



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

MARIA CLAUDIA NORONHA DUTRA DE MENEZES

**EFEITO IMUNOPATOLÓGICO DA INFECÇÃO ASSOCIADA
COM *SCHISTOSOMA MANSONI* E *PARACOCCIDIOIDES*
BRASILIENSIS NO HOSPEDEIRO**

Londrina
2012

MARIA CLAUDIA NORONHA DUTRA DE MENEZES

**EFEITO IMUNOPATOLÓGICO DA INFECÇÃO ASSOCIADA
COM *SCHISTOSOMA MANSONI* E *PARACOCCIDIOIDES*
BRASILIENSIS NO HOSPEDEIRO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para a obtenção do título de doutora.

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

M543e Menezes, Maria Claudia Noronha Dutra de.
Efeito imunopatológico da infecção associada com *Schistosoma mansoni* e
Paracoccidioides brasiliensis no hospedeiro. – Londrina, 2012.
85 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Patologia Experimental, 2012.

Inclui bibliografia.

1. *Schistosoma mansoni* – Teses. 2. *Paracoccidioides brasiliensis* – Teses. 3. Resposta
imune – Teses. 4. Imunoglobulinas – Teses. 5. Citocinas – Teses. I. Itano, Eiko
Nakagawa. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

MARIA CLAUDIA NORONHA DUTRA DE MENEZES

**EFEITO IMUNOPATOLÓGICO DA INFECÇÃO ASSOCIADA COM
SCHISTOSOMA MANSONI E *PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS* NO
HOSPEDEIRO**

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Audrey de Souza Marquez
Universidade Norte do Parana – UNOPAR

Profa. Dra. Maria Angélica Watanabe
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Marcos Andre Vannier dos Santos
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Prof. Dr. Mario Augusto Ono
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de outubro 2012.

Quando a gente acha que tem todas as respostas vêm
à vida e muda todas as perguntas.

Luis Fernando Verissimo

Dedicatória

Ao Jose Roberto e nossos filhos, Maria Fernanda e Beto.

À minha mãe “in memoriam” pelo exemplo de vida.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, minha orientadora e amiga, pelos ensinamentos científicos, pela compreensão, paciência e generosidade.

Ao Prof. Francisco de Abreu Oliveira, pela amizade, estímulo e contribuição em todas as etapas deste trabalho.

A Mari Kaminami e Nilson de Jesus Carlos pela amizade e pela colaboração inestimável.

A Paula Álvares Silva, pela sua valorosa contribuição na realização deste trabalho.

Ao Pedro Sebastião Raimundo Dionizio Filho pela amizade, incentivo, e disposição de ajudar e resolver problemas.

Aos amigos da disciplina de Parasitologia, Profa. Dra Ivete Conchon. Profa. Dra Regina Bregano, Prof Dr. Wander Pavanelli, Profa. Dra Idessania, pelo apoio e carinho.

Ao Prof. Dr. Rubens Cechine Coordenador do curso de Pós-Graduação em Patologia Experimental pela sua compreensão.

Profa. Marina Kishima, Profa. Dra. Tania Mazzuco e ao medico patologista Dr. Jefferson Crespigio pela colaboração nos diagnósticos histopatológicos.

A Profa. Simone Mello pela a realização dos exames em Bandeirantes

Aos meus colegas de pós-graduação em especial Jair e Luiz Custodio

A Profa Dra Flavia Alessandra Guanier pelos ensinamentos em estatística.

Ao Adernaldo e Vera técnicos do laboratório de parasitologia.

Aos colegas do Departamento de Ciências Patológicas pelo convívio e amizade.

Aos colegas do laboratório de Imunologia pela convivência e ajuda.

A Sueli pelo carinho e suporte dado durante todo esse período.

DUTRA-MENEZES, Maria Claudia Noronha. **Efeito imunológico da infecção associada com *Schistosoma Mansoni* *Paracoccidioides Brasiliensis* no hospedeiro.** 2012. 85 f. Tese (Doutorado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A esquistossomose mansoni e a paracoccidioidomicose (PCM) são doenças infecciosas crônicas de grande importância para a saúde pública, com distribuição sobreposta em várias regiões do Brasil. Seus agentes etiológicos, o helminto *Schistosoma mansoni* (Sm), e o fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), são causadores de doenças granulomatosas intimamente relacionadas à resposta imune aos antígenos dos parasitos, sendo mediadas principalmente pela ativação de células Th2 e Th1, respectivamente. Dados da literatura tem demonstrado a importância da co-infecção por Sm na resposta imune e nas manifestações clínicas de outras doenças infecciosas. Entretanto faltam dados sobre a associação entre o Sm e o Pb tanto em seres humanos como em modelo experimental em animais, assim como o impacto imunopatológico causado no hospedeiro. Com esse intuito, foram inicialmente detectados casos de esquistossomose apresentando reatividade sorológica para Pb, avaliando-se a seguir a resposta imune nesse grupo. O efeito imunopatológico também foi investigado utilizando modelo experimental em camundongos BALBc co-infectados com Sm e Pb. Das 100 amostras de soros de pacientes, moradores em zona endêmica e portadores de esquistossomose mansoni, 15 apresentaram sorologia positiva para gp43, uma glicoproteína considerada específica de Pb. Contudo, nenhum paciente apresentou sintomas clínicos, portanto foram classificados como portadores de PCM-infecção. Com a finalidade de avaliar se a resposta imune seria modulada nos indivíduos co-infectados, análise sorológica de IgE e IgG anti- antígeno solúvel do ovo (SEA) e IgE anti-antígeno de vermes adultos (SWAP) e os níveis séricos das citocinas Th1(IFN- γ , IL-12), Th2 (IL-4, IL-13), TH17(IL-17) e T regulatória IL-10, foram determinados por ensaio imunoenzimático (ELISA), nos grupos de pacientes co-infectados (Sm/Pb) e nos grupos controles, de indivíduos saudáveis (NHS) e somente com esquistossomose (Sm). Para avaliar o impacto imunopatológico da co-infecção no modelo experimental, foram utilizados grupos de camundongos: infectados concomitantemente com *S. mansoni* e *P. brasiliensis* durante 70 dias (Sm70Pb70), com infecção patente de Sm e após 42 dias infectados com Pb (Sm70Pb28), e como controles animais com Sm por 70 dias (Sm70) com Pb por 28 dias (Pb28) e Pb por 70 dias (Pb70). Em todos os animais, foram efetuadas análises histopatológicas do fígado, avaliação das citocinas hepáticas (IL-4, IL-13, IL-10 e IFN- γ) e das citocinas (IL-4 e IFN- γ) do soro. Os resultados de co-infecção humana demonstraram níveis significativamente mais elevados de IgE e IgG antígenos (SEA e SWAP) anti *S. mansoni* e níveis de IL-13 em ambos os grupos de pacientes em comparação ao controle normal, mas não dentro dos grupos infectados (Sm e Sm/Pb). Níveis significativamente mais elevados de IL-4 foram observados no grupo de Sm em comparação com os outros grupos, e não houve diferença nos níveis de IL-12 e IL-17 entre os grupos. Os níveis de IFN- γ e IL-10 foram significativamente mais elevados no grupo considerado co-infectado (SmPb) em relação aos controles Sm e SHN. Os resultados de infecção experimental de camundongos demonstraram diminuição significativa no número de granulomas hepáticos de *S. mansoni* em grupo co-infectado. Com relação às citocinas hepáticas, o grupo Sm70Pb28 apresentou aumento significativo de IL- 4 e IL- 10, e ambos os grupos de animais co-infectados (Sm70Pb70 e Sm70 Pb28) apresentaram níveis elevados de IL-13. Os níveis de IFN- γ encontrados no soro, foi maior nos animais co-infectados. Em

relação, ao efeito do *S. mansoni* sobre o curso da infecção do *P. brasiliensis*, o grupo com infecção concomitante (Sm70Pb70) apresentou aumento significativo no número de granulomas do fígado, e diminuição significativa dos níveis das citocinas hepáticas IL-4, IL-10 e IFN- γ e, nível elevado de IL-4 sérica pode ser observado em relação aos animais do grupo Pb70. Nesse mesmo grupo foi detectada a presença de alguns granulomas com ausência parcial de contorno entre os dois agentes. No grupo dos co-infectados também foi verificada a presença de *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em outros órgãos. Este estudo mostrou pela primeira vez casos de seres humanos com esquistossomose apresentando reação sorológica positiva com *P. brasiliensis*, possivelmente co-infectados e, modulação de citocinas. No modelo murino, os dados mostraram que o impacto da infecção associada entre *S. mansoni* e *P. brasiliensis* provoca a modulação de citocinas e do número de granulomas do fígado, sugerindo também agravamento da doença. As discordâncias encontradas entre os níveis de citocinas nos grupos co-infectados merecem maiores esclarecimentos, com estudos adicionais feitos em diferentes períodos de inoculação e dosagens de novas citocinas e quimiocinas.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. *Paracoccidiodes brasiliensis*. Co-infecção. Paracoccidiodomicose-infecção. IgG. IgE. Citocinas.

DUTRA-MENEZES, Maria Claudia Noronha. **Immunopathology effect associated with *Schistosoma Mansoni* And *Paracoccidioides Brasiliensis* co-infection in host.** 2012. 85 p. Thesis (Doctorate in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina,. 2012.

ABSTRACT

The schistosomiasis and the paracoccidioidomycosis (PCM) are chronic infectious diseases of importance in Brazilian public health, which overlap in several regions of the country. Their etiologic agents namely, the helminths *Schistosoma mansoni* (Sm) and the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), are the agents of granulomatous diseases closely related to the immune response to the antigens of the parasite, and mediated mainly by activation of the cells Th2 and Th1, respectively. Published data has shown the importance of the co-infection by Sm in the immune and clinical response to other parasite of infectious diseases. There is however a lack of data resulting from the association between Sm and Pb in humans and in experimental models and in the immune-pathological impact to the host. With this aim we detect initially cases of schistosomiasis presenting serum reactivity for Pb followed by an evaluation of the immune response of this group. The immunopathological manifestations were studied in a model using BALBc mice co-infected with Sm and Pb. From a hundred samples obtained from dwellers in endemic regions, 15 had positive serum response to the glycoprotein gp43, specific to Pb. However in the absence of clinical symptoms they were diagnosed as carriers of PCM-infection. To evaluate how the immune response was modulated in the co-infected (Sm/Pb) individuals, seric levels of IgE and IgG (soluble anti-eggs soluble antigens (SEA), and the levels of (cytokines) Th1 (IFN- γ , IL-12), Th2 (IL-4, IL-13), Th17 (IL-17) and the Treg IL-10 were measured by ELISA, in control group of health individuals (NHS) and with schistosomiasis only (Sm). In order to evaluate the impact immunopathological of co-infection in animals models we used groups of mice with simultaneous infection of *S. mansoni* and *P. brasiliensis* after 70 days (Sm70Pb70), with confirmed infections of Sm after 42 days then infected with Pb for 28 days (Sm70Pb28), and as controls, animals with Sm for 70 days (Sm70) and with Pb for 28 days (Pb28) and Pb for 70 days (Pb70). All animals were subjected to histopathological examination of the liver and measurement of hepatic (IL-4, IL-13, IL-10 and IFN- γ) and serum cytokines (IL-4 and IFN- γ). The results of human co-infection has shown significant increase in levels of IgE and IgG against *S. mansoni* antigens (SEA e SWAP) and in the levels of IL-13 in relation to the controls ($p < 0.05$), but not in infected animals (Sm and Sm/Pb). Increased levels of IL-4 were detected in the Sm group when compared with the others groups ($p < 0.05$), there was no change in the levels of IL-12 and IL-17 between the remaining groups ($p > 0.05$). The results in the infections in mice showed a significant increase in the numbers of hepatic granuloma in *S. mansoni* co-infected groups. In respect to the hepatic cytokines the group Sm70Pb28 has shown a significant increase in IL-4 and IL-10, and both groups of animals co-infected (Sm70Pb70 and Sm70 Pb28) showed increased levels of IL-13. The levels of IFN- γ in sera were greater in co-infected animals. In respect to the effect of *S. mansoni* in the evolution of infection by *P. brasiliensis*, the group with simultaneous infection (Sm70Pb70) showed a significant increase in the number of liver fungal granuloma, and decrease in the levels of liver cytokines IL-4, IL-10 and IFN γ and an increased levels of serum IL-4 could be noted for the animals of group Pb70. In the same group was observed granuloma with partial absence of contour between the two agents. In the group of co-infected it was also observed the presence of *S. mansoni*. This study showed for the first time cases of humans with schistosomiasis

presenting positive serum reactions to *P. brasiliensis*, probably co-infected and modulation of cytokines response. In mice model the data showed that the infection with both *S. mansoni* and *P. brasiliensis*, causes a modulation of cytokines and in the number of granuloma in the liver, suggesting a worsening of the disease. The contradictions found in the levels of cytokines in the co-infected groups deserve further studies with changes in inoculation time, and expanding the measurements of new cytokines and chemokines.

