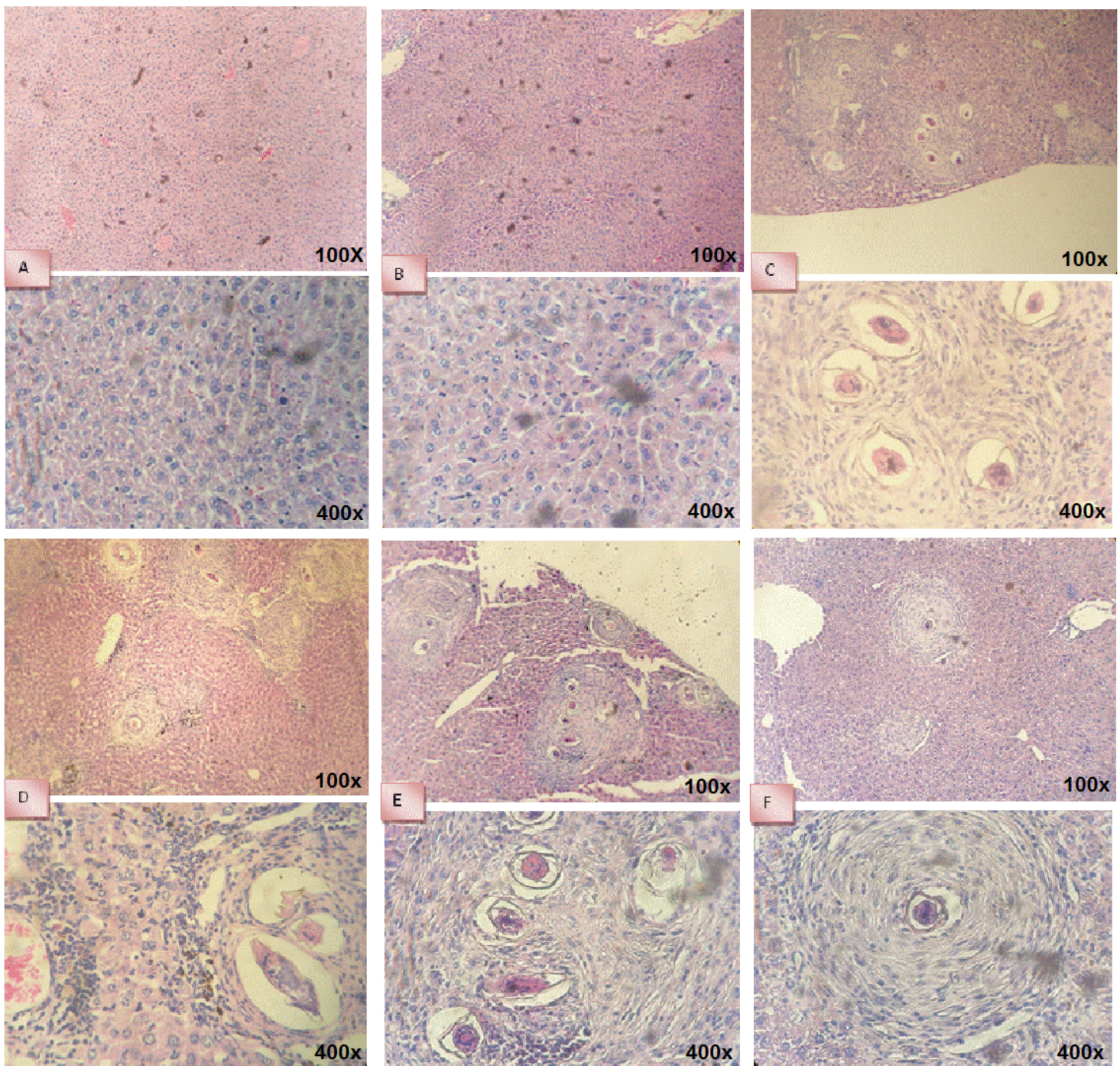
**FIGURA 41. Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* tratados ou não. Análise morfológica de cortes histológicos de fígado no 64º dia pós infecção nos animais dos grupos: controle (A), Controle + Ac (IgG) (B), infectado (C), infectado+anti-CTLA4 (D), infectado + anti-CD28 (E) e infectado+PZQ (F) Coloração: H.E. Aumento: 100 e 400x.**



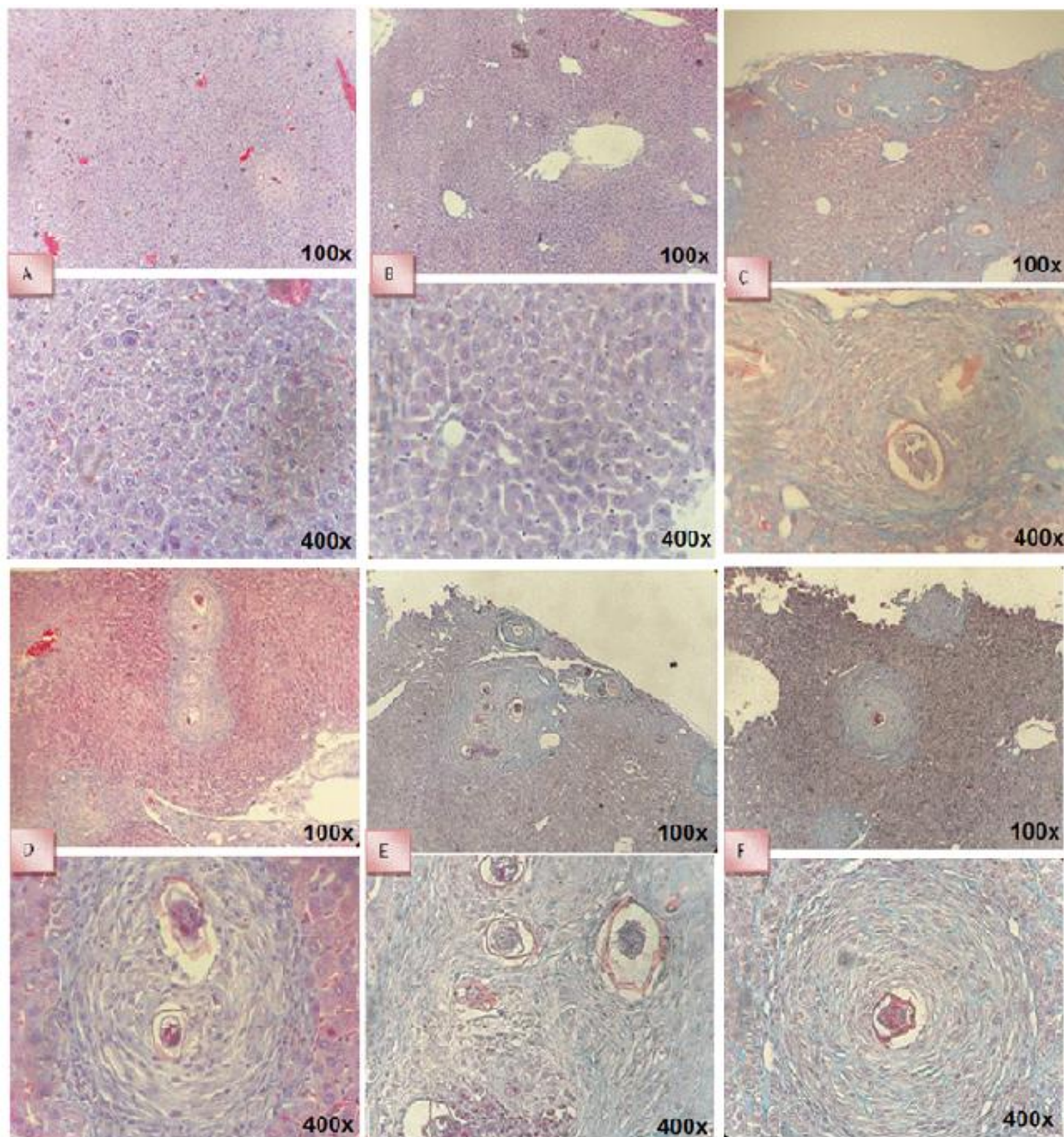
**FIGURA 42. Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* tratados ou não.** Análise morfológica de cortes histológicos de fígado no 64º dia pós infecção nos animais dos grupos: controle (A), Controle + Ac (IgG) (B), infectado (C), infectado+anti-CTLA4 (D), infectado + anti-CD28 (E) e infectado+PZQ (F) Coloração: T. Masson. Aumento: 100 e 400x.