Keywords: Schistosomiasis mansoni. Mycosis. Co-infection. Paracoccidioidomycosis-infection. IgG. IgE. Cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígenos.
BCG	Bacillus Calmett-Guerin.
CD	Grupo de diferenciação, nomenclatura usada para diversas moléculas de superfície celular.
CD4	Marcador de superfície celular da sub-população de linfócito T auxiliar.
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay (ensaio imunoenzimático).
Gp43	Glicoproteína de 43kDa de <i>Paracoccidoides brasilienses</i> .
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1.
IFN- γ	Interferon - gama.
IgG	Imunoglobulina G.
IgGA2	Subclasse IgG.
IgE	Imunoglobulina E.
IgA	Imunoglobulina A.
IgM	Imunoglobulina M.
IL-4	Interleucina 4.
IL-5	Interleucina 5.
IL-10	Interleucina 10.
IL-12	Interleucina 12.
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico.
SEA	Antígeno solúvel do ovo de <i>Schistosoma mansoni</i> .
SWAP	Antígeno solúvel do verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i> .
Th	Linfócitos T auxiliares.
Th0	T helper 0 (Linfócito T auxiliary 0).
Th1	T helper 1 (Linfócitos T auxiliares 1).
Th2	T helper 2 (Linfócitos T auxiliares 2).
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha (Fator de necrose tumoral alfa).
TGF-beta	Transforming growth beta 1 (Fator de transformação do crescimento beta).
T regs	Células T regulatórias.
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	ASPECTOS GERAIS	13
1.2	RESPOSTA IMUNE NA ESQUISTOSSOMOSE	15
1.3	IMUNOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE	16
1.3.1	Esquistossomose aguda	17
1.3.2	Esquistossomose crônica	19
1.4	EFEITOS DAS CO-INFEÇÕES ASSOCIADAS À ESQUITOSSOMOSE MANSONI	20
1.4.1	Influência da esquistossomose em doenças alérgicas e auto-imunes	20
1.4.2	Co-infecção com protozoários	21
1.4.3	Co-infecção de <i>S. mansoni</i> e outros helmintos	23
1.4.4	Co-infecção com vírus	24
1.5	ASPECTOS GERAIS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE	24
1.6	RESPOSTA IMUNE	26
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVOS GERAIS	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	REFERÊNCIAS	29
4	MANUSCRITO 1	43
5	MANUSCRITO 2	63
6	CONCLUSÃO	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

Conhecida desde a antiguidade, a esquistossomose, dentre as doenças parasitárias, assume o segundo lugar em termos de importância socioeconômica e de saúde pública, em áreas tropicais e subtropicais. É considerada uma das doenças endêmicas mais difundidas no mundo (BINA & PRATA, 2003). De acordo com as estimativas, a doença causa uma perda anual de 1,7 a 4,5 milhões de anos de vida ajustados (DALYs) (STEINMANN et al. 2006). Está presente em mais de 74 países da América do Sul, África, Caribe e Ásia, com 230 milhões de pessoas infectadas, das quais 120 milhões são assintomáticos e 20 milhões possuem a forma grave da doença. Estima-se que 700 milhões vivam em áreas de risco de infecção, principalmente, nas áreas rurais e nas periferias de cidades (KATZ; PEIXOTO, 2000;WHO, 2012).

No Brasil, a esquistossomose é uma das principais endemias parasitárias, sua prevalência é maior que a do HIV/AIDS. A transmissão ocorre em 19 estados. Nas áreas endêmicas, 25 milhões de habitantes vivem em áreas de risco, onde existem de 4 a 6 milhões de pessoas infectadas, sendo o país mais afetado das Américas (LAMBERTUCCI, 2010).

No estado do Paraná, inquéritos epidemiológicos feitos através da pesquisa de ovos de *Schistosoma mansoni* nas fezes verificaram que, dos 399 municípios do estado, 54 são considerados endêmicos (MENAMI, 2005). Os municípios variam de baixa a alta prevalência, Londrina com 3,5% DUTRA-MENEZES et al. (1999) e Bandeirantes com 22% (MELO & DUTRA-MENEZES, 2001).

O agente etiológico da esquistossomose é um trematódeo do gênero *Schistosoma*. Dentre as várias espécies que parasitam os seres humanos, somente *S. mansoni* é autóctone e responsável pela doença no Brasil. Sua transmissão é dependente das presenças do homem principal hospedeiro definitivo, que elimina ovos e dos caramujos de água doce, do gênero *Biomphalaria* como hospedeiros intermediários. Os ovos eliminados, pelas fezes ao atingirem a água, sofrem a influência da baixa osmolaridade do meio, de estímulos luminosos e da temperatura o que provoca ativação do miracídio, ruptura na casca, permitindo assim a eclosão do miracídios. Os miracídios são larvas ciliadas com intensa atividade natatória, que invadem os moluscos hospedeiros. Nos tecidos, do molusco se transformam em esporocistos e

se multiplicam em várias gerações de esporocistos filhos que produzem durante algum tempo suas cercárias. Após 30 a 35 dias, dependendo da temperatura, as cercárias são eliminadas e constituem a forma infectante para o homem e outros vertebrados (WAREN; MINGOS, 1970; PEARCE; MACDONALD, 2002; SCHRAMM; HASS, 2010).

A infecção esquistossomótica tem início com a penetração das cercárias na pele ou mucosa do hospedeiro, (mamíferos susceptíveis). No contato com a pele perdem a cauda e se transformam em esquistossômulos. Nessa forma, os parasitos migram pelos tecidos subcutâneos, atingem os sistemas sanguíneos e/ou linfáticos onde são levados passivamente para o coração, de onde são bombeados para os pulmões, passando pelos capilares pulmonares para retornarem ao coração e serem levados pela circulação sistêmica até o sistema porta intra-hepático, onde se desenvolvem e amadurecem sexualmente. Os vermes adultos se acasalam e migram contra a corrente sanguínea até as veias mesentéricas e hemorroidárias, seu habitat preferencial, onde a fêmea inicia a sua oviposição, eliminando aproximadamente 300 ovos por dia. A maturação e a fertilidade das fêmeas exigem vermes adultos machos e um sistema imune adaptativo intacto (HARISON; DOENHOFF, 1983; HERNANDES et al., 2004). Aproximadamente, metade dos ovos depositados atravessa o endotélio vascular na zona de deposição e o epitélio da mucosa para alcançar o lúmen do intestino e serem levados pelas fezes, para a manutenção do ciclo. Não está claro, qual o mecanismo pelo qual os ovos migram pelos tecidos. Embora, pareça ter um componente imunológico, pois em camundongos imunocomprometidos a excreção de ovos é mínima, o mesmo é visto em pacientes infectados com *S. mansoni* e HIV onde há uma correlação entre a diminuição da excreção de ovos e a diminuição de linfócitos CD4+ (DOENHOFF, 1997, KARANJA et al., 1997, PEARCE; MACDONALD, 2002). O restante dos ovos fica preso nos capilares da mucosa do intestino, sobrevivendo à morte dos miracídios. Alguns aí permanecem, ao passo que outros são levados pela circulação porta- hepática alcançando os espaços porta, onde ficam retidos nos sinusóides hepáticos e induzem a formação de granulomas. Esses são formados a partir a liberação de antígenos solúveis pelos ovos. Os quais induzem a mobilização de macrófagos, eosinófilos linfócitos e plasmócitos, havendo nesse processo a mediação de células CD4+ e como consequência reação inflamatória crônica em torno do ovo, seguida da produção de colágeno, podendo evoluir para um quadro de fibrose (WILSON et al., 2007; WYNN; CHEEVER, 1995).

1.2 RESPOSTA IMUNE NA ESQUISTOSSOMOSE

A resposta imune contra o parasito é mediada pelos linfócitos TCD4+. No curso da infecção esquistossomótica em murinos, durante as primeiras 3 a 5 semanas, quando o hospedeiro é exposto à migração do esquistossômulo e do verme imaturo, a resposta dominante é a Th1 com produção de IFN- γ e de outras citocinas pró-inflamatórias IL-2, IL-6, IL-1 e TNF- α (LAMBERTUCCI, 1993; RABELO, 1995; WYNN et al., 1998; MONTENEGRO, 1999; JESUS, et al., 2002). Entretanto, recentemente tenha sido reportado que vermes adultos de *Schistosoma* elicitam uma resposta Th2, em animais experimentais durante o período pré-patente com produção de IgE e produção de IL-4 por basófilos em resposta a antígenos de vermes adultos (OLIVEIRA-FRAGA et al., 2010). Com o início da oviposição que ocorre nas 5 e 6 semanas, a resposta se altera para uma forte resposta do tipo Th2 caracterizada pela alta produção de IL-4 IL-5 e IL-10, síntese de IgE e presença de eosinofilia e mastocitose (PEARCE et al., 1991). Esta mudança no padrão da resposta tem sido relacionada com a produção de IL-4 e IL-10 estimuladas por oligossacarídeos presentes nos antígenos dos ovos (WELUPILLAI; HARM, 1994; PEARCE et al., 1991; SILVEIRA et al., 2004), que é antecedida por uma resposta Th0, com produção de citocinas Th1 /Th2 (VELLA; PEARCE, 1994; ABATH et al., 2006; CALDAS, 2008). Mais tardiamente há predomínio de um padrão de resposta tipo Th2 com produção de IL-4, IL-5 e IL-13. Na 12ª semana, quando a infecção se torna crônica e a produção de ovos pela fêmea continua, há modulação da resposta imune levando a uma diminuição da resposta Th2 e do tamanho dos granulomas recém-formados reduzindo, o número de células CD4+ nos mesmos. Embora a resposta Th2 tenha um papel crucial na proteção do tecido do hospedeiro contra as injurias induzidas pelo ovo durante os estágios iniciais da esquistossomose (Brunet et al., 1997), uma resposta Th2 prolongada contribui para o desenvolvimento da fibrose hepática (CHEVEER et al., 2002) A Il-13, tem sido descrita como a principal citocina responsável pela fibrose hepática em murinos (CHIAHIARAMONT et al., 1999; FALLON et al., 2000 e WYNN, 2008). Ela promove a fibrogenese, junto com IL-4 induzindo a expressão de arginase em macrófagos alternativamente ativados. A arginase catalisa a reação da L-arginina em L-ornitina, que é convertida em prolina, que é um amino-acido essencial para a produção de colágeno, portanto no desenvolvimento da fibrose (HESSE et al., 2001). O papel de IL-13 e Il-4 na fibrinogênese são evidenciados pelos seus efeitos sobre a proliferação e produção de colágeno por linhagem de células estreladas hepáticas (SUGIMOTO et al., 2005). Tem sido descrito que mediadores que estão associados com a resposta Th1, como IFN- γ , IL-12 e NO

podem prevenir a fibrose provocada por IL-13 (HESSE et al., 2001, PEARCE, MACDONALD, 2002). Em seres humanos, vários autores tem também demonstrado a participação IL13 no desenvolvimento de formas graves de fibrose em pacientes com a forma crônica da doença, moradores em áreas endêmicas (De JESUS et al., 2004; BOOTH et al., 2004; ALVES-OLIVEIRA, 2006). A IL-10 é uma citocina que desempenha um papel chave no processo regulatório da imunopatogênese da esquistossomose, apresentando-se elevada durante a infecção tanto em seres humanos como em camundongos. Atua nos primeiros estágios da resposta granulomatosa, suprimindo a produção de citocinas como IFN- γ (HESSE et al., 2004), possivelmente, pela regulação da expressão de IL-12 que modula a expressão de IFN- γ e promove a mudança da resposta do padrão Th1 inicial para Th2. Prevenindo o desenvolvimento das formas graves associadas a uma excessiva resposta Th1 (BURKE et al., 2009). Recentes estudos têm sugerido que células T regulatórias CD4 e CD25 com alta produção de IL-10 contribuam para a inibição da resposta TH1 (HESSE et al., 2004; PEARCE, 2004). O papel da IL-10 parece ser o de controlar a polarização da resposta Th1 e Th2 durante a infecção e controlar a progressão da doença. Como também foi verificado em camundongos deficientes em IL-10, que a mesma é essencial para prevenir os efeitos deletérios provocados por uma resposta Th2 exacerbada (HOFFMAN et al., 2000). Além das respostas Th1 e Th2, trabalhos recentes em modelos experimentais têm mostrado a participação da resposta inflamatória Th17 nas formas graves da doença. (RUTITZKY et al., 2005, RUTITZY et al., 2008, TALLIMA et al., 2009).

A despeito da resposta Th2, os vermes adultos sobrevivem nos seres humanos por décadas, isso devido a mecanismos imunorreguladores. Nesses mecanismos está incluído a modulação de células do sistema imune inato, macrófagos e células dendríticas, que resulta em um ambiente anti- inflamatório caracterizado pelo aumento do nível de IL-10 e TGF- β . Esta regulação previne a eliminação do verme e ao mesmo tempo protege o hospedeiro contra a patologia (HEMBLY, 2006).

1.3 IMUNOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose causa uma gama de morbidades, cujo desenvolvimento é influenciado em grande parte pela natureza da resposta imune Th1/Th2 do hospedeiro contra os antígenos liberados pelos ovos do parasito, que levam à formação de granuloma. O

granuloma que se forma em torno dos ovos maduros de *S. mansoni* representa a lesão típica e elemento anatomopatológico básico da esquistossomose. Os elementos importantes na gênese do granuloma são complexos e representam a interação da secreção do miracídio e a resposta do hospedeiro (ANDRADE, 2009). Os produtos secretados pelos ovos são uma mistura complexa, formada por enzimas proteolíticas e glicoproteínas. Estudos recentes de proteômica revelaram que duas glicoproteínas, Omega-1 e 1PSE/alpha-1, são os produtos mais abundantes (SCHRAMM; HASS, 2010; CRASS et al., 2007; MATHIENSON; WILSON, 2010). Estudos produzidos em seres humanos em áreas endêmicas, e com animais de experimentação, têm mostrado que o desenvolvimento da resposta imune, assim como da gravidade da doença é também dependente da genética do hospedeiro, intensidade da infecção, sensibilização intra-uterina para antígenos de *Schistosoma*, e co-infecção com outros parasitos (MOHAMED-ALI et al., 1999; DESSEIN et al., 1999). Indivíduos parasitados por *S. mansoni* podem desenvolver as formas aguda e crônica da doença. As imunopatogênias da fase aguda e da fase crônica da doença são distintas.