#### 4.24 Histologia hepática no 100° dia pós infecção

Nas figuras a seguir, pode-se observar o granuloma hepático em animais dos grupos infectados, tratados ou não. Na Figura 43, podemos observar as lâminas coradas com H.E. (Hematoxilina/Eosina) e na figura 44 podemos observar as lâminas coradas com T.M. (Tricrômico de Masson) no 100° dia pós infecção, sendo que, as mesmas foram coradas com H.E. para a observação das características celulares e com Tricrômico de Masson para a observação de fibrose. Nos animais do grupo controle e controle tratado com Ac (IgG), o fígado apresentou-se preservado sem a presença de granuloma ou ovos (Fig. 43 A e B respectivamente); nos animais dos grupos infectados, tratados ou não (somente infectado, infectado tratado com anti-CTLA4, infectado tratado com anti-CD28 e infectado tratado com PZQ) (Fig. 43C, 43D, 43E e 43F, respectivamente), observou-se a formação de granuloma hepático periovular, com infiltrado celular misto (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos). Na Figura 44, (coloração pelo Tricrômico de Masson), pode-se observar a presença de depósito de colágeno (azul) no fígado dos animais infectados tratados ou não (somente infectado, infectado tratado com anti-CTLA4, infectado tratado com anti-CD28 e infectado tratado com PZQ). Observou-se a presença de depósito de colágeno nas áreas granulomatosas, principalmente periovulares, que corresponde à fibrose (Fig. 44C, 44D, 44E e 44F, respectivamente).



**FIGURA 43. Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* tratados ou não.** Análise morfológica de cortes histológicos de fígado no 100º dia pós infecção nos animais dos grupos: controle (A), Controle + Ac (IgG) (B), infectado (C), infectado+anti-CTLA4 (D), infectado + anti-CD28 (E) e infectado+PZQ (F) Coloração: H.E. Aumento: 100 e 400x.



**FIGURA 44. Fotomicrografia de cortes de fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* tratados ou não. Análise morfológica de cortes histológicos de fígado no 100º dia pós infecção nos animais dos grupos: controle (A), Controle + Ac (IgG) (B), infectado (C), infectado+anti-CTLA4 (D), infectado + anti-CD28 (E) e infectado+PZQ (F) Coloração: T. Masson. Aumento: 100 e 400x.**

#### **4.25 Avaliação do tratamento de bloqueio das moléculas coestimulatórias CTLA4 e CD28 em células de linfonodo mesentérico**

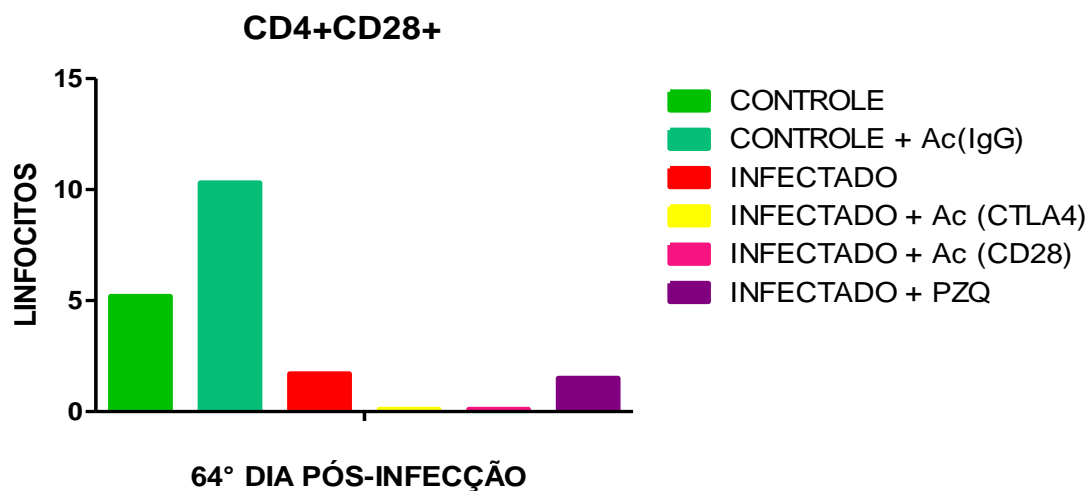
Nesta parte do trabalho, o objetivo foi avaliar a eficácia do tratamento proposto com anticorpos anti-CTLA4 e anti-CD28. Através desta técnica avaliou-se o bloqueio de moléculas coestimulatórias (CTLA4 e CD28) na superfície das células linfocitárias de linfonodos mesentéricos, com o uso de anticorpos marcados com compostos fluorescentes (FITC e/ou PE) anti-CTLA4<sup>+</sup> FITC + anti-CD4<sup>+</sup> PE e anti-CD4<sup>+</sup> PE + anti-CD28<sup>+</sup> FITC, sendo CD4<sup>+</sup> utilizado como marcador de células T. Os resultados foram apresentados de modo a visualizar e comparar o bloqueio destas moléculas, após três doses de tratamento. Nas células linfocitárias dos linfonodos mesentéricos, após 64 dias de infecção, os dados foram apresentados de acordo com a porcentagem da intensidade de fluorescência das moléculas nas células linfocitárias, esquematizados em gráficos. Foram feitas as análises intra e extra-celular, para CTLA4, pois, como este receptor extracelular é de fácil degradação a parte intracelular do mesmo se mantém intacta. Porém, vale ressaltar que o tratamento é apenas para o bloqueio de CTLA4 extracelular.

Na figura 45 podemos observar uma diminuição de forma não significativa da porcentagem da intensidade de fluorescência de moléculas CD28 nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ (sendo mais destacada a diminuição nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e CD28) quando comparados com os grupos controle, controle tratado com IgG e somente infectado, ressaltando então o grupo infectado tratado com anti-CD28. Podemos observar que, os anticorpos IgG marcados com fluorescência para o reconhecimento de receptores CD28, não tiveram maior intensidade de fluorescência, possivelmente não se ligando aos receptores CD28 devido ao anticorpo anti-CD28 de tratamento já estar ligado na molécula.

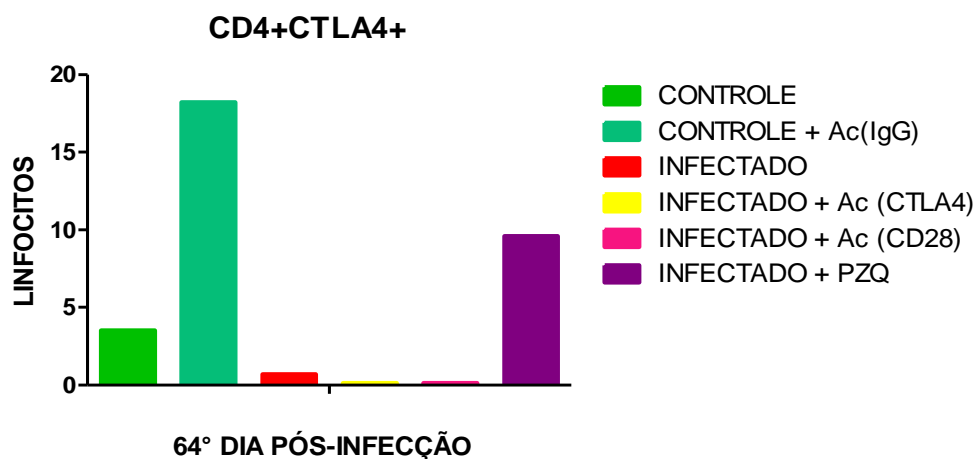
Na figura 46 podemos observar uma diminuição de forma não significativa da porcentagem da intensidade de fluorescência de moléculas CTLA4 nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28 quando comparados com os grupos controle, controle tratado com IgG, infectado tratado com PZQ e somente infectado. Ressaltando que, o grupo infectado tratado com anti-CTLA4 foi observado que, os anticorpos IgG marcados com fluorescência para o reconhecimento de receptores CTLA4 não tiveram maior intensidade de fluorescência, não se ligando aos receptores



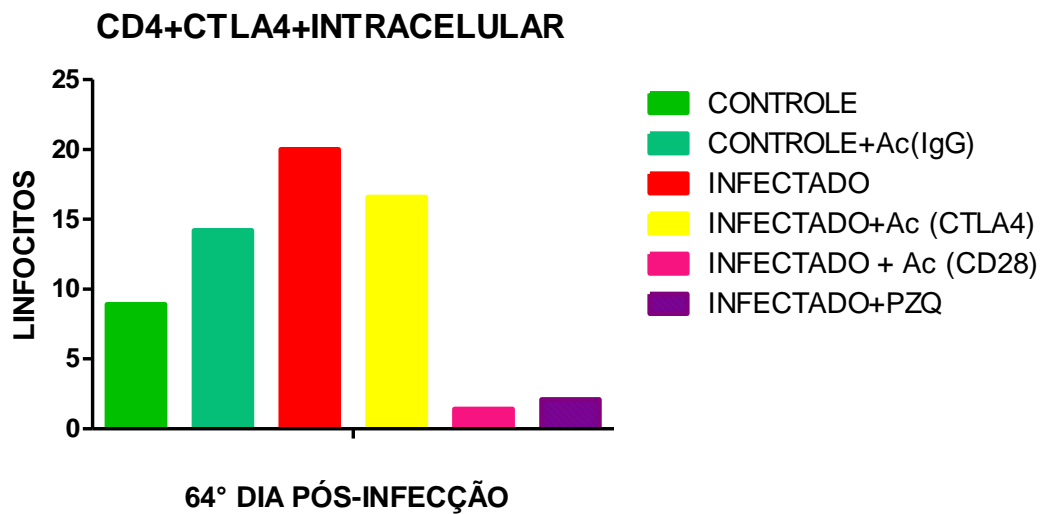
CTLA4 devido ao anticorpo anti-CTLA4 de tratamento já estar ligado na molécula. Mas, para esta confirmação foi feita a análise intracelular como mostra na figura 47. Houve aumento da porcentagem de intensidade de fluorescência de CTLA4 intracelular, sugerindo que, a resposta através da molécula coestimulatória CTLA4 foi ativada e que o anticorpo anti-CTLA4 de tratamento ligou-se no receptor CTLA4 extracelular.



**FIGURA 45. Avaliação do tratamento de bloqueio da molécula coestimulatória CD28 em células de linfonodo mesentérico:** A cor verde representa o grupo controle, a cor azul representa o grupo controle/tratado com IgG, a vermelha representa o grupo infectado não tratado, a amarela o grupo infectado e tratado com anti-CTLA4, a rosa o grupo infectado e tratado com anti-CD28 e a roxa representa o grupo infectado e tratado com Praziquantel.



**FIGURA 46. Avaliação do tratamento de bloqueio da molécula coestimulatória extracelular CTLA4 em células de linfonodo mesentérico:** A cor verde representa o grupo controle, a cor azul representa o grupo controle/tratado com IgG, a vermelha representa o grupo infectado não tratado, a amarela o grupo infectado e tratado com anti-CTLA4, a rosa o grupo infectado e tratado com anti-CD28 e a roxa representa o grupo infectado e tratado com Praziquantel.



**FIGURA 47. Avaliação do tratamento de bloqueio da molécula coestimulatória intracelular CTLA4 em células de linfonodo mesentérico:** A cor verde representa o grupo controle, a cor azul representa o grupo controle/tratado com IgG, a vermelha representa o grupo infectado não tratado, a amarela o grupo infectado e tratado com anti-CTLA4, a rosa o grupo infectado e tratado com anti-CD28 e a roxa representa o grupo infectado e tratado com Praziquantel.

## 5.DISCUSSÃO

A esquistossomose é uma infecção de relevância mundial uma vez que acomete um grande número de pessoas causando uma grande morbidade e conseqüentemente comprometimento sócio-econômico. Apesar da existência de fármacos contra os vermes adultos, faltam fármacos que possam controlar os efeitos mórbidos da infecção ou mesmo vacinas que possam controlar a disseminação deste parasito. Assim, isto faz com que, o avanço no combate e controle da infecção não seja suficiente para minimizar a transmissão e as suas conseqüências. Atualmente o investimento no desenvolvimento de vacinas contra parasitos é maior, no entanto, a complexidade dos vermes e suas interações com o hospedeiro mostram que estamos diante de um grande desafio. (DINIZ, 2009)

Os parasitos induzem fraca imunidade natural e são capazes de evadir ou resistir às respostas imunes específicas dos hospedeiros. Esta persistência no hospedeiro leva a reações imunológicas crônicas que resultam em lesões teciduais e complicações patológicas, tais complicações são mais relacionadas com a resposta imune do hospedeiro ao parasito e aos ovos do que à própria infecção. (DINIZ, 2009)

Durante a infecção aguda a resposta imune do hospedeiro contra cercárias e esquistossômulos é inicialmente mediada por células tipo Th1. Com o progresso da infecção, a resposta é substituída por células Th2, induzida em especial durante a formação de granulomas gerados pelos produtos tóxicos de ovos retidos em tecidos do hospedeiro. Estudos demonstraram que, uma vacina anti-esquistossomose eficiente requer forte indução de respostas dos tipos Th1 e Th2. (LOUKAS e MCMANUS, 2008) A estratégia de utilizar o tratamento com anticorpos monoclonais anti-CTLA4 e anti-CD28 na esquistossomose mansônica murina foi de avaliar a modulação da resposta inflamatória induzida pelo *S. mansoni* quando o bloqueio de CD28 e CTLA4 fosse realizado.

Deste modo, avaliamos as fases aguda e crônica em camundongos infectados com *S. mansoni*, que foram analisadas amostras parasitológicas de fezes, hematológicas, sorológicas, histológicas e fluidos das cavidades peritoneais e pulmonares, tendo em vista avaliar os tratamentos propostos. Sendo que, a literatura

carece de trabalhos que mostram exatamente a função das moléculas coestimulatórias CD28 e participação de CTLA4 na esquistossomose mansônica.

O processo inflamatório é um dos principais fatores que contribui para o aumento da morbidade na esquistossomose, sendo os eosinófilos uma das células de grande relevância nesse contexto inflamatório. Em relação ao número de eosinófilos no 12° (Fig. 22A), 64° (Fig. 25A) e 100° (Fig. 28A) dia pós infecção no sangue, nossos resultados demonstraram que animais tratados com mAb anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ apresentaram diminuição desses eosinófilos, entretanto apenas foi significativa no 64° dia pós infecção, quando comparados aos respectivos grupos somente infectado. Vários autores têm demonstrado que o número de eosinófilos, durante a infecção pelo *S. mansoni*, em distintos compartimentos (medula óssea, sangue, cavidade peritoneal e órgãos), apresenta número elevado na fase aguda da esquistossomose, com altos níveis persistindo mesmo na fase crônica da infecção. (COLLEY, 1972; MAHMOUD et al., 1975; LENZI; LENZI, 1990) Podemos então sugerir que, os respectivos tratamentos modularam negativamente a presença de eosinófilos na corrente sanguínea. Já nas cavidades pulmonar e peritoneal dos animais dos grupos infectados tratados foram observados valores variados de eosinófilos.

Estudos realizados com camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni* e tratados com CTLA4Ig (50µg/camundongo 07 dias após infecção), avaliaram que o bloqueio de CTLA4 com CTLA4Ig inibiu o desenvolvimento de inflamações nas vias aéreas, principalmente da resposta eosinofílica. (HARRIS, 1997; KEANE-MAYERS, 1997) Nossos resultados mostraram que, o tratamento de camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados 7 dias após infecção com anticorpos monoclonais anti-CTLA4 (100µg/kg/animal) apresentou uma diminuição na resposta celular eosinofílica na cavidade pulmonar (LBA) no 12° dia pós infecção. Porém esta diminuição não foi significativa, o que sugere uma possível inibição no desenvolvimento de inflamações nas vias aéreas, principalmente na resposta eosinofílica (Fig. 22B). No entanto, estas investigações não elucidam o mecanismo pelo qual CTLA4 inibe a inflamação nas vias aéreas nesse modelo.