1.3.1 ESQUISTOSSOMOSE AGUDA

A esquistossomose aguda é uma reação de hipersensibilidade tipo tardia sistêmica induzida pela migração dos esquistossômulos e ovos, que ocorrem entre 16°C a 90°C dias após a infecção primária (LAMBERTUCCI et al., 1987). O quadro clínico é diversificado, podendo variar de assintomático ou oligossintomático, com a presença de eosinofilia e reação cutânea. A forma oligossintomática pode ter manifestações como febre, dor de cabeça, mialgia, anorexia e tosse não produtiva. Sintomas abdominais podem se desenvolver mais tarde e são causados pela migração e posicionamento dos vermes maduros (GRYSEELS et al., 2006). Muitos pacientes se recuperam espontaneamente após 2-10 semanas, mas alguns desenvolvem doença mais séria com perda de peso dispnéia, diarreia sanguinolenta e hepatoesplenomegalia. Em seres humanos, exames patológicos mostram que os granulomas periovulares são grandes e disseminados no fígado e intestino, podendo também aparecer em outros órgãos como baço, linfonodos pâncreas e cérebro. Os granulomas estão uniformemente na mesma fase e isto é patognomônico da fase aguda (LAMBERTUCCI, 2010). A forma sintomática geralmente acomete indivíduos que não tiveram nenhum contato prévio com o parasito, por isso em moradores de áreas endêmicas é incomum a presença de sintomas. Que pode ser explicada pela sensibilização na vida intra-uterina de crianças nascidas de mães com

a infecção, ou através da modulação da resposta imune que ocorre nos indivíduos cronicamente infectados, as quais podem prevenir o aparecimento das manifestações (LAMBERTUCCI, 1993). Os sintomas geralmente desaparecem em poucos dias nos indivíduos residentes em áreas endêmicas. Em turistas e migrantes a reação pode persistir por semanas ou meses (BOTTIEAU et al., 2006; LAMBERTICCI, 2010).

A esquistossomose aguda é dividida em dois períodos evolutivos, o pré-patente (antes da oviposição) e o pós-patente (após a oviposição) respectivamente. Ainda não estão bem esclarecidos os mecanismos patogênicos envolvidos na esquistossomose aguda, nem quais são os antígenos envolvidos na indução da resposta imune Th1. Sugere-se que antígenos das formas imaturas e vermes adultos sejam responsáveis pela indução da produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α no período pré-patente (CALDAS et al., 2008). Após a oviposição, ocorre resposta Th2 com produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10. A resposta Th2 suprime a resposta Th1 e produz lesões granulomatosas ricas em eosinófilos em torno dos ovos (LAMBERTUCCI, 2010). Jesus et al. (2004), verificaram aumento dos níveis de IFN- γ e diminuição de IL-5 em sobrenadante de PBMC, de pacientes com forma aguda estimuladas com SEA e SWAP, mostrando um padrão misto de citocinas Th1 e Th2. A modulação da resposta imune para Th2 tem sido relacionada com as moléculas existentes nos ovos, como a Lacto-N-Fulcoseptose, (animal) que induz a produção de IL10 (VELLUPILLAI et al., 2000; PEARCE, 2004). Recentemente foi descrito que basófilos participam da indução da resposta Th2 como potentes produtores de IL4 e IL13. Porém, não se sabe se eles iniciam ou apenas mantêm a resposta Th2 (SCHRAMM; HAAS, 2010). A presença de imunocomplexos circulantes, sua deposição nas paredes dos vasos e a forte resposta celular aos antígenos das formas jovens, são responsáveis pelas manifestações da forma aguda (HIATT et al., 1980; LAMBERTUCCI et al., 1997; JAURÉGUIBERT et al., 2007).

A resposta humoral encontrada é induzida pelas formas imaturas do parasito, que ativam pela via alternativa do complemento a produção de IgG, IgM, IgA e IgE, sendo que a IgE atua como mecanismo efetor contra o parasito através da citotoxicidade dependente de anticorpos (Boros, 1989).

1.3.2 ESQUISTOSSOMOSE CRÔNICA

A esquistossomose é uma doença crônica dependente da resposta inflamatória do hospedeiro, que se desenvolve em torno dos ovos retidos nos tecidos do hospedeiro (ANDRADE et al., 2008). A intensidade e o tempo de infecção, assim como a predisposição genética são fatores importantes para a determinação da gravidade da doença (MOHAMED-ALI et al., 1999; DESSEIN et al. 1999). A maioria dos pacientes é assintomática, sendo que apenas entre 4 a 10% desenvolvem as formas graves da doença. (ANDRADE; BINA, 1983; BINA, 1983). Do ponto de vista clínico os sintomas podem variar de formas leves com vagas queixas intestinais (forma intestinal) até graves (forma hepatoesplênica) Com desenvolvimento de fibrose periportal, hipertensão porta, podendo também apresentar lesões cardiopulmonares, renais e neurológicas (ANDRADE; WARREN, 1964; MORAIS et al., 2008; HENRI et al., 2002).

A resposta imune é polarizada para o tipo Th2, com produção IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e baixa produção de IFN- γ (GUAZZINELI; COLLEY, 1992; ARAUJO et al., 1996; CORRE-OLIVEIRA et al., 1998). Estudos mostraram que pacientes assintomáticos apresentam níveis baixos de citocinas Th1 e Th2 para os antígenos do parasito (SEA e SWAP). Enquanto os portadores com formas graves (hepatoesplênica) apresentam níveis elevados de IL-4 e de IL-13 (MORAIS et al., 2008). Altos níveis de IL-13 têm sido correlacionados com a presença de fibrose hepática severa (DE JESUS et al., 2004). Estudos recentes em murinos mostram que as formas graves da esquistossomose estão relacionadas com o aumento das citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e IL-17, que são produtos da resposta Th1 e Th17, respectivamente. Dos quais Th-17 é o marcador mais provável das formas graves da esquistossomose (RUTITZKY et al., 2005; SHAINHEIT et al., 2008; TALLIMAN et al., 2009).

1.4 EFEITO DAS CO-INFECÇÕES ASSOCIADAS À ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

Sendo uma helmintíase que afeta milhões de pessoas, que vivem em áreas, onde são expostas a outros antígenos, o impacto da associação da esquistossomose na progressão das doenças alérgicas, auto-ímmunes e infecciosas tem sido objeto de estudo, tanto em seres humanos como em modelos animais. A modulação da resposta imune que ocorre na fase crônica da esquistossomose não é somente contra os antígenos dos parasitos, mas se estende a antígenos de terceiros e tem sido apontada como a principal causa que possa influenciar a resposta imune a outros antígenos e na progressão de outras doenças (CARVALHO et al., 2008).

A capacidade do *S. mansoni* modular a resposta imune a outros antígenos é bem documentado, nos estudos que avaliaram o efeito da infecção por *S. mansoni* na resposta imune de indivíduos vacinados. Resultados obtidos, após aplicação da vacina por toxóide tetânico, em indivíduos adultos com esquistossomose e crianças de mães infectadas, mostraram que os indivíduos parasitados pelo *S. mansoni* apresentavam resposta do tipo TH2 com produção de IL-4, enquanto o grupo sem esquistossomose mostrou um padrão Th1, com produção de IFN- γ . Sugerindo que a infecção pelo *S. mansoni* reduziu a eficácia da vacina (SABIN et al., 1996). O mesmo foi verificado em camundongos com infecção crônica de *S. mansoni* para a vacina de BCG (ELIAS et al., 2005). Dados mais recentes mostram, que a infecção por *S. mansoni* suprime, significativamente, a resposta mediada por células T em animais vacinados com uma vacina de DNA contra HIV (Da'Dara, 2006).

1.4.1 INFLUÊNCIA DA ESQUISTOSSOMOSE EM DOENÇAS ALÉRGICAS E AUTO-IMUNES

Como ocorrem com os vermes, as células Th2 tem um papel crucial nas reações inflamatórias alérgicas, incluindo a asma brônquica. Medeiros et al. (2003) realizaram estudo clínico para testar a hipótese que a infecção pelo *S. mansoni* interfere na gravidade da asma brônquica. Para tanto foram selecionados pacientes asmáticos portadores de esquistossomose, moradores em zona rural endêmica e como controle, pacientes asmáticos de área urbana não endêmica para esquistossomose, mas endêmica para outros helmintos. Os resultados mostram que o grupo co-infectado com *S. mansoni* apresentou menor positividade a testes cutâneos

para aeroalérgenos, necessidade do uso de menos drogas antiasmáticas e sintomas mais leves da doença. Sugerindo que a infecção por *S. mansoni* atenua os sintomas clínicos da doença. Adicionalmente, estudos mostraram que células de pacientes com asma infectados com *S. mansoni*, quando estimuladas *in vitro* produzem baixos níveis das citocinas IL-4 e IL-5, e que essa modulação da resposta Th2 tem uma participação importante da IL-10 (ARAUJO et al., 2004).

Existe uma forte correlação entre a incidência de doenças auto- imunes como diabetes melito, doença de Crohn (MOREELS et al., 2004) e esclerose múltipla (LA FLAME et al., 2004), com o alto nível sócio-econômico, e o excesso de higiene doméstica da população. Países em desenvolvimento apresentam menores índices dessas doenças. Este fato tem sido atribuído à influência dos aspectos ambientais, como a ocorrência de doenças parasitárias (ZACONNE et al., 2006). O *S. mansoni*, pela sua importante modulação da resposta imune tem sido usado como modelo em diversos estudos (CARVALHO et al., 2008).

A diabetes melito tipo I é uma doença auto-imune medida por Th1. Em camundongos *Non Obese Diabetic* (NOD), que desenvolvem espontaneamente doença similar ao de seres humano os animais infectados com *S. mansoni* apresentam uma redução no aparecimento de diabetes. Esta proteção esta relacionada aos antígenos existentes nos ovos do parasito, uma vez que a inoculação dos mesmos, também, impede o desenvolvimento da doença (COOKE et al.; 1999). Foi demonstrado que extratos solúveis de ovos (SEA) ativam a resposta imune através de alterações da expressão de receptores de lectinas tipo C (CLRs), expansão da resposta Th2 e de células T regs. Recentemente esses mesmos autores mostraram que a omega-1, uma glicoproteína presente no SEA é a responsável pela indução da resposta Th2 *in vivo* (ZACONNE et al., 2003; 2010; 2011).

1.4.2 CO-INFEÇÃO COM PROTOZOÁRIOS

Todas as espécies de *Leishmania* são parasitos intracelulares do sistema fagocítico mononuclear. O mecanismo de defesa contra as leishmanias é dependente, principalmente, de uma resposta celular mediada pelas células TCD4⁺ Th1, mediante a estimulação de citocinas IFN- γ e TNF- α . Portanto, é esperado que uma co-infecção de *S. mansoni* interfira na resposta imune contra esses agentes, favorecendo a permanência e multiplicação, e alterando o curso da doença.

A co-infecção de *Leishmania donovani* em animais com uma infecção patente por *S. mansoni* levou a um aumento da carga parasitária do protozoário no fígado e no baço, apesar do desenvolvimento de uma resposta Th1 anti-*Leishmania*. Também, foi vista uma falha na imunidade anti-*Leishmania* dentro do granuloma esquistossomótico. Uma vez que foram visualizadas formas amastigotas se multiplicando no seu interior. Levando os autores a hipótese que o granuloma de *S. mansoni* forma um discreto nicho que facilita a sobrevivência intracelular da *Leishmania donovani*. Este fato poderia explicar o aumento da carga de parasitária (HASSAN et al., 2006). La Flame, (2002) em estudo experimental com *L. major*, demonstrou que a pré-infecção com *S. mansoni*, levou a um retardo no desenvolvimento e resolução das lesões cutâneas. Contrariamente, nenhum impacto ocorreu no curso da infecção pelo *S. mansoni*.

Toxoplasma gondii, é um protozoário oportunista com distribuição mundial. O controle da infecção é mediado por uma forte resposta inflamatória, no qual IFN- γ dependente de IL-12 tem um papel crucial (ARAUJO et al., 2001). Dada a prevalência de *T. gondii* em áreas endêmicas de esquistossomose, vários artigos têm sido publicados, evidenciando o efeito da co-infecção entre esses dois parasitos. Estudos apontam que, em camundongos com uma infecção patente por *S. mansoni* seguida por uma infecção secundária por *T. gondii*, havia um aumento da mortalidade e morbidade, com níveis elevados de TNF- α e transaminases, quando comparados aos controles com somente uma infecção. Os camundongos com dupla infecção também apresentavam uma grave doença hepática, com a presença de esteatose e necrose coagulativa em áreas adjacentes aos granulomas periovulares. Essa patologia hepática parecia não estar correlacionada com o aumento do número de taquizoítas de *T. gondii* uma vez que esses se encontravam diminuídos. Foi sugerido que a alta mortalidade encontrada era devida aos altos níveis de TNF séricos e que estava relacionada à patologia hepática (MARSHAL et al., 1999). Em estudos posterior Araujo et al. (2001), mostram que camundongos deficientes de IL-12 co-infectados com *S. mansoni* e *T. gondii*, apresentavam um dano hepático menor, com aumento do tempo de vida. Verificando que o aumento da mortalidade e morbidade encontradas se devia, não somente ao aumento de TNF, mas também aos níveis elevados de IL-12. Sugerindo o uso da citocina IL-12 para promover uma ação anti-fibrótica e talvez minimizar os danos causados no fígado pelos granulomas. Em seres humanos existem poucos trabalhos, e estes mostram uma progressão da doença hepática comparada a dos indivíduos com infecção somente por *S. mansoni* (FAYAD et al., 1992).

1.4.3 CO-INFEÇÃO DE *S. mansoni* E OUTROS HELMINTOS

Em áreas endêmicas da esquistossomose outras helmintíases estão também presentes, e o múltiplo parasitismo é frequente entre os moradores. Estudos têm mostrado que indivíduos co-infectados com *S. mansoni* e ancilostomídeos, apresentam aumento no número de ovos e da carga parasitária. Levando a uma intensidade mais alta de infecção, quando comparados com os monoinfectados. Apontando para um possível efeito sinérgico sobre a resposta imune destes helmintos durante a co-infecção (KEISER et al., 2002; FLEMING et al., 2006). Entretanto, até o momento não se tem mostrado a capacidade de infecção de *S. mansoni* modificar o curso clínico de outras helmintíases. Correia- Oliveira et al. (2002), mostraram que indivíduos parasitados com *S. mansoni* e *Ascaris lumbricoides* ou *S. mansoni* e *Ancylostoma duodenale*, apresentam uma diminuição tanto da resposta imune celular como da resposta humoral a antígenos de *A. lumbricoides* e *A. duodenale*. Este fenômeno provavelmente é devido a uma somatória de efeitos modulatórios que são observados na infecção por helmintos (CARVALHO et al., 2008).

Modelos experimentais demonstram que a infecção pelo *S. mansoni* pode colaborar com a resistência de animais a outros helmintos, como também, outros helmintos podem aumentar a infecção de *S. mansoni*. Animais susceptíveis co-infectados com *S. mansoni* e *Trichuris muris* apresentaram forte resposta Th2 caracterizada por aumento de IL- 4, IL- 5 e IL-10. Quando foi feita a avaliação da carga parasitária verificou-se que esses animais não apresentavam mais vermes adultos nos primeiros dias de infecção, exibindo fenótipo semelhante a animais resistentes (CURRY et al., 1995). Em contraste, experimentos com animais, mostram que na infecção inicial com *T. muris*, seguida por infecção de *S. mansoni*, ocorre o aumento da carga de vermes adultos e do número de ovos do trematódeo no fígado dos animais. Isto sugere a ocorrência de diminuição do número de esquistossômulos presos aos pulmões, devido à resposta Th2 provocada pelo nematóide, que altera as citocinas do pulmão com redução dos mecanismos de resistência inata (BICKLE et al., 2008).

1.4.4 CO-INFEÇÃO COM VIRUS

O vírus da hepatite C (HCV) se sobrepõe a esquistossomose em várias regiões, tendo o fígado como principal órgão alvo. Em regiões endêmicas, pacientes infectados com *S. mansoni* apresentaram carga viral elevada durante a fase aguda e se mantiveram elevadas na fase crônica, levando ao desenvolvimento de uma hepatite crônica. Já os pacientes infectados somente com HCV apresentam viremia alta seguida, de redução da carga viral após a fase aguda (KAMAL, 2001). O mesmo autor mostrou que pacientes co-infectados com *S. mansoni* HCV apresentaram doença mais grave com fibrose hepática.

Estudos mostram que a infecção por *S. mansoni* tem pouco impacto na infecção pelo HIV. Não existem evidências que a co-infecção interfira na carga viral, nem no curso da infecção do HIV. Também, nenhum efeito é encontrado na evolução clínica da esquistossomose, apesar de bem documentada a participação das células TCD4 na formação dos granulomas esquistossomóticos, que protegem os tecidos do hospedeiro contra as enzimas proteolíticas produzidas pelos ovos. No entanto, os pacientes co-infectados excretam menos ovos, o que é condizente com resultados obtidos em animais, que mostram a participação das células T na passagem dos ovos para o intestino. Também, não houve diferença na fibrose hepática em pacientes co-infectados com *S. mansoni* e HIV (KARANJA et al., 1998; MWINZI et al., 2004).

1.5 ASPECTOS GERAIS DA PARACOCCIDIOIDOMICOSE

O fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis*, é o agente da doença sistêmica humana paracoccidiodomicose (PCM), que afeta indivíduos em áreas endêmicas, da Argentina até a América Central. É a micose profunda de maior prevalência na América Latina, incluindo Argentina, Venezuela e Colômbia (SAN-BLAS, 1993; COUTINHO, 2000). Sendo o Brasil a mais importante área endêmica com, 85 % de todos os casos reportados (RESTREPO, 1985). Estima-se que dez milhões de pessoas estão infectadas com *P. brasiliensis* e que 2% podem desenvolver a doença (MaCWeen, 1995). PCM é a oitava causa de morte entre as doenças infecto-parasitárias e responsável pela mais elevada taxa de mortalidade entre as micoses sistêmicas no Brasil (COUTINHO et al., 2002). Os indivíduos mais acometidos pela micose, em sua maioria são adultos, do sexo masculino, tabagistas e que desenvolvem atividades ligadas à agricultura (MARTINEZ, 2004; VERLI et al., 2005).

A Infecção por *P. brasiliensis* ocorre por inalação de propágulos infectantes, os quais representam a estrutura reprodutiva da fase micelial do fungo. Para o desenvolvimento da doença é necessário que os conídios alojados nos alvéolos pulmonares transitem para a fase leveduriforme, nos pulmões, progredindo secundariamente aos linfonodos e seguido de disseminação linfática ou hematogênica para o fígado, baço, pele e mucosa (McEWEEN et al., 1987; DIXON et al., 1998).

A interação do Pb com seres humanos pode determinar infecção ou doença. A infecção paracoccidioidiana se caracteriza pelo contato do indivíduo com o fungo, sem manifestações clínicas ou alterações patológicas. A PCM manifesta de duas formas distintas da doença: a forma aguda e a forma crônica (FRANCO et al., 1987; SKIKANAI-YASUDA, 2006). A forma aguda é mais grave e rara, acomete principalmente indivíduos jovens em igual proporção entre os sexos (masculino e feminino). Sendo caracterizada por uma rápida evolução, envolvendo o sistema reticuloendotelial, causando linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. A forma crônica ocorre mais frequentemente em trabalhadores rurais do sexo masculino (BRUMMER et al., 1993); FRANCO et al., 1987). Pode se apresentar localizada (unifocal), com acometimento predominantemente em pulmões e tecidos mucocutâneos, até casos mais graves e disseminados (multifocal), dependendo da competência da imunidade celular do indivíduo (FRANCO et al., 1987; BRUMMER et al., 1993; DIXON et al., 1998). Aqueles com a forma multifocal podem manifestar uma evolução da doença que se compara em gravidade com a forma aguda (BENARD et al., 1995).

A maioria dos indivíduos expostos desenvolve infecção assintomática (infecção primária da PCM). Estudos epidemiológicos utilizando-se teste intradérmico com paracoccidioidina para a detecção de contato prévio com *P. brasiliensis* BENARD et al., (1995); DIXON et al., (1998) ou pelo uso de teste imunoenzimático (ELISA), detectando anticorpos IgG específicos BOTTEON et al., (2002) revelam que a exposição resultante em infecção subclínica transiente é alta em populações adultas saudáveis, principalmente em áreas rurais (BOTTEON et al., 2002; WANKE; LONDERO, 1994). Esta infecção primária da PCM pode persistir em focos quiescentes por décadas como observado em casos importados (MANNIS et al., 1996). Isto significa que durante este período estes pacientes foram capazes de controlar a disseminação fúngica. A resposta imune celular é considerada a mais importante forma de defesa do organismo contra este fungo (BURGER et al., 1996). A resposta imune humoral é considerada não protetora, desde que intensa resposta humoral é correlacionada com a gravidade da doença (SINGER-VERMES et al., 1993; MELLO et al., 2002).

1.6 RESPOSTA IMUNE

A depressão da imunidade celular na PCM pode estar associada à resposta mediada por células Th2, baseada na classe (IgE) ou subclasses de imunoglobulina G (IgG) e no padrão de citocinas produzidas (SINGER-VERMES et al., 1993; BAIDA et al., 1999). Na PCM disseminada pode ser observados altos níveis séricos de imunoglobulina E (IgE), IgG4, IgE ou IgG específicos para a glicoproteína de 43-kDa (gp43) de *P. brasiliensis*, interleucina 4 (IL-4) e IL-5 (ARANGO; YARZÁBAL, 1982; MENDES-GIANNINI et al., 1989; BAIDA et al., 1999; BISELLI et al., 2001). Altos níveis de IgG anti-gp43 e IgE anti-gp43 estão correlacionados com PCM grave (MENDES-GIANNINI et al., 1989; MAMONI et al., 2001).

Experimentos em camundongos confirmam a hipótese de resistência associada a uma resposta imune tipo Th1 (CALICH; KASHINO, 1998). Calich; Kashino (1998) estudaram 11 linhagens de camundongos, dos mais susceptíveis (B10. A, B10D2/oSn, B10D2/nSn), intermediários (BALB/c, C57B1/10, CBA, C3H/FeJ), resistentes (C3H/HeJ) e muito resistentes (A/Sn, A/J, DBA/2), em relação aos mediadores produzidos durante o curso da infecção. Neste modelo, os autores demonstraram que a resistência à infecção está associada à imunidade tipo celular e ativação dos fagócitos, enquanto a susceptibilidade está relacionada com a ativação preferencial dos linfócitos B.

Modelos murinos têm sido empregados nos estudos de PCM experimental (CALICH et al., 1998). Diferenças na susceptibilidade e curso clínico da PCM, entre linhagens diferentes de camundongos, mimetizam as formas crônica e aguda desta doença em seres humanos (CALICH; KASHINO, 1998; CANO et al., 1995; SINGER-VERMES et al., 1993). A produção sustentada de citocinas padrão Th1, tipo INF- γ e IL-2 e níveis significativamente altos de IgG2a, são encontrados em camundongos resistentes a PCM (KASHINO et al., 2000). Linfócitos de camundongos resistentes produzem IL-2 e INF- γ durante todo o curso da infecção (CALICH; KASHINO, 1998). Os camundongos susceptíveis produzem níveis baixos de IFN- γ e significantes níveis de IL-5 no início da infecção. Na fase crônica, apresentam secreção transitória de IL-4 e IL-2 (CALICH; KASHINO, 1998).

As glicoproteínas, gp43 e gp70, produzidas por células leveduriformes de *P. brasiliensis* possivelmente modulam a resposta imune, induzindo a resposta Th2, uma vez que níveis elevados de IgE a gp43 são observados em pacientes com PCM (ARANGO et al., 1982), BAIDA et al., (1999), bem como a presença de IgE a gp70 em soros de pacientes com PCM

na forma aguda (MARQUEZ, 2003). A gp43 e a gp70 são reconhecidas por 100% e 96% de soros de pacientes com PCM, respectivamente (TRAVASSOS et al., 1995).

Além da possível modulação da resposta imune, a gp43 é considerada um importante fator de virulência de *P. brasiliensis* (PUCCIA et al., 1986), por apresentar atividade de proteinase em pH ácido (PUCCIA; TRAVASSOS, 1991), por atuar como um receptor de laminina, o que propõe ser responsável pela adesão das leveduras de *P. brasiliensis* às células da membrana basal do hospedeiro e conseqüentemente pela invasão de células hospedeiras que expressam receptores de laminina (VICENTINI et al., 1994). Além disto, existem evidências de que a gp43 possa estar relacionada a um mecanismo de escape do fungo para a instalação da infecção primária, uma vez que promove a inibição da função de fagocitose de macrófagos como a inibição da produção de NO por macrófagos e redução da capacidade fagocítica destas células (POPI et al., 2002). Adicionalmente a gp43 induz a redução da atividade linfoproliferativa (BENARD et al., 1997) e aumento da taxa de apoptose induzida em linfócitos T. A gp43 e a gp70 também apresentam a capacidade de inibir as atividades de macrófagos, inibindo a liberação de NO e H₂O₂ (MATOS-GROSSO et al., 2003).

Como citado anteriormente, a infecção por *S. mansoni* induz uma resposta imune celular do tipo Th2, que está implicada na imunopatologia da esquistossomose, bem como à defesa contra reinfecções e contra super-infecções pelos altos níveis de IgE no hospedeiro. Este desvio da resposta, com padrão de citocinas de Th2 deve ser prejudicial ao hospedeiro na PCM e assim, uma infecção associada poderá levar à maior gravidade da PCM (doença). E por ser o mecanismo de defesa para *S. mansoni* distinto da resposta ao fungo *P. brasiliensis*, a infecção concomitante poderá alterar também o curso da infecção por *S. mansoni*.

Devido à cronicidade e a prevalência da infecção de *S. mansoni* e *P. brasiliensis*, se sobreporem em muitas regiões especialmente no norte do Paraná, se torna importante o estudo de infecção mista concomitante. Propõem-se investigar como o *S. mansoni* pode alterar a iniciação e progressão da PCM, bem como, esta pode afetar a esquistossomose em termos de imunopatologia das doenças.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS:

2.1.1 Levantamento de casos humanos de infecções mistas com *S. mansoni* e *P. brasiliensis*.

2.1.2 Verificar efeito de infecções associadas com *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

2.2.1 Determinar o nível sérico de antígenos solúveis circulantes de *P. brasiliensis* em pacientes portadores de esquistossomose crônica;

2.2.2 Determinar o perfil das citocinas (INF- γ , IL-4, IL-10, IL-12, IL-17, IL-13) em soro de portadores crônicos de esquistossomose, pacientes esquistossomóticos e com sorologia positiva para *P. brasiliensis*, e indivíduos saudáveis;

2.2.3 Determinar os níveis séricos de IgE e IgG específica para SEA e SWAP em pacientes.;

2.2.4 Determinar o perfil sérico e hepático das citocinas (INF- γ , IL-4, IL-10, IL-13) em grupos de camundongos BALBc co-infectados, mono infectados;

2.2.5 Verificar os efeitos histopatológicos no fígado nos grupos de animais co-infectados e monoinfectados.

3. REFERÊNCIAS

- ABATH, F.G. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: What can be learnt from human studies? **Trends Parasitological**, v. 22, n.2, p. 85-91, 2006.
- ALVES-OLIVEIRA, L.F. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis in humans. **Infection and Immunity**, v.74, n. 2, p. 1215-1221, 2006.
- ANDRADE, Z.A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunological**, v. 31, n. 11, p. 656-663, 2009.
- ANDRADE, Z.A., BINA, J.C. A patologia da forma hepatoseplenica da esquistossomose mansônica em sua fase avançada. Estudo de 232 necropsias completas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 1, p. 58-75, 1983.
- ANDRADE, Z.A.; WARREN, K.S. Mild prolonged schistosomiasis in mice: alteration in host response with time and development of portal fibrosis. **Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, p.53 -57, 1964.
- ARANGO, M. YARZÁBAL, L. T-cell dysfunction and hyperimmunoglobulinemia in paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, v. 79, p 115-123, 1982.
- ARAUJO, M. I. et al. Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice coinfecting with *Schistosoma mansoni* and *Toxoplasma gondii*. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1454-1462, 2001.
- ARAUJO, M. I. et al. Evidence of T helper type2 activation in human schistosomiasis. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 6, p. 1399-1403, 1996.
- ARAUJO, M. I. et al. Impaired T helper 2 response to aeroallergens in helminth- infected patients with asthma. **Journal of Infectious Diseases**, v.190, n. 10, p. 1797-1803, 2004.
- BAIDA H, BISELLI PJC, JUVENALE M, DEL NEGRO GMB, MENDES-GIANNINI MJS, DUARTE AJS, BENARD G. Differential antibody isotype expression to major *Paracoccidioides brasiliensis* antigen in juvenile and adult form paracoccidioidomycosis. **Microbes and Infection**, v.1, p. 273-278, 1999.