O PZQ atualmente é a única droga efetiva contra todas as espécies de Schistosomas patogênicos para o homem (WHO, 2010), sua utilização em populações tem apresentado alguns problemas como redução e ausência da eficácia terapêutica em pacientes de regiões como Senegal e Egito. (GRYSEELS et al., 2001; ISMAIL et al.,

1999) Assim a busca de novas ferramentas terapêuticas é apropriada, enquanto, ainda almeja-se a produção de formas eficazes de imunização. (BOTROS, 2004) Alguns trabalhos como o de Ghandour e colaboradores (1990) mostraram baixa eficiência do PZQ dependendo do período e da dose do tratamento, quando usaram a dose de 40 mg/Kg/animal recomendada pela OMS. Os camundongos tratados com essa dose no período de 5 dias após a infecção apresentaram redução de 33,6% na carga parasitária. A dose de PZQ por nós utilizada (500mg/kg/animal) mostrou-se eficiente, apresentando 86% de redução da carga parasitária no 64° dia pós infecção (Fig. 39 C) e 95,47% de redução da carga parasitária no 100° dia pós infecção (Fig. 40 C). Essa dose de 500 mg de PZQ não é a dose recomendada para tratamento de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, apenas representa uma dose que garante um efeito positivo contra a infecção no modelo experimental. Já a % de redução da carga parasitária no grupo infectado tratado com anti-CTLA4 no 64° dia pós infecção foi de 21,3% (Fig. 39 C) e 46,2% no grupo infectado tratado com anti-CD28 no 100° dia pós infecção (Fig. 40C). Esses corroboram com Ghandour e colaboradores (1990). A ativação da resposta imune durante uma infecção pode favorecer controle do agente infeccioso. Por isso, é de grande valia observar se a modulação de parâmetros imunológicos interfere no processo infeccioso, através da análise da carga parasitária. Nossos dados mostraram que, o grupo tratado com anti-CD28 apresentou % de redução da carga parasitária somente no 100° dia pós infecção enquanto que, o grupo infectado tratado com anti-CTLA4 apresentou % de redução da carga parasitária no 64° e 100° dia pós infecção. Porém, a % de redução foi menor no 100° dia pós infecção (4%), mas mesmo sendo discreta não deixou de existir a redução da carga parasitária neste modelo de tratamento. Embora, esses resultados pareçam promissores precisam ser melhores investigados para que possamos propor um mecanismo mais específico e efetivo para a terapia durante a esquistossomose mansônica.

A fisiopatogênese da esquistossomose mansônica está diretamente relacionada aos mecanismos inflamatórios envolvidos nas lesões hepáticas e intestinais. E dentre os fatores inerentes ao desenvolvimento do processo inflamatório está a aderência de ovos aos tecidos alvos, principalmente fígado e intestino. A modulação da resposta imune induzida pelos tratamentos com anticorpos monoclonais anti-CTLA4 e anti-CD28 favorece um quadro para redirecionar o processo inflamatório, e possivelmente diminuir a morbidade da inflamação nos tecidos acometidos, durante a esquistossomose. Neste

estudo, foram observados aumento significativo no número de ovos nas fezes no grupo infectado tratado com anti-CD28 no 85º dia pós infecção (Fig. 36) e a análise feita nos fragmentos de intestinos dos animais infectados tratados com anti-CD28 no 100º dia pós infecção foi possível observar que, os ovos apresentaram-se com mortalidade de miracídio (Fig. 38). Assim, podemos sugerir que, o tratamento interferiu no processo de ovoposição e estágio dos ovos eliminados pelo parasito. Devido à quantidade e estágios dos ovos eliminados, podemos sugerir que, esse achado é relevante, pois os granulomas são gerados principalmente a partir de respostas imunes contra os antígenos solúveis dos ovos (SEAs). (GOUNNI, 1994)

Os casais adultos de *S. mansoni* vivem nas vênulas do plexo hemorroidário e no sistema porta. (HENRI et al., 2002) Nesses locais as fêmeas fazem a ovoposição de aproximadamente 300 ovos/dia e estima-se que aproximadamente 50% dos ovos eliminados pelas fêmeas cheguem à luz intestinal, ficando o restante retido nos tecidos provocando reações inflamatórias. Eventualmente alguns desses ovos são carreados para a veia porta pela corrente circulatória e para os espaços intra-hepáticos. Aqueles ovos que ficaram aderidos ao endotélio sofrem um processo de ‘migração’ por diversas camadas celulares, indo da luz do vaso até a luz intestinal, o qual dura aproximadamente 6 a 7 dias. (LENZI et al., 1987)

Lima e colaboradores (1994) relatam que, a maior susceptibilidade das fêmeas do parasito ao PZQ deve ser considerada como um fator inerente ao seu mecanismo de ação. Machos e fêmeas de *S. mansoni* apresentam diferenças em relação às propriedades e composição das membranas o que pode ser responsável pela maior atuação da droga nos vermes fêmea. (MEELHORN et al. 1981) Observando a proporção de machos e fêmeas recuperados após os diferentes tratamentos, nossos resultados mostraram que, no 64º e 100º dia pós infecção, os animais do grupo infectado com *S. mansoni* e tratados com anti-CD28, apresentaram diminuição no número de fêmeas recuperadas separadas (Fig.39 e 40 A) quando comparadas a quantidade de machos encontrados sozinhos (Fig.39 e 40 B). Juntos esses achados sugerem que, o tratamento com anti-CD28 pode ter modulado após a exposição dos antígenos dos vermes a ligação e penetração das células de defesa do hospedeiro para dentro dos vermes. Neste caso as fêmeas foram mais susceptíveis do que os machos.

As citocinas estão envolvidas, entre várias funções, e de forma diversa, na resposta imune contra helmintos. Assim, na Esquistossomose mansônica as citocinas

que estão associadas com a resposta imune Th1 como  $\text{INF-}\gamma$ , IL-12 e  $\text{TNF-}\alpha$  podem evitar a fibrose mediada por IL-13. (PEARCE; MACDONALD, 2002) Os monócitos participam da resposta imune através de aderência ao substrato, quimiotaxia, ingestão de células e partículas inertes, fagocitose bacteriana, liberação de mediadores bioativos e citocinas pró-inflamatórias como  $\text{TNF-}\alpha$  e produção de radicais livres como o ânion superóxido. Notavelmente, no início da infecção por *S. mansoni* ocorre à produção de  $\text{TNF-}\alpha$  por células mononucleares após contato com antígenos do parasito no qual reflete a uma resposta Th1. (PEARCE; MACDONALD, 2002) Nossos dados demonstraram que, no 12º dia pós infecção o grupo infectado tratado com anti-CTLA4 apresentou baixos níveis na cavidade pulmonar de  $\text{TNF-}\alpha$  quando comparado ao grupo somente infectado (Fig. 30A) sugerindo que, neste período e nesta cavidade não há mais o perfil de resposta Th1 e possível migração dos parasitos para o sistema porta-hepático.

A IL-12 é uma citocina com importante relação com o perfil Th1 e prevalece na fase inicial da infecção pelo *S. mansoni*. Esta citocina induz entre outras a síntese de  $\text{INF-}\gamma$ , além de ser um fator chave no desenvolvimento de linfócitos Th1 antígenos-específicos. A ação da IL-12 sobre a resposta Th2 parece clara podendo suprimir a produção de IL-4 de forma direta (WANG et al., 1994) ou mesma indireta, pela indução da produção de  $\text{INF-}\gamma$ . (FINKELMAN et al., 1994) Contudo, Germann e colaboradores (1995) mostraram que, a ação de IL-12 na ausência de  $\text{INF-}\gamma$  leva a um aumento da resposta Th2. O papel relevante e benéfico da IL-12, também já foi amplamente demonstrado em algumas infecções intracelulares. (GAZZINELLI, 1996) Na esquistossomose sua ação já foi descrita como sendo um importante agente coadjuvante na vacinação experimental com cercárias atenuadas. (WYNN et al., 1995b; WYNN et al., 1996; FONSECA et al., 2004) Em nosso estudo observamos que, no 12º dia pós infecção houve aumento significativo de IL-12 no plasma (Fig. 30C), nos grupos infectados tratados com anti-CD28, anti-CTLA4 e PZQ quando comparados ao grupo somente infectado sugerindo que, a grande quantidade de IL-12 no plasma pode ser fator indutor para o início da resposta Th2.

No início da ovoposição, e com a deposição de ovos nos tecidos, a produção das citocinas é predominantemente direcionada para o perfil da resposta imune Th2 e também para resposta imune regulatórias. Assim, há um aumento da produção de IL-4, IL-5 e IL-10. Na esquistossomose o papel da IL-4 já foi bastante explorado. Trabalhos mostraram que, o tratamento com anti-IL-4 leva a uma diminuição da fibrose hepática



com pouca interferência no tamanho dos granulomas neste órgão. (CHEEVER et al., 1994; ELTOUM et al., 1995) Podemos observar em nosso estudo que no 64º dia pós infecção houve diminuição significativa de IL-4 no grupo tratado com anti-CD28 quando comparado ao grupo somente infectado (Fig. 31A), sugerindo que, o tratamento com anti-CD28 pode modular negativamente IL-4, favorecendo a contribuição para a diminuição ou mesmo ser um fator importante para inibir a formação da fibrose na esquistossomose. Esses dados corroboram com outros achados desse estudo, onde podemos observar a diminuição da deposição de colágeno, resultante de uma fibrose, neste grupo no 64º dia pós infecção (Fig. 42E) assim, estes dados corroboram com os da literatura.

Já a produção de IL-5 está envolvida na proliferação e a ativação de eosinófilos, que parecem ser essenciais na destruição de esquistossômulos. (CAPRON et al., 1979) Além disso, esse tipo celular representa aproximadamente 40-50% da composição do infiltrado inflamatório que compõe o granuloma esquistossomótico. De acordo com Lenzi e colaboradores (1987), o eosinófilo é a principal célula inflamatória envolvida na migração dos ovos de *S. mansoni* pelo endotélio intestinal. No 64º dia pós infecção houve aumento significativo de IL-5 no grupo infectado tratado com anti-CTLA4 quando comparado ao grupo somente infectado (Fig. 31B). Dessa forma esses dados relacionam o aumento de eosinófilos na cavidade peritoneal no 64º dia pós infecção (Fig. 25C). Assim, sugerimos que o tratamento com anti-CTLA4 proporciona aumento significativo de IL-5 favorecendo aumento de eosinófilos, na cavidade peritoneal, responsáveis na eliminação dos ovos através da luz intestinal.

A iniciação e manutenção das respostas granulomatosas são características da infecção pelo *S. mansoni* e requer recrutamento e acúmulo de células inflamatórias ao redor dos ovos depositados, principalmente no fígado e no intestino. (GRIMAUD et al., 1987) Dessa forma, logo após o início da maturação sexual dos parasitos e posterior ovoposição, linfócitos reativos aos antígenos dos ovos (SEA) entram em proliferação no baço e linfoblastos reativos aos SEA são recrutados para o granuloma hepático. (KING et al., 2001) A formação do granuloma em torno de ovos de *S. mansoni* é o evento central no desenvolvimento da patologia associada à infecção esquistossomótica aguda e crônica, embora já tenha sido evidenciado a participação de antígenos derivados de outros estágios do parasito tanto no desenvolvimento da patologia quanto na resistência à infecção pelo *Schistosoma mansoni*, (JACOBS et. al., 1997), este fenômeno foi

demonstrado como sendo uma reação dependente principalmente de linfócitos T e foi denominado modulação do granuloma. Em nosso trabalho podemos observar que, houve a deposição dos ovos nos tecidos hepáticos e subsequente resposta granulomatosa periovular no 64° e 100° dia pós infecção nos grupos somente infectado e infectados tratados com anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ (Fig 41 e 43 C, D, E e F), porém não foram realizados testes que evidenciam as diferenças estatísticas quanto ao percentual do volume dos granulomas, densidade volumétrica e numérica, entre os grupos.

Assim, a inflamação granulomatosa resultante da infecção pelo *S. mansoni*, leva a formação de tecido fibroso que varia, consideravelmente, de indivíduo para indivíduo, sendo essas alterações observadas no modelo murino, onde se verifica que infecções com cargas parasitárias semelhantes, em diferentes linhagens de camundongos, podem provocar doenças de intensidades diferentes. (CARVALHO, 2004) Nesse trabalho os resultados demonstraram que, no fígado de camundongos da linhagem Balb/c somente infectados e infectados tratados ocorreu o depósito de colágeno resultante de fibrose no 64° e 100° dia pós infecção (Fig. 42 e 44 C, D, E e F). Porém nos animais dos grupos infectados tratados com anti-CD28 e PZQ no 64° dia pós infecção (Fig. 42E e F), aparentemente ocorreu discreta deposição de colágeno ao redor dos ovos nos granulomas periovulares, sendo que, no 100° dia pós infecção foram observadas intensa deposição de colágeno ao redor dos ovos nos granulomas periovulares de tais grupos (Fig. 43E e F). Por outro lado, a observação de depósito de colágeno por coloração (Tricrômico de Masson) não é a melhor técnica para tal análise, sendo necessária a realização de outros testes, como análise bioquímica, para determinar se o colágeno realmente está reduzido de forma significativa nesses grupos. De qualquer modo, nossos dados sugerem que os tratamentos com os mAb podem modular a resposta imune nas diferentes fases da esquistossomose murina.

As interações entre citocinas e anticorpos em resposta a presença do *S. mansoni* demonstram a importância das respostas celular e humoral na definição dos mecanismos de resistência e susceptibilidade frente à infecção. Assim, a IL-5 modula positivamente as funções efectoras das células B promovendo proliferação e diferenciação para plasmócitos secretores de imunoglobulinas (TAGUCHI et al., 1991), e o grau de resistência frente a infecção, depende em parte, da função protetora mediada pela IgE. (RIHET et al., 1992) Neste trabalho, os animais infectados tratados com anti-CD28 apresentaram diminuição nos níveis de IL-5 (Fig. 31B) contribuindo para o

favorecimento na diminuição nos níveis de IgE em resposta aos antígenos dos vermes adultos no 64º dia pós infecção (Fig. 33 C). Assim no 100º dia pós infecção os níveis de IgE nos animais do grupo infectado tratado com anti-CD28 permanecem baixos quando comparados aos do grupo somente infectado (Fig. 34C). Já nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e PZQ foram observadas aumento de IgE somente (Fig. 34C). Vale ressaltar que alguns autores sugerem que a IgE pode ter relevância na proteção de indivíduos reinfectados pelo *S. mansoni*. (CAPRON, 1999; GOMES et al., 1998, 2002)

Silva e colaboradores (2004) verificaram que a produção de anticorpos em camundongos Balb/c infectados com *S. mansoni*, ocorre com predominância do isotipo IgG1. Outros autores sugerem que os altos níveis de IgG1 estão relacionados com a fase crônica da infecção e também com a síntese de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13), as quais estimulam a produção desses anticorpos (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996). E ainda IL-4 (LA FLAMME et al., 2001) e IL-13 (SILVA et al., 2004) parecem ser fundamentais na produção de IgG1.(CHEEVER, 2000) Em relação a IgG1, nossos resultados demonstraram que, o grupo infectado tratado com anti-CD28 (Fig. 33A) apresentou baixo nível desse isotipo no 64º dia pós infecção que corroboram aos baixos níveis de IL-4 e IL-5 no 64º dia pós infecção (Fig. 31 A e B). Assim no 64º dia pós infecção foram observados baixos níveis de IgG1 nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4, anti-CD28 e PZQ (Fig. 33A) esses baixos níveis, talvez sejam explicados pelo fato de ser atribuída à fase crônica da doença, sendo que no 100º dia pós infecção podemos observar que prevalece esses baixos níveis (Fig. 34A) sugerindo que, neste período há resposta Treg de acordo com Dunne e Cooke, (2005) (Fig. 5).

O IFN-  $\gamma$  é uma citocina envolvida na resposta granulomatosa, dentre suas inúmeras funções pode-se citar que age como supressor da síntese de colágeno por fibroblastos, sendo associado com a proteção contra a fibrose na esquistossomose. (KOVACS, 1991; HENRI et al., 2002) Em modelos experimentais a administração de IFN-  $\gamma$  exógeno, durante a infecção esquistossomótica, levou a uma inibição da fibrose hepática com pequena diminuição do tamanho do granuloma. (CZAJA et al., 1989) Entretanto, quando se adicionava anticorpos anti-IFN-  $\gamma$  não foi observado efeito significativo no processo patológico hepático. (SHER et al., 1990) Enquanto que, nos pulmões a neutralização de IFN-  $\gamma$  proporcionou um aumento dos granulomas. (WYNN et al., 1994) Em nosso estudo foi possível observar que, no 64º dia pós infecção não houve a presença de IFN-  $\gamma$  na análise das amostras neste dia nos grupos infectados

tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28 (Fig. 31C). Sugerindo que possa ter ocorrido inibição da síntese de IFN- $\gamma$  nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e anti-CD28.

La Flamme e colaboradores (2001) demonstraram que, o aumento de IFN- $\gamma$  em animais infectados IL-4 -/- resultou em níveis maiores de IgG2a quando comparados a animais infectados (WT). Enquanto que, em camundongos infectados (IL-4 -/-) e (WT) quando o IFN- $\gamma$  foi neutralizado (Ac anti-IFN- $\gamma$ ), ambos os grupos apresentaram diminuição nos níveis de IgG2a. Esses autores sugeriram que a produção de IgG2a parece ser controlada por IFN- $\gamma$ . (CHEEVER, 2000) Em relação a IgG2a (Fig. 33B), o grupo infectado tratado com anti-CTLA4 apresentou baixo nível desse isotipo no 64° dia pós infecção sendo que, estes dados corroboram com a possível inibição de IFN- $\gamma$  no 64° dia pós infecção neste grupo (Fig 31C). Já no 100° dia pós infecção podemos observar um aumento nos níveis de IgG2a nos grupos infectados tratados com anti-CTLA4 e PZQ (Fig. 34B) e baixo nível no grupo infectado tratado com anti-CD28 (Fig. 34B).