- BERNAD, G. et al. Response of T and B lymphocytes to *Paracoccidioides brasiliensis* cell wall extract in healthy sensitized and nonsensitized subjects. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 53, n. 2, p. 189-194, 1995.
- BICKLE, Q.D.; SOLUM, J.; HELMBY, H. Chronic intestinal Nematode infection exacerbates. **Infection Immunity**, v.76, n. 2, p.5802-5809, 2008.
- BINA, J. C.; PRATA, A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarandi. I Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e forma graves. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 211-216, 2003.
- BISELLI, P. J. C. et al. IgE antibody response to main antigenic component of *Paracoccidioides brasiliensis* in patients with Paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 39, n. 6, p. 475-478, 2001.
- BOOTH, M. et al. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN- γ , high TNF- α , or low RANTES, depending on age, and gender. **Journal of Immunology**, v.172, n.2, p. 1295-1303, 2004.
- BOROS. D. L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.2, n.2, p. 250-269, 1989.
- BOTTEAU, E. et al. Imported katayama fever: Clinical and biological features at presentation and during treatment. **The Journal of infection**, v 52, n. 5, p. 339-345, 2006.
- BOTTEON, F. A et al. *Paracoccidioides brasiliensis*-reactive antibodies in Brazilian blood donors. **Medical of Mycology**, v. 40, n. 4, p. 387-391, 2002.
- BRUMER, E; CASTANHEDA E; RESTREPO A. Paracoccidioidomycosis: na update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p. 89-117, 1993.
- BRUMMER et al. Murine model of paracoccidioidomycosis. Productions of fatal acute pulmonary or chronic pulmonary and disseminated disease: immunological and pathological observations. **Journal of Experimental Pathology**, v.1, n. 3, p. 241-255, 1984.
- BURGER, E. et al. Histopatholy of paracoccidioidomycosis infection in athymic and euthymic mice: sequential study **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 235-242, 1996.

- BURKE, M.L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v.31, n.4, p. 163-176, 2009.
- CALDAS I.N.R. et al. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of infection. **Acta Tropica**, v. 108, n.2-3, p. 109-117, 2008.
- CALICH, V.L.G.; KASHINO, S.S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidoides brasiliensis* infection. **Journal of Medical Biological Research**, v. 31, n. 5, p. 618-623, 1998.
- CANO, L.E. et al. Protective role of gamma interferon in experimental pulmonary paracoccidioidomycosis. **Infection Immunity**, v. 66, n. 2, p. 800-806, 1998.
- CARVALHO, E.M.; SANTOS, S. B.; DE JESUS, A. R. Resposta imune no contexto das co-infecções associadas a Esquistossomose. IN: CARVALHO, O.S.; Coelho,P.M.Z.; Lenzi,H. L. **Schistosoma mansoni Esquistossomose uma visão multidisciplinar**. 1.ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008, p.717-730.
- CRASS, C.L. et al. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* egg secretions. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 155, n. 2, p. 84- 93, 2007.
- CHEEVER A. W. et al. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunology Today**, v. 21, n. 9, p. 465-466, 2000.
- CHEEVER, A.W. et al. Experimental modelo of *Schistosoma mansoni* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 917-940, 2002.
- CHIARAMONTE, M.G. et al. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 104, v. 6, p. 777-785, 1999.
- COOKE, A.P.; TONKS, P.; JONES, F.M.; SHEA, O.; FULFORD, A.J. AND DUNNE, D.W. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes in non-obese diabetic mice. **Parasite Immunology**, v. 21, p. 169-176, 1999.
- CORREA-OLIVEIRA, R. et al. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n.1, p. 171-177, 1998.

COUTINHO, Z. F.; Silva D; Lazera, M; Petri, V; Oliveira, RM; et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980–1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v.18, P. 1441-1454, 2002.

CURRY, A. J. et al .Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris*. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 181. p. 769-774, 1995.

Da'DARA, A.A. et al. Helminth infection suppresses T cells in immune response to HIV-DNA-based vaccine in mice. **Vaccine**, v. 24, n. 24, p. 5211-5219, 2006.

DE JESUS, A.R. et al. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. **Infection Immunity**, v.72, n. 6, p. 3391-3397, 2004.

DESSEIN, A.J. et al. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. **The American Journal of Human Genetics**, v.65, n. 3, p. 709-721, 1999.

DIXON, D. M. et al. Development of vaccines in their use in the prevention of fungal infections in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, v. 40, p. 155-164, 1998.

DOENHOFF, M. J. A role for granuloma inflammation in the transmission of infectious disease: schistosomiasis and tuberculosis. **Parasitology**, v.5, n.1, p.113-125, 1997.

DUTRA-MENEZES, M.C. et al. Dados preliminares do perfil epidemiológico da esquistossomose mansônica no distrito sanitário de Londrina-Paraná. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Poços de Caldas, 1999. **Anais XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Poços de Caldas – MG, 1999a**, p.16.

ELLIAS, D. et al. *Schistosoma mansoni* infection reduces the protective efficacy of BCG vaccination against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. **Vaccine**, v. 23, n. 11, p. 1326-1334, 2005.

FALLON, P. G. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 5, p. 2585-2591, 2000.

FAYAD, M. E. et al. Studies in chronic liver diseases in patients with and without *Toxoplasma gondii* latent infections. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.22, p. 807-815, 1992.

FIEMING, F.M. et al. Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. **Tropical Medicine & International Health**, v.11, n. 1, p. 56-64, 2006.

FRANCO, M. et al. Paracoccidiodiomycosis: a recently proposed classification of its clinical form. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129-132, 1987.

FRANCO, M. Host-parasite relationships in paracoccidiodiomycosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v.25, p. 5-18, 1987.

GAZZINELLI, G.; COLLEY, D.G. Human immune response during schistosomiasis mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 2, p. 125-134, 1992.

GRYSSELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 954, p. 1106-1118, 2006.

HARISON, R.A, DOENHOFF, M.J.A. Retarde development of *Schistosoma mansoni* in immunodepressed mice. **Parasitology**, v. 86, p. 429-438, 1983.

HASSAN, M.F.; ZHONG, Y; ERGWERDO, C.R.; KAYE, P.M.; BICKLE, D.Q. The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. **The American Journal of Pathology**. v. 169. n. 3, p. 943-953, 2006.

HELMBY, H; BICKL et al. Immune modulation by helminth infections. **Parasite Immunology**, v.28, p. 479- 481, 2006.

HEMBY, H.; KULLBERG, M. & TROYE-BLOMBERG, M. Altered immune response in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infection. **Infection and Immunity**, v. 66, n.11, p. 5167- 5174, 1998.

HENRI, S, et Al Cytokine regulation of priporta fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNf-alpha with aggravation of disease. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 929- 936, 2002.

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

HERNANDEZ, D.C., LIM, k.C, McKERROW, J.H., DAVIES, S.J. *Schistosoma mansoni*: sex-expecific modulation of parasite growth by host immune signals. **Experimental Parasitology**,v. 196, p. 59- 61, 2004.

HESSE, M. et al. Differential regulation of nitric oxide synthas-2 and arginase-1 by type1/type2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6533- 6544, 2001.

HESSE, M. et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating il-10 producing innate effector and regulatory t cells. **Journal of Immunology**, v.172, n.5, p. 3157- 3166, 2004.

HIATT, R.A.; OTTEBEN, E.A.; SOTOMAJOR, Z.R. Serial observation of circulating immune complexes in patients with acute schistosomiasis. **Journal Infectious Diseases**, v. 142, p. 665- 670, 1980.

HOFFMAN, K.F. et al. Il-10 and dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine response induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6406- 6416, 2000

JAUREGUIBERT S. et al. Acute neuroschistosomiasis: Two cases associated with vasculite cerebral. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 76, p. 964- 960, 2007

JESUS, A. R. Association of type 2 cytokine with hepatic fibroses in human *Schistosoma mansoni* infection. **Infection and Immunity**. v. 72, n. 6, p. 3391- 3397, 2004.

JESUS, A.R.; SILVA, A.; JESUS, A.A.; REGO, M.A.; CARVALHO, E.M. Clinical and immunological evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **The Journal Infectious Diseases**, v. 185, p. 98- 105, 2002.

KAMAL, S. M. et al. Specific cellular immune response and cytokine patterns in patients co-infected with hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 8, p. 972- 982, 2001.

KARANJA, D. M. S., COLLEY, D. G., NAHLEN, B. L. et al. Studies on schistosomiasis in western Kenya: I Evidence for immune-facilitated excretion of schistosome eggs from patients with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus coinfections. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 2, p. 517-521, 199.

KASHINO, S.S.; FAZIOLI, R.A.; CAFALLI-FAVATI, C; MELONI-BRUNERI, L.H.; BURGER, E.; VAZ, C.A.; SINGER, L.M.; CALICH, V.L. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection is links to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence or INF- gamma production. **Journal of Interferon and Cytokine Research**, v. 20, n. 1, p. 89-97, 2000.

KATZ, N.; PEIXOTO, S.V. Critical analyses of the estimated number of shistosomiasis masoni carries in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 303-308, 2000.

KEISER, J. et al. Association between *Schistosoma mansoni* and hookworm infections among school children in Cote d'Ivoire. **Acta Tropical**, v. 84, n. 1, p. 31- 41, 2002.

LA LAMME, A. C. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by imparing parasite killing by macrophages. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 7, p.339- 345, 2002.

LA FLAMME, A. C. Shstosomiases decrease central nervous system information and alters the progression of experimental autoimmune encephomyelites. **Infection and Immunity**, v.7, n.9, p 4996- 5004, 2003.

LAMBERTUCCI, J.R. *Schistosoma mansoni*: pathological and clinical aspects. In P Jordan, G Webbe (eds.), Human schistosomiasis, **Cab International, Wallinford**, p. 195-225, 1993.

LAMBERTUCCI, J.R. Acute schistosomiasis masoni: revisited and reconsidered. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.4, p. 422-435, 2010.

LAMBERTUCCI, J.R. et al., A esquistossomose em Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, p. 47-52, 1987.

LAMERTUCCI, J.R. Acute Schistosomiasis: report on five regular cases. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n.5, p. 631-635, 1997.

MAC DONALD, A.S.; ARAUJO, M.I.; PEARCE, E.J. **Infection and Immunity**, v. 70, n.2, p. 427- 433, 2002.

MANNS, B. J et al. Paracoccidioidomycosis: case report and review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 23, p. 1026- 1032, 1996.

MARQUES, S. A. Paracoccidioidomicose: atualização epidemiológica, clínica e terapêutica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 78, n. 2, p. 135-148, 2003.

MARQUEZ, A.S. “Reatividade de anticorpos a componentes de alta massa molecular de *Paracoccidioides brasiliensis* em soros de pacientes com paracoccidioidomicose aguda e crônica”. Dissertação de Mestrado em Microbiologia, 2003.

MARSHALL, A.J. et al. Toxoplasma gondii and Schistosoma mansoni synergize to promote hepatocyte dysfunction associated with high level of plasma TNF- alpha and death in C57Bl/6 mice. **Journal of Immunology**, v. 163, p. 2089- 2097, 1999.

MATHIESON, W., WILSON R.A. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. **International Journal Parasitology**, v. 40, n.5, p. 617-128, 2010.

MATTOS GROSSO, D.; ALMEIDA, S. R.; MARIANO, M.; LOPES, J. D. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidioides brasiliensis* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6534- 6542, 2003.

McWEEN, J.G. et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, Abingdon: v. 25, p. 165-175, 1987.

McWEEN, J.G. GARCIA, A.M.; ORTIZ, S.; BOTERO, S; AND RESTREPO, A.; In search of the natural habitat of *Paracoccidioides brasiliensis*. **Archives Medical Research**, v. 26, p. 305-306, 1995.

MEDEIROS, M.J. et al. Worms and allergy. **Parasite Immunology**, v.111, n.15, p. 947-951, 2003.

MELO, S.C. & DUTRA - MENEZES, M. C. N. Epidemiologia da esquistossomose mansoni em bairros da cidade de Bandeirante-PR. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 37, n. 4, p. 131, 2001. (Resumo).

MENDES-GIANNINI, M.J.; BUENO, J.P.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. FERREIRA, A.W. MASUDA, A. Detection of the 43,000 molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidiodomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v.27, p. 2842-2845, 1989.

MINAMI, L. H. Programa de controle da esquistossomose – PCE. In: Treinamento sobre esquistossomose para os municípios da 17^a RS, 2005 - Londrina. CDROM.

MOHAMED – Ali, Q. et al Susceptibility to periportal fibrosis (Symmers) fibrosis in human *Schistosoma mansoni*: evidence that intensity and duration of infection, gender, and inherited factors are critical in diseases progression. **Journal of Infectious Diseases**, v.180, n. 4, p. 1298-1306, 1999.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Pathology. In: FRANCO, M. et al. Paracoccidiodomycosis: 1. ed. Boca Raton: CRC Press, p. 131-142, 1994.

MORAIS, C. N. et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 103, n.6, p. 561-658, 2008.