A IL-10 é uma citocina produzida por uma variedade de tipos celulares (MOORE et al., 1993). Além da sua capacidade de regular a resposta Th1 e a produção de várias citocinas pró-inflamatórias. Também, já foi demonstrado que a IL-10 desenvolve um papel crítico na proteção do hospedeiro às infecções por protozoários intracelulares. (GAZZINELLI et al., 1996; HUNTER et al., 1997) Essa citocina exerce um papel essencial no processo de imunomodulação que ocorre na fase crônica da infecção esquistossomótica. (FLORES VILLANUEVA et al., 1994; SADLER et al., 2003) Recentemente foi demonstrado que, ao controlar as respostas Th1 e Th2, a IL-10 exerce uma função de citocina “estabilizadora”, evitando a polarização da resposta imune na infecção esquistossomótica. (HOFFMANN et al., 1999) VELUPILLAI & HARN, (1994) mostraram que, em camundongos, o desvio da resposta imune do tipo Th1 para Th2, ocorre por ocasião da deposição dos ovos pelo parasito e está relacionada com um aumento de IL-10. É importante mencionar que, os mecanismos envolvidos na indução das respostas Th1 e Th2 na esquistossomose ainda não estão totalmente esclarecidos. Alguns estudos na esquistossomose experimental revelam a existência de interações complexas entre tipos celulares e demonstram a importância de moléculas acessórias além das citocinas no direcionamento dessas respostas. De acordo com as análises feitas em nosso estudo no 64° e 100° dia pós infecção, os níveis de IL-10

diminuiu significativamente nos grupos tratados com anti-CTLA4 e PZQ quando comparados com seus respectivos grupos somente infectado (Fig. 32A e B), já o grupo infectado tratado com anti-CD28 observamos que no 100° dia foi detectado aumento significativo nos níveis de IL-10 (Fig. 32B). Assim esse achado sugere que, o aumento de IL-10 corrobora com sua função “estabilizadora” para o balanço Th2/Th1 na infecção esquistossomótica, minimizando os efeitos deletérios desse processo.

Baseado nos achados deste trabalho, podemos sugerir que, o tratamento com anti-CTLA4 e anti-CD28, neste contexto, apresenta hipotética alteração na carga parasitária, perfil imunológico e histopatológico uma vez que o mecanismo pelo qual este tratamento age elucidamente ainda é desconhecido.

## 6.CONCLUSÕES

1. O tratamento com os anticorpos monoclonais (mAb) anti-CTLA4 e anti-CD28 em animais infectados com *S. mansoni* promove efeitos imunomoduladores e alterações na carga parasitária neste modelo experimental;
2. O bloqueio das moléculas coestimulatórias CTLA4 e CD28 modulam negativamente o recrutamento de eosinófilos para corrente sanguínea no 12°, 64° e 100° dia pós infecção, sugerindo uma relação parcialmente dependente entre essas moléculas e o eosinófilo;
3. O efeito imunomodulatório do bloqueio de CTLA4 e CD28 parece favorecer no plasma citocinas do perfil Th1 e Th2 e a produção de anticorpos em camundongos infectados com *S. mansoni*;
4. O bloqueio da molécula coestimulatória CD28 no 64° dia pós infecção favoreceu modulação negativa de IL-4 no plasma. Sugerindo que, a diminuição desta citocina pode ter favorecido a inibição de depósito de colágeno resultante de uma fibrose;
5. O bloqueio da molécula coestimulatória CD28 no 100° dia pós infecção modulou positivamente IL-10, sugerindo que, este fenômeno contribuiu para a estabilização da resposta Th2 nesse modelo neste período.

## 7.REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; ANDREW, H. L. **Imunologia Celular e Molecular**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature.**, v. 31, p. 787-93, 1996.

AKDIS, C. A. et al. Induction and differential regulation of bee venom phospholipase A2-specific human IgE and IgG4 antibodies in vitro requires allergen-specific and nonspecific activation of T and B cells. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 99, n. 3, p. 345 - 353, 1997.

ARAÚJO, M. I; et al. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol**, v. 26, p. 1399-1403, 1996.

BARBOSA, C. S.; FAVRE, T. C.; AMARAL, R. S.; PIERI, O. S. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. **Epidemiologia e Controle da Esquistossomose Mansoni**. Rio de Janeiro: ed. Fiocruz, p.549-564, 2008.

BARBOSA, C. S.; et al. Spatial distribution of Schistosomiasis Foci on Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99(suppl. I):79-83, 2004.

BECK, L.; et al. Evaluation of tests based on the antibody response to keyhole limpet haemocyanin and soluble egg antigen to differentiate acute and chronic human Schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99(suppl.): p. 97-98, 2004.

BINA, J. C.; PRATA, A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I – Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 211-216, 2003.

BETHONY, J.; et. al. Familial resemblance in humoral immune response to defined and crude *Schistosoma mansoni* antigens in an endemic area in Brasil. **The Journal of Infectious Diseases**, v.180, p.1665-1673, 1999.

BOROS, D. L.; WARREN, K. S. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 132, p. 488-507, 1970.

BOROS, D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clin Microbiol Rev.** v. 2, p. 250-269, 1989.

BOTTAZI, M. E.; MILES, A. P.; DIEMERT, D.; HOTEZ, P. J. An ounce of prevention on a budget: a nonprofit approach to developing vaccines against neglected diseases. **Expert Rev. Vaccines**, v.5, n.2, p.189-198, 2006.

BRADFORD, M. M.; **Anal. Biochem.** v. 72, p. 248, 1976.

BRETSCHER, P.; COHN, M. A theory of self-nonsel self discrimination. **Science** n. 169 v.950, p. 1042-9, 1970.

BURTON, D. R.; WOOF, J. M. Human antibody effector function. **Advances in Immunology**, v. 51, p.1-84, 1992.

BUTTERWORTH, A. E.; et. al. Immunity in human schistosomiasis mansoni: prevention by blocking antibodies of the expression of immunity in young children. **Parasitology**, v. 94, p.281-300, 1987.

CAMPI-AZEVEDO, A. C.; et al. In vitro cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic schistosomiasis mansoni show immunomodulation of cyclin D1,2,3 in the presence of soluble egg antigens. **Microbes Infect.** Oct; v. 9, n. 12-13, p.1493-9, 2007.

CAPRON, A.; DOMBROWICZ, D.; CAPRON, M. Regulation of immune response in experimental and human schistosomiasis: the limits of an attractive paradigm. **Microbes. Infect.**, Paris, v. 1, p. 485 - 490,1999.

CAPRON, A. Schistosomiasis: forty years war on the worm. **Parasitol. Today**. v. 14, 10, p. 379-384, 1998.

CAPRON, M. Eosinophils and parasites. **Ann Parasitol Hum Comp.**, 66 Suppl, v. 1, p.41-5, 1991.

CAPRON, M., TORPIER, G. e CAPRON, A. In vitro killing of *S. mansoni* schistosomula by eosinophils from infected rats: role of cytophilic antibodies. **J Immunol**, v.123, n.5, p.2220-2230. 1979.

CHEEVER, A.W., WILLIAMS, M.E., WYNN, T.A., FINKELMAN, F.D., SEDER, R.A., COX, T.M., HIENY, S., CASPAR, P. e SHER, A. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. **J Immunol**, v.153, n.2, p.753-759. 1994.

CHEEVER, A. W.; HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol Today**, v. 21, n.9, p. 465-6, 2000.

CHIARAMONTE, M. G.; DONALDSON, D. D.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. **J Clin Invest.**, v. 85, p.104-777, 1999.

COLLEY, D. G., LEWIS, F. A. & GOODGAME, R. W. Immune Responses During Human Schistosomiasis. Iv. Induction Of Suppressor Cell Activity By Schistosome Antigen Preparations And Concanavalin A. **J. Immunol.**, p.120- 1225, 1978.



COLLEY, D.G. Schistosoma mansoni: eosinophilia and the development of lymphocyte blastogenesis in response to soluble egg antigen in inbred mice. **Exp Parasitol.**, v. 32, n.3, p. 520-6, 1972.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G.; **Anal. Biochem.**, p.151- 369, 1985.

CORRY, D. B.; et al. Differential betic mouse. J. Exp. Med. IXI:1145. effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental leishmaniasis. **J. Immunol**, 153:4142, 1994.