MOREELS, T. G. et al. Concurrent infection with *Schistosoma mansoni* attenuates inflammation induced changes in colonic morphology, cytokine levels, and smooth muscle contractility of trinitrobenzene sulphonic acid induced colitis in rats. **Gut**, v.53, n. 1, p. 99-107, 2004.

MWINZI, P.N.M. et al. Short report: evaluation of hepatic fibrosis in person co-infected with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus-I. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 6, p. 783-786, 2004.

OKANO, M. et al. Lacto-n-fucopentose iii found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing th2-type response. **Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 442-450, 2001.

OLIVEIRA-FRAGA, L.A. et al, Induction of type 2 responses by *Schistosoma* worms during prepatent infection. **The Journal Infectious Diseases**, v. 201, p. 464-472, 2010.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <[HTTP://WWW.who.int/Schistosomiasis /em/](http://WWW.who.int/Schistosomiasis/em/)>. Acesso em 5 de fevereiro de 2012.

PEARCE E. & MACDONALD A. The immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews**, v. 2, p. 499-511, 2002.

PEARCE, E.J. et al. Down regulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 response by a parasite helminth, *Schistosoma mansoni*. **Journal Experimental Medicine**, v. 173, n. 1, p. 159-166, 1991.

PEARCE, E.J. et al. Th2 response polarization during infection with helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 117-26, 2004.

PEARCE, J.; MACDONALD, A. The immunobiology of Schistosomiasis. **Immunology**, v. 2, p. 499-511, 2002.

POPI, A. F.; LOPES, J.D.; MARIANO, M. GP43 from *Paracoccidioides brasiliensis* inhibits macrophage functions. An evasion mechanism of fungus. **Cellular Immunology**, v. 218, p. 87-94, 2002.

PUCCIA, R.; SCHENKMAN, S.; GORIN, P. A. J.; TRAVASSOS, L.R. Exocellular components of *Paracoccidioides brasiliensis*: identification of a specific antigen. **Infectious Immunity**, v. 53, n.1, p.199-206, 1986.

PUCCIA, R.; TRAVASSOS, L. R. The 43-kDa glycoprotein from the human pathogen *Paracoccidioides brasiliensis* and its deglycosylated form excretion and susceptibility to proteolysis. **Archives Biochemistry Biophysics**, p. 298-302, 1991.

RABELO, A. Acute Human *Schistosomiasis mansoni*. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 277-280, 1995.

RESTREPO, A. The Ecology of *Paracoccidioides brasiliensis*: a puzzle still unsolved. **Sabouraud**, v. 23, p. 323-324, 1985.

RUTITZKY, L. I. et al, severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. **Journal of Immunology**, v. 175, n. 6, p. 3920-3926, 2005.

RUTITZKY, L.I.; SMITH, P.M.; STADECKER, M. J. T-bet protects against exacerbation of schistosome egg-induced immunopathology by regulating Th17-mediated inflammation. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 9, p. 2470-2481, 2009.

SABIN, E.A. et al. Impairment of tetanus toxoide-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. **The Journal Infectious Diseases**, v. 173, p. 269-272, 1996.

SAN-BLAS, G. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycological**, v. 31, p. 99-113, 1993.

SCHRAMM, G. & HAAS, H. Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. **Microbes and Infection**, v. 12, p. 881-888, 2010.

SHAINHEIT, et al. Dendritic cell IL-23 and IL-1 production in response to schistosome eggs induces IL-17 cells in mouse strain prone to sever immunopathology. **Journal of Immunology**, v. 181, n. 11, p. 85659-8567, 2008.

SILVEIRA, A.M. et al. Humans schistosomiasis mansoni: Intensity of infection differentially effectors the production of interleukin -10 interferon- gamma and interleukin -13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures, **Transaction of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 9, p. 514-519, 2004.

SINGER-VERMES, L.M.; CALDEIRA, C.B.; BURGER, E.; CALICH, V.L.G. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 94, p.75-79, 1993.

SKINKANAI- YASUDA, M. A. et al. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p. 297-310, 2006.

STEINMANN, P. et al. J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta- analysis, and estimate of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, v.6, n.7, p. 411-25, 2006.

SUGIMOTO, R. et al. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in culture L119 human hepatic stellate cells. **Liver International**, v. 25, n. 2, p. 420- 428, 2005.

TABORDA, C. P. et al. Melanin as a virulence factor of *Paracoccidioides brasiliensis* and other dimorphic pathogenic fungi. **Mycopathologia**, v. 165, n. 4-5, p. 331-339, 2008.

TALLIMAN, H. et al. Transforming growth factor –beta and Th-17 responses in resistance to primary murine schistosomiasis mansoni. **Cytokine**, v. 48, n. 3, p.239-245. 2009.

TRAVASSOS, L.R.; PUCCIA, R.; CISALPINO, P., TABORDA, G. RODRIGUES, G.E., RODRIGUES, M.; SILVEIRA, J. F.; ALMEIDA, I.C. Biochemistry and molecular biology of the main diagnostic antigen of *Paracoccidoides brasiliensis*. **Archives Medical Research**, v. 26, p. 297-304, 1995.

VELLA, A.T.; PEARCE, E.J. CD4+ th2 response induce by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. **Journal of Immunology**, v. 148, n. 7, p. 2283-2290, 1992.

VELUPILLAI, P. et al. Lewis(x) - containing oligosaccharide attenuates schistosome egg antigen- induce immune depression in human schistosomiasis. **Human Immunology**, v. 62, n. 3, p. 225-232, 2000.

VELUPILLAI, P.; HARMA, D.A. Oligosaccharide- specific induction of interleukin 10 production by B 220+ cells from schistosome- infected mice: A mechanism for regulation of cd4+ t cell subsets. **Proceedings of National Academic of Sciences**, v. 91, n. 1, p. 18-22, 1994.

VERLI, F. D. et al. Perfil clinic-epidemiológico dos pacientes portadores da paracoccidiodomicose no Serviço do Hospital São Lucas da Pontificia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v 38, n. 3, p. 234-237, 2005.

VICENTINI, A. P.; GESZTESI, J.L.; FRANCO, F. M.; SOUZA, W de; MORAES, J. Z. de; TRAVASSOS, R. T.; LOPES, J. D. Binding of *Paracoccidoides brasiliensis* to laminina though surface glycoprotein gp43 leads to enhancement of fungal pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 62, p.1455-1459, 1994.

WANKE, B., and LONDERO, A.T. Epidemiology and paracoccidiodomycosis infection. In: **Paracoccidiodomycosis**, M.F. Franco; C.S. Lacaz, A.Restrepo, G. Del Negro, (eds.). CRC Press. Boca Raton, Fla 1994. p. 109-120.

WARREN, K.S.; DOMINGO, E.O. *Schistosoma mansoni*: stage specificity granuloma formation around eggs after exposure to irradiated cercaria, unisexual infections or dead worm. **Experimental Parasitology**, v. 27, n. 1, p. 60-66, 1970.

WHO- **World Health Organization**. Disponível em: [http:// www.who.int/chistosomiasis/in](http://www.who.int/chistosomiasis/in) .
Acesso: 15 jan, 2012

WHYNN, T.A.; CHEEVER, A.W. Cytokine of regulation of granuloma formation in schistosomiasis, **Current Opinion in Immunology**, v. 7, n. 4, p. 505-511, 1995.

WILSON, S. M. et al. Immunopathology of Schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 148-154, 2007.

WYNN, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. **The Journal of Pathology**, v. 214, n. 2, p. 199-210, 2008.

WYNN, T.A.; CHEEVER, A.W., Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, n. 4, p. 505-511, 1995.

WYNN, T.A.; CHEEVER, A.W., WILLIAMS, M.C.; HEENY, S.; CASPAR, P.; KUHN, R.; SHER, A. IL10 regulates liver pathology in acute murine schistosomiasis but not required for immune down modulation of chronic disease. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 4473-4480, 1998.

ZACCONNE, P. et al. *Schistosoma mansoni* antigens modulate the activity of innate immune response and prevent onset of type 1 diabetes. **European Journal Immunology**, v. 33, n. 5, p. 1439-1449, 2003.

ZACCONNE, P. et al. Immune modulation by *Schistosoma mansoni* antigens in NOD mice: Effects on both innate and adaptive immune systems. **Journal Biomedicine and Biotechnology**, v.2010, article ID. 795210. [Http://dx.doi.org/10.1155/2010/795210](http://dx.doi.org/10.1155/2010/795210)

ZACCONNE, P.; FEHERVARI, Z; PHILLIPS, J.; COOKE, A. Parasitic worms and inflammatory diseases. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 10, p. 515-523, 2006.

ZACCONNE, P. The *S. mansoni* glycoprotein ω -1 induces Foxp3 expression in NOD mouse CD4⁺ T cells. **European Journal Immunology**, v. 41 p. 2709-2718, 2011.

4 MANUSCRITO 1

Circulating antibodies and cytokine levels in human chronic schistosomiasis associated with positive serology to fungus *Paracoccidioides brasiliensis*

Maria Claudia Noronha Dutra Menezes¹, Mari Sumigawa Kaminami¹, Paula César Leonello Alvares e Silva¹, Luciene Airy Nagashima¹, Nilson de Jesus Carlos¹, Francisco José de Abreu Oliveira¹, Simone Cristina Castanho Sabaini de Melo² and Eiko Nakagawa Itano¹.

¹Department of Pathology Science, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil, and ²Department Nursing, State University of North Paraná, UENP, Bandeirantes, PR, Brazil.

Corresponding author: Maria Claudia Noronha Dutra Menezes (dutramen@uel.br) or Eiko Nakagawa Itano (itano@uel.br). Departamento de Ciências Patológicas, CCB. Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário. 86051-970 Londrina, PR, Brazil. E-mail: Tel/Fax: +55 43-3371-4267

ABSTRACT

Schistosomiasis continues to be a significant cause of parasitic morbidity and mortality worldwide. As a disease caused predominantly by the host's immune response, the study of the factors that modulate this response, including co-infections with others agents, has become important. Considering the lack of data in the literature regarding the association between schistosomiasis (*Schistosoma mansoni*) and the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, two important agents of public health considered endemic in Brazil, this study investigated the immune response in patients infected by both agents. Positive serology to a specific *P. brasiliensis* antigen (gp43) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the sera of a subset of schistosomiasis patients (n=15/100) diagnosed by Kato-Katz technique. Serum anti-*S. mansoni* soluble egg antigen (SEA) and anti-adult worm antigen (SWAP) IgE, anti-SEA IgG and the IL-4, IL-10, IL-13, IL-17, IL-12 and IFN- γ serum levels were measured by ELISA in both this subset (Sm/Pb, n=15) and as controls groups: patients infected with *Schistosoma mansoni* alone (Sm, n = 9) and healthy controls (NHS, n=9). The results showed higher serum levels of anti- *S. mansoni* antigens (SEA and SWAP) IgE and IL-13 in both patient groups than NHS (p < 0.05), but not within the infected groups. Significantly higher IL-4 levels were observed in the Sm group compared to the other groups (p < 0.05), and no difference in the IL-12 and IL-17 levels was observed between the groups

($p > 0.05$). The IFN- γ and IL-10 levels were significantly higher in SmPb than the Sm and NHS groups ($p < 0.01$, $p < 0.05$). This study reports for the first time the association of schistosomiasis cases with a pathogenic fungus *P. brasiliensis* and concludes that concomitant infection appears not to modulate the specific humoral immune response for *S. mansoni* but instead suggest the induction of cytokine modulation.

KEYWORDS: Paracoccidioidomycosis infection, IgG, IgE, cytokines, *S. mansoni*.

INTRODUCTION

Schistosomiasis is the second most important parasitic disease after malaria: it affects 200 million people throughout the world and remains a major public health problem in tropical and subtropical areas [1], [2]. Host immune responses are critical for the control of both infection and pathology [3], and, in Brazil, the most common cause of the liver and intestinal pathology of schistosomiasis results from an immune response against the *Schistosoma mansoni* eggs trapped in the host tissues [4]. Indeed, the degree of morbidity appears to be influenced to a large extent by the nature of the induced immune response and its effects on the eggs trapped in the host tissues and the pathologies associated in these target organs. Granuloma formation and fibrosis are the major causes of morbidity and mortality [5].

The early phase of infection is characterized by Th1 immune responses, progressing to a Th2 response. The Th2 response is driven by schistosome egg antigens, trigger basophils to release IL-4, a potential key factor in Th2 biasing [6], [7], [8], resulting in the subsequent production of IL-13 and additional IL-4. According to Morais et al. [9], the production and regulation of Th1 and Th2 cytokines appears to change during the different clinical stages of human schistosomiasis. The Th1 cytokine INF- γ is associated with an early infection and the hepatosplenic form of the disease, whereas IL-4 is associated with the chronic phase, particularly the hepatointestinal form. Other factors, such as the presence of other infectious agents, can also modulate the cytokine or immune response in schistosomiasis. Co-infection with *S. mansoni* and Hepatitis C Virus (HCV) or Hepatitis B Virus (HBV), for example, is associated with an accelerated progression and increased severity of chronic liver fibrosis [10].

Immunomodulation resulting in protection or increased disease severity has been demonstrated in several cases of polyparasitism, including human schistosomiasis co-infection and in animal experimental co-infection models associated with viruses [11], bacteria [12] or protozoa [13], [14]. However, there are no data in the literature on the association between schistosomiasis and fungal infections.

Paracoccidioidomycosis (PCM) is one of the most important systemic mycoses in Latin America, and it is particularly prevalent in Brazil. The causal agent is *Paracoccidioides brasiliensis*, a thermally dimorphic fungus [15], [16]. The disease is thought to be acquired when airborne propagules produced by the saprobic phase of *P. brasiliensis* are inhaled into the host's lungs where they convert to the yeast form [17]. These propagules persist in

quiescent foci for decades, as has been observed in imported cases [18], or progress to hematogenic or lymphatic dissemination to the liver, spleen, skin and mucosa [19]. The acute (AF) and chronic (CF) forms of the disease are distinguishable. The AF is rare and more severe and is characterized by a rapid course and by the involvement of the reticuloendothelial system, causing lymph node enlargement and hepatosplenomegaly. The CF occurs more frequently in adult males involved with agricultural work [15], [20] and may develop into multiple disease forms, ranging from benign and localized (unifocal) to severe and disseminated (multifocal). The Th1 immune response is considered the most important mechanism for host defense in PCM [21, 22], whereas the Th2 response is considered important for host defense in schistosomiasis [23].