CZAJA, M.J., WEINER, F.R., TAKAHASHI, S., GIAMBRONE, M.A., VAN DER MEIDE, P.H., SCHELLEKENS, H., BIEMPICA, L. e ZERN, M.A. Gamma-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. **Hepatology**, v.10, n.5, p.795-800. 1989.

DINIZ, P. P. **Estudo do potencial vacinal de proteínas de *S. mansoni* utilizando salmonelas atenuadas recombinantes como veículo para apresentação de antígenos ao hospedeiro.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, USP/Instituto Butantan /IPT, São Paulo, 135f. 2009.

DOUGHTY, B. L. & PHILLIPS, S. M. Delayed Hypersensitivity Granuloma Formation Around Schistosoma Mansoni Eggs In vitro. I. Definition Of The Model. **J. Immunol.**, 128: 30, 1982.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedure in Biotechnology. 1 ed. Chichester **John Wiley and Sons Inc.**, UK., ISBN: 0-471-98255-5, 1998.

ELLNER, J. J., et al. Suppressor Splenic T Lymphocytes In Human Hepatosplenic Schistosomiasis Mansoni. **J. Immunol.**, p.125-308, 1980.

ELLNER, J. J.; et. al. Dichotomies in the reactivity to worm antigen in human schistosomiasis mansoni. **J Immunol** v.162, p.300-312, 1981.

ELTOUM, I. A., et. al. Suppressive effect of interleukin-4 neutralization differs for granulomas around *Schistosoma mansoni* eggs injected into mice compared with those around eggs laid in infected mice. **Infect Immun**, v.63, n.7, p.2532-2536, 1995.

ENGELS, D.; CHITSULO, L.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop.** v. 82, p.139-146, 2002.

FINCK, B. K.; LINSLEY, P. S.; WOFSY, D. Treatment of murine lúpus with CTLA4Ig. **Science**, v. 265, p.1225–1227, 1994.

FINKLEMAN, F. D. et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotypeselection. Rev. **Immunol.**, Palo Alto, v. 8, p. 303 - 333, 1990.

FINKELMAN, F.D., et. al. Effects of interleukin 12 on immune responses and host protection in mice infected with intestinal nematode parasites. **J Exp Med**, v.179, n.5, p.1563-1572. 1994.

FINKELMAN, F. D., T.; et. al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Rev Immunol**, v. 15, p. 505-33, 1997.

FLORES VILLANUEVA, P.O., REISER, H. e STADECKER, M.J. Regulation of T helper cell responses in experimental murine schistosomiasis by IL-10. Effect on expression of B7 and B7-2 costimulatory molecules by macrophages. **J Immunol**, v.153, n.11, p.5190-5199. 1994.

FONSECA, C. T.; BRITO, C. F.; ALVES, J. B.; OLIVEIRA, S. C. IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN-  $\gamma$  and TNF- $\alpha$  dependent pathway. **Vaccine**, v. 22, p. 503-510, 2004.

FURZE, R. C.; CULLEY, F. J.; SELKIRK, M. E. Differential roles of the co-stimulatory molecules GITR and CTLA-4 in the immune response to *Trichinella spiralis*. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 2803 – 2810, 2006.

GAZZINELLI, G., KATZ, N., ROCHA, R. S. & COLLEY, D. G. Immune Response During Human Schistosomiasis *Mansoni*. X. Production And Standardization Of An Antigen-Induced Mitogenic Activity By Peripheral Mononuclear Cells From Treated, But Not Active Cases Of Schistosomiasis. **J. Immunol.**, v. 130, p. 2891, 1983.

GAZZINELLI, R. T. Molecular and cellular basis of interleukin 12 activity in prophylaxis and therapy against infectious diseases. **Mol Med Today**, v.2, n.6, p.258-267. 1996.

GERÊNCIA DO PROGRAMA NACIONAL DE CONTROLE DA ESQUISTOSSOMOSE. Secretaria de Vigilância em saúde do Ministério da Saúde. **Distribuição da Esquistossomose**. Disponível em: <http://www.dpi.inpe.br/geoschisto/imagem/distribuicaoschisto.pdf> Acesso: 15 set. 2011.

GERMANN, T., RUDE, E. e SCHMITT, E. The influence of IL12 on the development of Th1 and Th2 cells and its adjuvant effect for humoral immune responses. **Res Immunol**, v.146, n.7-8, p.481-486. 1995.

GHANDOUR, A. M.; BANAJA, A.A.; SHALABY, I.M. Effects of praziquantel and oxfamiquine on a Saudi Arabian strain of *Schistosoma mansoni* in mice. **J. Helminthol.**, v. 64, n. 1, p. 62-4, 1990.

GOMES, Y. M. et al. Antibody isotype responses to egg antigens in human chronic Schistosomiasis *mansoni* before and after treatment. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 97, p. 111-2, 2002.

GOMES, Y. M. et al. IgE and IgG4 antibodies in subjects reinfected with *Schistosoma mansoni* in an endemic area of northeast Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 93, p. 183-4, 1998.

GOUNNI, A. S; et al. The high-affinity IgE receptor on eosinophils: from allergy to parasites or from parasites to allergy? **J Allergy Clin Immunol.** 94: 1214-1216, 1994.

GRIMAUD, J.A., BOROS, D.L., TAKIYA, C., MATHEW, R.C. e EMONARD, H. Collagen isotypes, laminin, and fibronectin in granulomas of the liver and intestines of *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Am J Trop Med Hyg.** v.37, n.2, p.335-344. 1987.

GRYSEELS, B. et al. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. **Trop. Med. Int. Health,** v. 6, p. 864-873, 2001.

HARRIS, N., R. et. al. CD80 costimulation is essential for the induction of airway eosinophilia. **J. Exp. Med.,** v. 185, p.177–182, 1997.

HARRIS, N.; CAMPBELL, C.; LEGROS, G.; RONCHESE, F. Blockade of CD28/B7 costimulation by mCTLA-4Hg1 inhibits antigen-induced lung eosinophilia but not Th2 cell development or recruitment in the lung. **Eur. J. Immunol.,** v., 27, p.155–161, 1997.

HECTOR, J.; et al. In Infection with *Schistosoma mansoni*, B Cells Are Required for T Helper Type 2 Cell Responses but Not for Granuloma Formation. **The Journal of Immunology,** v.158, p. 4832-4837, 1997.

HELMY, M.F.; MAHMOUD, S.S.; FAHMY, Z.H. *Schistosoma mansoni*: Effect of dietary zinc supplement on egg granuloma in Swiss mice treated with praziquantel. **Exp. Parasitol.,** v. 122, n. 4, p. 310-7, 2009.

HENRI, S., et. al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- $\gamma$  is associated with protection against fibrosis and TNF- $\alpha$  with aggravation of disease. **J Immunol,** v.169, n.2, p.929-936. 2002.

HERNANDEZ, H. J.; SHARPE, A. H.; STADECKER, M. J. Experimental Murine Schistosomiasis in the Absence of B7 Costimulatory Molecules: Reversal of Elicited T Cell Cytokine Profile and Partial Inhibition of Egg Granuloma Formation. **J. Immunol.,** v. 162, p.2884-2889; 1999.

HOFFMANN, K.F., CHEEVER, A.W. e WYNN, T.A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J Immunol,** v.164, n.12, p.6406-6416. 2000.

HOFFMANN, K.F., JAMES, S.L., CHEEVER, A.W. e WYNN, T.A. Studies with double cytokine-deficient mice reveal that highly polarized Th1- and Th2-type cytokine and antibody responses contribute equally to vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni*. **J Immunol,** v.163, n.2, p.927-938. 1999.

HOTEZ, P. J.; FERRIS, M. T. The antipoverty vaccines. **Vaccine**, v. 26, n. 24, p. 31-32, p.5787- 99, 2006.

HUNTER, C. A., et. al. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol**, v.158, n.7, p.3311-3316. 1997.

HUSSAIN, R.; POINDEXTER, R. W.; OTTESEN, E. A. Control of allergic reactivity in human filariasis. Predominant localization of blocking antibody to the IgG4 subclass. **J Immunol**, v. 148, n.9, p. 2731-7, 1992.

ISMAIL, M. *et al.* Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 60, p. 932-935, 1999.

JACOBS, W. et al. Adult *Schistosoma mansoni* worms positively modulate soluble egg antigen-induced inflammatory hepatic granuloma formation *in vivo*. **American Journal of Pathology.**, v. 150, n. 6, 1997.