Given the potential for co-infection of *S. mansoni* and *P. brasiliensis*, mainly due to their shared chronicity and association with rural activities, this study investigated both the reactivity of serum samples from chronic human schistosomiasis patients to *P. brasiliensis* antigens and the antibody titers and cytokine serum levels in those patients presenting reactivity to this fungus.

MATERIALS AND METHODS

Serum samples

Chronic schistosomiasis patients (n=100) were selected from the endemic area of Bandeirantes, a town in the north of Paraná State, Brazil, and were participants in a Schistosomiasis mansoni control program, maintained by Municipal Health. *S. mansoni* infection was detected using the method of Kato-Katz [24, 25]. The mean age was 27 years old (ranging from 3 to 58 years), and the mean infection intensity was 230 eggs per gram of stool (ranging from 24 to 4080 eggs per gram). The serum samples were collected before treatment. After the PCM serology analysis, 15 samples were placed into the SmPb group (mean age 28.6 ± 3.54 , 33.3% female and 60% male), and 9 samples that were positive for schistosomiasis alone were placed in the Sm group (mean age 26.3 ± 3.13 , 22% female and 77.8% male). Healthy donors (n=9), termed NHS (mean age 28.5 ± 3.11 , 33.4% female and 64.3% male), were used as the controls. Only individuals with stool tests that were negative using Faust, Lutz and Kato-Katz techniques were included in the NHS group. Written

informed consent was obtained from all adult participants or from the guardian (father or mother) of minor participants involved in this study. This study was approved by Londrina State University Committee of Ethics in Research Involving Humans (N° 099/10) and Registered on the National Research Ethics, Brazil (CONEP N° 268).

PCM serology using ELISA and Immunodiffusion

For the ELISA, immunoplates were coated with *P. brasiliensis* exoantigen (exoAg) (14 µg/ml) or gp43 (7.5 µg/ml) (kindly provided by Dr. Zoilo Pires de Camargo from São Paulo Federal University) and incubated with serum samples (1/100, 1/200, 1/400 and 1/800) at 37 °C for 2 h. The threshold was previously determined by titration of positive and negative serum samples. The plates were then incubated with goat anti-human IgG conjugated to peroxidase (A-8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted at 1:4000 for 90 min at 37°C, followed by ortho- phenylenediamine (OPD) solution addition. The reaction was stopped with H₂SO₄ and the absorbance was measured at 492 nm in a Multiskan Ex reader (Labsystems, Helsinki, Finland). For the immunodiffusion (ID), glass slides (2.5 x 7.5 cm) were covered with a 3.0 mm thick layer of 1% agar according to Camargo et al. (1988) [26] with seven wells (one central and six peripheral). The *P. brasiliensis* exoAg antigen was applied to the central well, and each ELISA-positive sample at dilutions of 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 and 1:32 was applied in duplicate to the peripheral wells. The samples were incubated in a humid chamber at room temperature for 24 h, and the gel was washed, dried, and stained with amido black.

Schistosoma soluble egg antigen (SEA) and Schistosoma soluble adult worm antigen preparation (SWAP)

The antigens SEA and SWAP were prepared with phosphate-buffered saline, according to Hirsch et al. 1997 [27, 28] and Hirsch & Goes, 1996 [29]. These antigens were kindly provided by Dr. Alfredo Miranda Goes from Minas-Gerais Federal University.

ELISA for anti-SEA and anti-SWAP immunoglobulin E (IgE)

Immunoplates were sensitized with SEA or SWAP at 10 µg/ml and incubated with serum samples (diluted 1:20) previously adsorbed onto Sepharose-protein A (v/v) for 2 h at 37°C. The plates were incubated for 90 min at 37°C with 30 µg/ml goat anti-human IgE (I-6284 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) and then with donkey anti-sheep IgG (A-3415 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted 1:2000 for 90 min at 37°C. The absorbance was measured at 492 nm, as previously described.

ELISA for anti-SEA immunoglobulin G (IgG)

Immunoplates were coated with SEA (10 µg/ml) and incubated with serum samples diluted 1:200 for 2 h at 37°C. This was followed with a goat anti-human IgG peroxidase conjugate (A-8775 Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) diluted to 1:4000 for 90 min at 37°C, and the absorbance was measured at 492 nm, as previously described.

Cytokine Assays

The serum IFN- γ , IL-10, IL-13 (Bioscience, Inc., San Diego, CA, USA), IL-4, IL-12 and IL-17 (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) levels were determined using commercial ELISA kits, according to the manufacturer's instructions. The absorbance was measured with an ELISA microplate reader (iMark™ Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) at 450 nm, and the absolute cytokine levels were calculated based on a standard curve provided by the manufacturer.

Statistical analysis

The data are expressed as the mean \pm SEM, unless otherwise described. An ANOVA analysis of variance was applied, and the Turkey multiple comparison analysis was used for nonparametric tests to compare the cytokine levels among the different groups. Differences at $p < 0.05$ were considered significant. To detect outliers, a Grubbs test was used with Graph Pad QuickCals. The analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Paracoccidioidomycosis serology analysis by ELISA and Immunodiffusion

The serum samples from the patients with chronic schistosomiasis ($n = 100$) were analyzed by ELISA for exoAg, resulting in a prevalence of 18% ($> 1/200$). These 18 positive samples were analyzed for gp43 and 15 (15%) ($>1/200$) were confirmed to be positive for PCM (Table 1). All of the positive samples (ELISA for exoAg or gp43) were negative by an ID test (results not shown). The gp43-positive and ID-negative patients were placed in the SmPb group and considered PCM infected.

Anti-SEA and anti-SWAP IgE serum levels in the Sm, Sm/Pb and NHS groups

The serum anti-SEA (Fig. 1) and anti-SWAP (Fig. 2) IgE levels were evaluated by ELISA in the chronic schistosomiasis (Sm), schistosomiasis associated with PCM-infection (SmPb) and control healthy donor (NHS) three groups. The mean ELISA results (O.D. at 492 nm) showed high levels of anti-SEA (0.168 ± 0.018) and anti-SWAP (0.177 ± 0.015) IgE in the SmPb group compared to the NHS group (anti-SEA of 0.097 ± 0.003 and anti-SWAP of 0.913 ± 0.011) ($p < 0.05$) (Figs. 1, 2). Higher anti-SEA (0.215 ± 0.022) and anti-SWAP (0.198 ± 0.029) IgE levels were also observed in the Sm group compared to the NHS group (anti-SEA of 0.097 ± 0.010 and anti-SWAP of 0.913 ± 0.011) ($p < 0.05$) (Figs. 1, 2).

Anti-SEA IgG serum levels in the Sm, SmPb e NHS groups

Although the serum anti-SEA IgG levels from co-infected (SmPb) and mono-infected (Sm) patients were not different (SmPb, 0.263 ± 0.023 ; Sm, 0.245 ± 0.019) ($p > 0.05$), both groups showed significantly elevated serum IgG levels compared to the controls (NHS) (0.091 ± 0.011) $p < 0.01$ (Fig. 3).

Cytokine serum levels in the Sm, Sm/Pb and NHS groups

The serum IFN γ levels were significantly higher in the co-infected patients (SmPb) compared to the mono-infected (Sm) ($p > 0.01$) and normal (NHS) ($p > 0.05$) subjects. There were no significant differences in the IL-13 levels between the co-infected and mono-infected groups, but both were higher than the control group. In contrast, the SmPb co-infected patients showed significantly increased IL-10 levels compared to Sm ($p < 0.01$) and NHS ($p < 0.05$) (Fig. 4).

DISCUSSION

In this study, we examined schistosomiasis patients with no clinical manifestation of PCM but who had a positive serological reaction to the main *P. brasiliensis* antigen gp43 [30] by ELISA and who were considered PCM infected. As detected using paraccocidioidin skin tests, epidemiological studies have revealed that exposure that results in transient subclinical PCM- infection is high in adult populations, mainly in rural areas [31], [32], [33]. PCM has also been investigated by in vitro assays, a less invasive method and in epidemiological studies in humans [34] and animals [35], the results of the latter have been accepted as PCM infection in animals [36].

Unlike PCM-infected patients that exhibit clinical symptoms, non-symptomatic PCM infection is negative for the ID test [37]; all of the ELISA-positive patients in the present study were also negative for the ID test.

All of the patients in this study were from an area endemic for schistosomiasis (Bandeirantes, PR, Brazil), and one of the main activities of the population of this region is agriculture, a significant risk factor for PCM [36]. The manifestation of PCM disease occurs frequently only after a long period of incubation: in general, in adults over 40 years old [17]. Therefore, the higher age than the population of this study, reinforcing again them as cases of PCM-infection.

The specific humoral immune response was investigated in the group of patients co-infected with *S. mansoni* and *P. brasiliensis*, and higher anti-SEA and anti-SWAP IgG and IgE titers were found compared to the healthy normal controls. However, there was no

significant difference between the co-infected (Sm/Pb) and mono-infected (Sm) groups. These results suggest that co-infection with *P. brasiliensis* in schistosomiasis patients does not affect the specific humoral immune response at least with regard to these two investigated antigens.

As all of the patients had positive Kato-Katz test results, the presence of anti-SEA or anti-SWAP IgE or IgG was expected and is in accordance with previously published results [38]. In animal models and in humans, elevated IgE concentrations, including IgE specific for schistosomes, and blood and tissue eosinophilia are hallmarks of schistosomiasis [39]. Yet, Bonnard et al. [40] stratified into three different stages of pathology according to ultrasonographic, endoscopic, and clinical parameters and detected higher IgE levels in stage 3 (severe form) compared to stage 1 (no detectable pathology) patients. Although we did not stratify the patients by disease severity, it is likely they do not belong to stage 1, as described by Bonnard et al. [40], as higher serum IgE levels were detected in both the co-infected and mono-infected groups.

Higher IL-4 levels were detected in the mono-infected (Sm) patients compared to both the co-infected (SmPb) and NHS groups. This cytokine is related to the development of a Th2 immune response, is commonly observed in cases of schistosomiasis or other helminthiasis and is considered important for the generation of the antibody isotypes necessary for defense in schistosomiasis, including IgE [41].

In PCM infection without symptoms or signs of the disease, high IFN- γ and low IL-4 levels, a Th1 response pattern, has been observed using in vitro lymphoproliferation response assay to *P. brasiliensis* antigens [22].

In the present study, the co-infected patients (SmPb) had higher serum IFN- γ levels than the mono-infected (Sm) patients, suggesting that the co-infection with *P. brasiliensis* can induce the modulation of cytokines and that this modulation is in accordance with the Th1 response pattern observed in PCM- infection [22].

In human schistosomiasis, IFN- γ is associated with early infection and plays a role in severe liver pathology [9], [39], [40].

According to Maizels et al, [42], the uncontrolled inflammatory responses in human schistosomiasis, which are often characterized by a Th1 response in peripheral blood, are associated with hepatosplenic disease. Our IFN- γ results suggest that co-infection with *P. brasiliensis* could favor the development of *S. mansoni* morbidity, however, increased IL-10

levels, an anti-inflammatory cytokine, were detected in this group as well. IL-10 could be involved in down-modulating the effect of IFN- γ , which has been observed in *S. haematobium* and *Plasmodium falciparum* co-infections [43]. IL-12, another Th1 cytokine, was found in similar levels in all of the groups, suggesting that not all Th1 cytokines are modulated.

In this study, lower IL-13 circulating levels were detected in the SmPb group compared to the mono-infected group. Based on previously published results, IL-13 is a cytokine that is strongly correlated with fibrosis both in humans [44], [40] and in murine schistosome infection [45], [46]. Whether the degree of fibrosis is smaller in SmPb patients with a concomitant infection requires further study.

IL-17, a cytokine produced by Th17 cells, is important for anti-fungal immune responses [47] and is associated with severe immunopathology in experimental murine schistosomiasis [48]. In this study, however, no change in the systemic level of this cytokine was observed in the co-infected group compared to the controls.

This study reports for the first time schistosomiasis cases associated with a pathogenic fungus and concludes that concomitant schistosomiasis and PCM infection appears not to modulate the specific humoral immune response for *S. mansoni* but does suggest cytokine modulation. Future studies should investigate other cytokines and regulatory lymphocytes in *P. brasiliensis*-co-infected schistosomiasis disease.

References

1. Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L (2002) The global epidemiology situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop* 82: 139-146.
2. Steinman P, Keiser J, Tanner M, Utzinger J (2006) Schistosomiasis and water resources development: systematic review meta-analysis and estimates of people risk. *Lancet Infect Dis* 2006; 6: 411-425.
3. Capron A (1998) Schistosomiasis—forty years war on the worm. *Parasitol Today* 14: 379-384.
4. Pearce EJ, MacDonald AS (2002) The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2: 499-510.
5. Henri S, Chevillard C, Mergani A, Paris P, Gaudart J, et al. (2002) Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- γ is associated with protection against fibrosis and TNF- α with aggravation of disease. *J Immunol* 169: 929-936.
6. Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Harn DA Jr (2001) Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J Immunol* 167: 442-450.
7. Schramm G, Falcone FH, Gronow A, Haisch K, Mamat U, et al.(2003) Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. *J Biol Chem* 278: 18384-18392.
8. Wuhrer M, Balog CI, Catalina MI, Jones FM, Schramm G, et al. (2006) IPSE/ α -1, a major secretory glycoprotein antigen from schistosome eggs, expresses the Lewis X motif on core-difucosylated N-glycans. *FEBS* 273: 2276-2292.
9. Morais CNL, Souza JR, Melo WG, Aroucha ML, Miranda P, et al.(2008) Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103: 561-568.
10. Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK, et al. (2009) Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol* 31: 163–176.

11. Edwards MJ, Buchatska O, Ashton M, Montoya M, Bickle QD, et al. (2005) Reciprocal immunomodulation in a schistosome and hepatotropic virus coinfection model. *J Immunol* 175: 6275-6285.
12. Mikhail IA, Higashi GI, Mansour NS, Edman DC, Elwan SH (1981) *Salmonella paratyphi* A in hamsters concurrently infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 30: 385-393.
13. Hassan MF, Zhang Y, Engwerda CR, Kaye PM, Sharp H, et al. (2006) The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. *Am J Pathol* 169: 943-953.
14. Yoshida A, Maruyama H, Kumagai T, Amano T, Kobayashi F, et al. (2000) *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. *Int Immunol* 12: 1117-1125.
15. San-Blas G (1993) Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 31: 99-113.
16. Coutinho ZF, Silva D, Lazrea M, Petri V, Oliveira RM, et al. (2002) Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). *Cad Saúde Pública* 18: 1441-1454.
17. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A (1993) Paracoccidioidomycosis: an update. *Clin Microbiol Rev* 6: 89-117.
18. Manns BJ, Baylis BW, Urbanski SJ, Gibb AP, Rabin HR (1996) Paracoccidioidomycosis: case report and review. *Clin Infect Dis* 23: 1026-1032.
19. McEwen JG, Bedoya V, Patiño MM, Salazar ME, Restrepo A (1987) Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 25: 165-175.
20. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, et al (1987) Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 20: 129-132.
21. Musatti CC, Peraçoli MTS, Soares AMVC, Rezkallah-Iwasso MT (1994) Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: Franco M, Silva-Lacaz C, Restrepo-Moreno A, Del Negro G, editors. *Paracoccidioidomycosis*. Florida CRC Press. p. 175-186.

22. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti, CC, Papaiordanou MO, Blotta MHSL (2002) Cytokine and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidiodomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microbes Infect*4: 139-144.
23. Schramm G, Hass (2010) Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. *Microbes Infect* 12: 881-888.
24. Katz N, Chaia G (1968) Coprological diagnosis of schistosomiasis. I. Evaluation of quantitative techniques. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 10: 295-298.
25. Katz N, Pellegrino J, Memória JM (1966) Quantitative oogram method in *Cebus* monkeys experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 52: 917-919.
26. Camargo ZP, Unterkircher C, Campoy SP, Travassos LR (1988) Production of *Paracoccidoides brasiliensis* exoantigens for immunodiffusion testes. *J Clin Microbiol* 26: 2147-2151.
27. Hirsch C, Carvalho-Queiroz C, Franco GR, Pena SDJ, Simpson AJG, et al. (1997) Evidentiation of Paramyosin (Sm-97) as a Modulating Antigen on Granulomatous Hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* Eggs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 663-667.
28. Hirsch C, Zouain CS, Alves JB, Goes AM (1997) Induction of protective immunity and modulation of granulomatous hypersensitivity in mice using PIII, an anionic fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm. *Parasitology* 115: 21-28.
29. Hirsch C, Goes AM (1996) Characterization of fractionated *Schistosoma mansoni* soluble adult worm antigens that elicit human cell proliferation and granuloma formation in vitro. *Parasitology* 112: 529-535.
30. Mendes-Giannini MJ, Bueno JP, Shikanai-Yasuda MA, Ferreira AW, Masuda A (1998) Detection of the 43,000-molecular-weight glycoprotein in sera of patients with paracoccidiodomycosis. *J Clin Microbiol* 27: 2842-2845.
31. Fava SDC, Fava Netto C (1998) Epidemiologic surveys of histoplasmin and paracoccidiodin sensitivity in Brazil. *Rev Inst Med Trop* 40: 155-164.
32. Saraiva ECO, Altemani A, Franco MF, Unterkircher CS, Camargo ZP (1996) *Paracoccidoides brasiliensis*-gp43 used as paracoccidiodin. *J Med Vet Mycol* 34: 155-161.

33. Wanke B, Londero AT (1994) Epidemiology and paracoccidioidomycosis infection. In: Franco M, Silva-Lacaz C, Restrepo-Moreno A, Del-Negro G, editors. Paracoccidioidomycosis. Florida CRC Press. p. 109-120.
34. Botteon FA, Camargo ZP, Benard G, Coelho RF, Chamone DA, et al. (2002) *Paracoccidioides brasiliensis* - reactive antibodies in Brazilian donors. Med Mycol 40: 387-391.
35. Ono MA, Bracarense APFRL, Morais HAS, Trapp SM, Belitardo DR, et al. (2001) Canine paracoccidioidomycosis: a seroepidemiologic study. Med Mycol 39: 277-282.
36. Oliveira GG, Silveira LH, Itano EN, Soares RM, Freire RL, et al. (2010) Serological evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* infection in chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. Mycopathologia 171: 197-202.
37. Shikanai-Yasuda MA, Telles Filho FQ, Mendes RP, Colombo AL, Moretti ML, et al. (2006) Guidelines in paracoccidioidomycosis. Rev Bras Med Trop 39: 297-310.
38. Viana IR, Correa-Oliveira R, Carvalho Odos S, Massara CL, Colosimo E, et al. (1995) Comparison of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* antigens by infected and putative resistant individuals living in an endemic area. Parasite Immunol 17: 297-304.
39. Capron M, Capron A (1994) Immunoglobulin E and effector cells in schistosomiasis. Science 264: 1876-1877.
40. Bonnard P, Remoue F, Schacht A, Deuffic-Burban S, Dompnier J, et al. (2004) Specific isotype immune response in the diagnosis of human schistosomiasis pathology? Am J Trop Med Hyg 71: 202-205.
41. Zhang P, Mutapi F (2006) IgE a Key Antibody in *Schistosoma* Infection: eJBIO, 2: 11-14.
42. Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Oliveira RC, et al. (2008) Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. Acta Trop 108: 109-117.
42. Maizels RM, Yazdanbakhsh M (2003) Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. Nat Rev Immunol 3: 733-744.

43. Diallo TO, Remoue F, Schacht AM, Charrier N, Dompnier JP, et al. (2004) Schistosomiasis co-infection in humans influences inflammatory markers in uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria. *Parasite Immunol* 26: 365-369.
44. De Jesus AR, Magalhães A, Miranda DG, Miranda RG, Araújo MI, et al. (2004) Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun* 72: 3391-3397.
45. Chiaramonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA (1999) An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest* 104: 777-785.
46. Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, McKenzie AN (2000) Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J Immunol* 164: 2585-2591.
47. Curtis MM, Way SS (2009) Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology* 126(2): 177-185.
48. Rutitzk LI, Stadecker MG (2011) Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ . *Eur J Immunol* 41(9): 2677-2687

Table 1. Percentage of PCM positive serology in patients with chronic schistosomiasis.

Assay/Antigen	Positive Samples	
	N°	%
ELISA/exoAg	18	18
ELISA/gp43	15	15
ID/exoAg	0	0

Schistosomiasis patient serum samples (n = 100), as diagnosed by the Kato-Katz test, were analyzed by ELISA and an immunodiffusion test (ID). Plates coated with *P. brasiliensis* exoantigens (exoAg) or with specific *P. brasiliensis* gp43 antigen were incubated with serum, anti-human IgG-peroxidase, and OPD solution; and the absorbance was measured at 492 nm. The results were considered positive when over the cut-off value (1/200). An ID test was performed using *P. brasiliensis* exoantigens (exoAg).

Table 2. Mean serum IL-4, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, and INF- γ cytokine levels detected in the co-infected (SmPb), mono-infected (Sm) patients groups and control NHS.

Cytokine	Group mean and SEM		
	Sm/Pb	Sm	NHS
IL-4	18.452 \pm 6.789	50.266 \pm 11.007*	12.973 \pm 8.057
IL-10	11.616 \pm 1.323***	8.481 \pm 0.584**	4.187 \pm 0.441
IL-12	7.081 \pm 1.694	5.074 \pm 0.952	5.279 \pm 1.717
IL-13	7.072 \pm 1.694 *	10.695 \pm 2.421 **	0.868 \pm 0.725
IL-17	9.245 \pm 2.220	9.440 \pm 3.191	11.114 \pm 3.417
INF- γ	41.77 \pm 7.30*	4.756 \pm 4.015	9.826 \pm 6.430

The results are expressed as the mean and SEM of the cytokines levels in pg/ml in the sera from the co-infected (Sm/Pb) and infected only with Sm (Sm) patients groups and the healthy control group (NHS). Significance levels of the comparison for all of the groups, * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$.

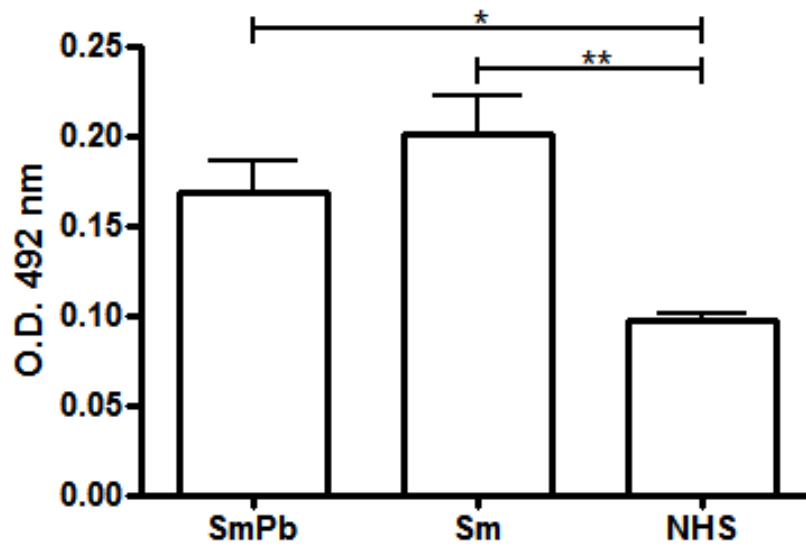
Figure 1

Figure 1. Serum anti-SEA IgE levels. The levels of serum anti-SEA IgE were determined by ELISA in the following groups: co-infected (SmPb n=15), mono-infected (Sm n=9), and healthy controls (NHS n=9). The results are expressed as the means and variances in the optical density (O.D.) at 492 nm. *p < 0.05, **p < 0.01

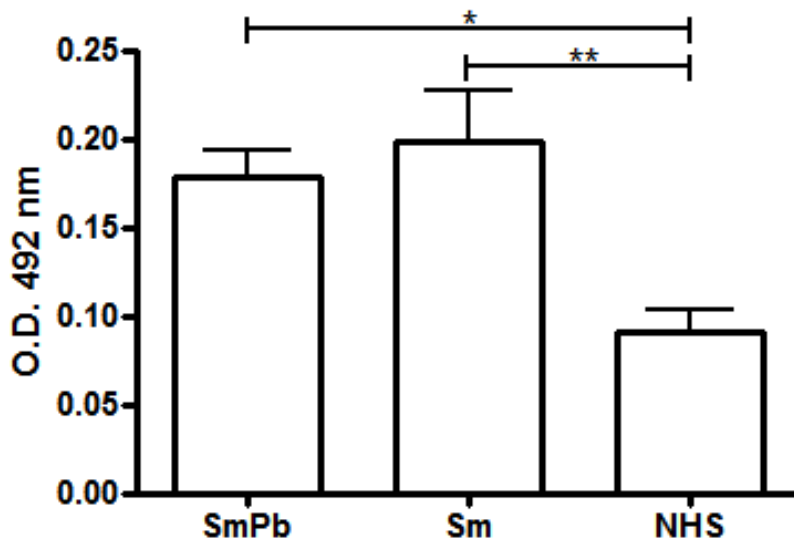
Figure 2

Figure 2. Serum anti-SWAP IgE levels. The levels of serum anti-SWAP IgE were determined by ELISA in the following groups: co-infected (SmPb n=15), mono-infected (Sm n=9), and healthy controls (NHS n=15). The results are expressed as the means and variances in the optical density (O.D.) at 492 nm. *p < 0.05, **p < 0.01

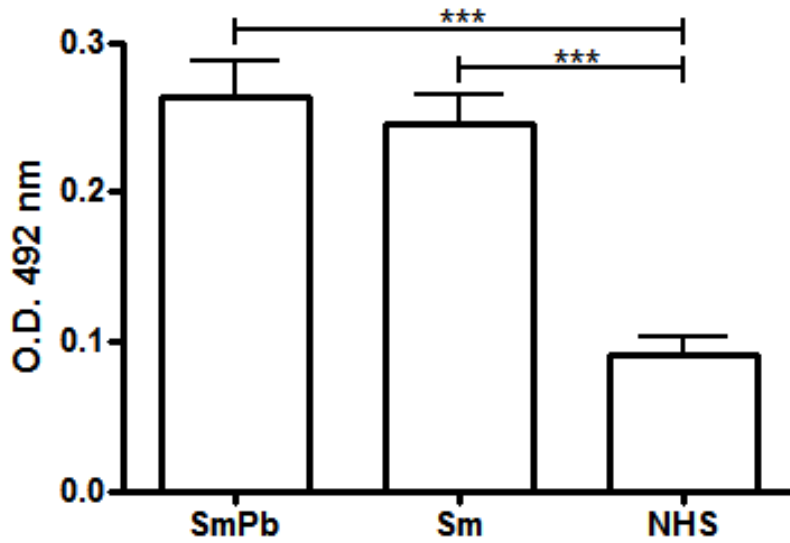
Figure 3

Figure 3. Serum anti-SEA IgG levels. The levels of serum anti-SEA IgG were determined by ELISA in the following groups: co-infected (SmPb n=15), mono-infected (Sm n=9), and healthy controls (NHS n=15). The results are expressed as the means and variances in the optical density (O.D.) at 492 nm. ***p < 0.0001

Figure 4