JEFFERIS, R.; LUND, J.; GOODALL, M. Recognition sites on human IgG for Fcγ receptors - the role of glycosylation. **Immunol Lett**, v. 44, p.111-117, 1995.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Critical analysis of the estimated number of Schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 3, n. 3, p. 303 - 308, 2000.

KEANE-MYERS, A, et. al. B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways are required for the development of T helper cell 2-mediated allergic airway responses to inhaled antigens. **J. Immunol.**, v. 158, p.2042–2049, 1997.

KING, C. L.; et al. Cd29-Deficient mice generate Na Impaired Th2 Response To Schistosoma Mansoni Infection **Eur. J. Immunol.** Oct, v.26, n.55, p. 1010-2448, 1996.

KING, C. L. Initiation and regulation of disease in schistosomiasis. *In*: Mahmoud AAF (ed) Schistosomiasis. **Imperial College Press**, London, p. 213-64, 2001.

KOVACS, E.J. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. **Immunol Today**, v.12, n.1, p.17-23. 1991.

LA FLAMME, A. C.; et al. Schistosomiasis protects against multiple sclerosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 99(suppl.), p. 59-62, 2004.

LA FLAMME, A.C.; PATTON, E.; PEARCE, E. Role of gamma interferon in the pathogenesis of severe schistosomiasis in interleukin-4 deficient mice. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 12, p. 7445-7452, 2001.

LENSCHOW, D. J.; et al.. Differential effects of antiCB7-I and antiCB7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese dial, 1995.

- LENZI, H.L., LENZI, J.A. e SOBRAL, A.C. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. **Braz J Med Biol Res**, v.20, n.3-4, p.433-435. 1987.
- LENZI, H. L.; LENZI, J. A. Comparative distribution of eosinophils in bone marrow, blood and peritoneal cavity in murine schistosomiasis. **Braz J Med Biol Res.**, v. 23, n. 10, p. 989-94, 1990.
- LIMA, S. F.; VIEIRA, L. Q.; HARDER, A; KUSEL, J. R. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitol**; v. 109, p. 57 – 64, 1994.
- MANDELBROT, D. A.; MCADAM, A. J.; Sharpe, A. H. B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4). **J Exp Med**, n. 189, v.2, p. 435-40, 1999.
- MAHMOUD, A. A.; WARREN, K.S.; PETERS, P.A. A role for the eosinophil in acquired resistance to *Schistosoma mansoni* infection as determined by antieosinophil serum. **J Exp Med.**, v. 142, n. 4, p. 805-13, 1975.
- MELHORN, H.; et al.. In vivo and in vitro experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. **Arzneimittelforschung**; v. 31, p. 544 – 554, 1981.
- MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for Schistosomiasis. **Clin. Microb. Rev.**, v.21, n.1, p.225-242, 2008.
- METZLER, B.; BURKHART, C.; WRAITH, D. C. Phenotypic analysis of CTLA-4 and CD28 expression during transient peptide-induced T cell activation *in vivo*. **International Immunology**, v. 11, n. 5, p. 667–675, 1999.
- MONTENEGRO, S. M., P. et.al. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis**, v. 179, n. 6, p. 1502-14, 1999.
- MOORE, K.W. et. al. Interleukin-10. **Annu Rev Immunol**, v.11, p.165-190. 1993.
- MUKHERJEE, S.; AHMED, A.; NANDI, D. CTLA4-CD80/CD86 interactions on primary mouse CD4<sup>+</sup>T cells integrate signal-strength information to modulate activation with Concanavalin A. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 78, 2005.
- PADRID, P. A. CTLA4Ig Inhibits Airway Eosinophilia and Hyperresponsiveness by Regulating the Development of Th1/Th2 Subsets in a Murine Model of Asthma. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, vol. 18, p. 453–462, 1998.
- PELLEGRINO, J.; FARIA, J. The Oogram Method for the Screening of Drugs in Schistosomiasis Mansoni. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v.14, p. 363- 369, 1965.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis. IV. Oogram studies with nicarbazin, an egg-suppressive agent. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v.11, p. 215-221, 1965.

PEARCE, E., J.; MACDONALD, A., S. The immunobiology of Schistosomiasis. **Nature reviews – Immunology**, v.2, p. 499 – 509, 2002.

RABELLO, A. Acute human schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n.90, p. 277-280, 1995.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro, editora: Guanabara Koogan, 2001.

RIHET, P.; et al. Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. **Eur. J. Immunol.**, v. 22, n. 8, p. 2063-70, 1992.

ROCKLIN, R. E.; TRACY, J. W. & EL KHOLY, A. Activation Of Antigen-Specific Suppressor Cells In Human Schistosomiasis Mansoni By Fractions Soluble Egg Antigens Nonadherent To Con A Sepharose. **J. Immunol.**, p.127- 2314, 1981.

RUMBLEY, C. A. et al. The schistosome granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production. **J. Immunol.**, v. 161, p. 4129-4137, 1998.

SADLER, C. H.; RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J.; WILSON, R. A. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. **Eur J Immunol**, v.33, n.4, p.880-888. 2003.

SHER, A.; et. al. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.1, p.61-65. 1990.

SILVA, J. R. M.; NEVES, R. H.; GOMES, D. C. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar/Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. Rio de Janeiro: **Fiocruz**, p.45-73, 2008.

SILVA, L. M. et al. Comparison of immune responses of *Schistosoma mansoni*-infected mice with distinct chronic forms of the disease. **Acta Trop.**, v. 91, n. 2, p. 189-96, 2004.

SMYTHIES, L. E; COUSLON, P. S.; WILSON, A. Monoclonal antibody to IFN- $\gamma$  modifies pulmonary inflammatory responses and abrogates immunity to *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with attenuated cercariae. **J Immunol**, v. 149, p.3654-3658, 1992.

SOARES, S.; et al. Participação das plaquetas no processo de fibrose dos pacientes com esquistossomose mansônica. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.3, p.321-325, 2007.

SONDAK, V.; et al. Ipilimumab (anti-CTLA-4). **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p.411-412, 2011.

TAGUCHI, T.; et al. Novel function for intestinal intraepithelial lymphocytes. Murine CD3+, gamma/delta TCR+ T cells produce IFN-gamma and IL-5. **J. Immunol.**, v. 147, n. 11, p. 3736-44, 1991.

VELLUPILAI & HARN. Oligosaccharide-Specific Induction Ofinterleukin 10 Production By B220+Cels From Schistosome-Infected Mice: A Mechanism For Regulationof Cd4+T-Cell Subsets. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v.91, p.18, 1994.

ZOUAIN, C. S.; et al. *Schistosoma mansoni* PIII antigen modulates in vitro granuloma formation by regulating CD28, CTLA-4, and CD86 expression in humans. **Immunology Letters**, v. 91, p. 113–118, 2004.

WALUNAS, T. L.; et al. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. **Immunity** n.1, v.5, p. 405-13, 1994.

WANG, Z. E., et. al. Interferon gamma-independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to *Leishmania major*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.26, p.12932-12936. 1994.

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

WORLD HEATH ORGANIZATION. TDR - Report on Schistosomiasis. WHO 2010, site: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>

WYNN, T. A., CHEEVER, A.W., JANKOVIC, D., POINDEXTER, R.W., CASPAR, P., LEWIS, F.A. e SHER, A. An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. **Nature**, v.376, n.6541, p.594-596,1995a.

WYNN, T. A., ELTOUM, I., OSWALD, I.P., CHEEVER, A.W. e SHER, A. Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL- 12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. **J Exp Med**, v.179, n.5, p.1551-1561, 1994.

WYNN, T. A., JANKOVIC, D., HIENY, S., CHEEVER, A.W. e SHER, A. IL-12 enhances vaccine-induced immunity to *Schistosoma mansoni* in mice and decreases 127 T helper 2 cytokine expression, IgE production, and tissue eosinophilia. **J Immunol**, v.154, n.9, p.4701-4709, 1995b.

## ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
Comissão de Ética em Experimentação Animal  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8109 / 3351.8110  
Fax: (016) 3361.3176  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[propp@power.ufscar.br](mailto:propp@power.ufscar.br) - [www.propp.ufscar.br](http://www.propp.ufscar.br)

---

Protocolo CEEA nº 066/2009

Aprovo *ad referendum* da Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de São Carlos – CEEA/UFSCar, o projeto de pesquisa “**Avaliação do tratamento com anticorpos monoclonais: anti-CTLA4 (9h10) e anti-CD28 (PV-1) na esquistossomose mansônica murina**”, elaborado por Lais Cristina de Souza e Fernanda de Freitas Anibal.

São Carlos, 28 de janeiro de 2010.

Prof. Dra. Keico Okino Nonaka

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal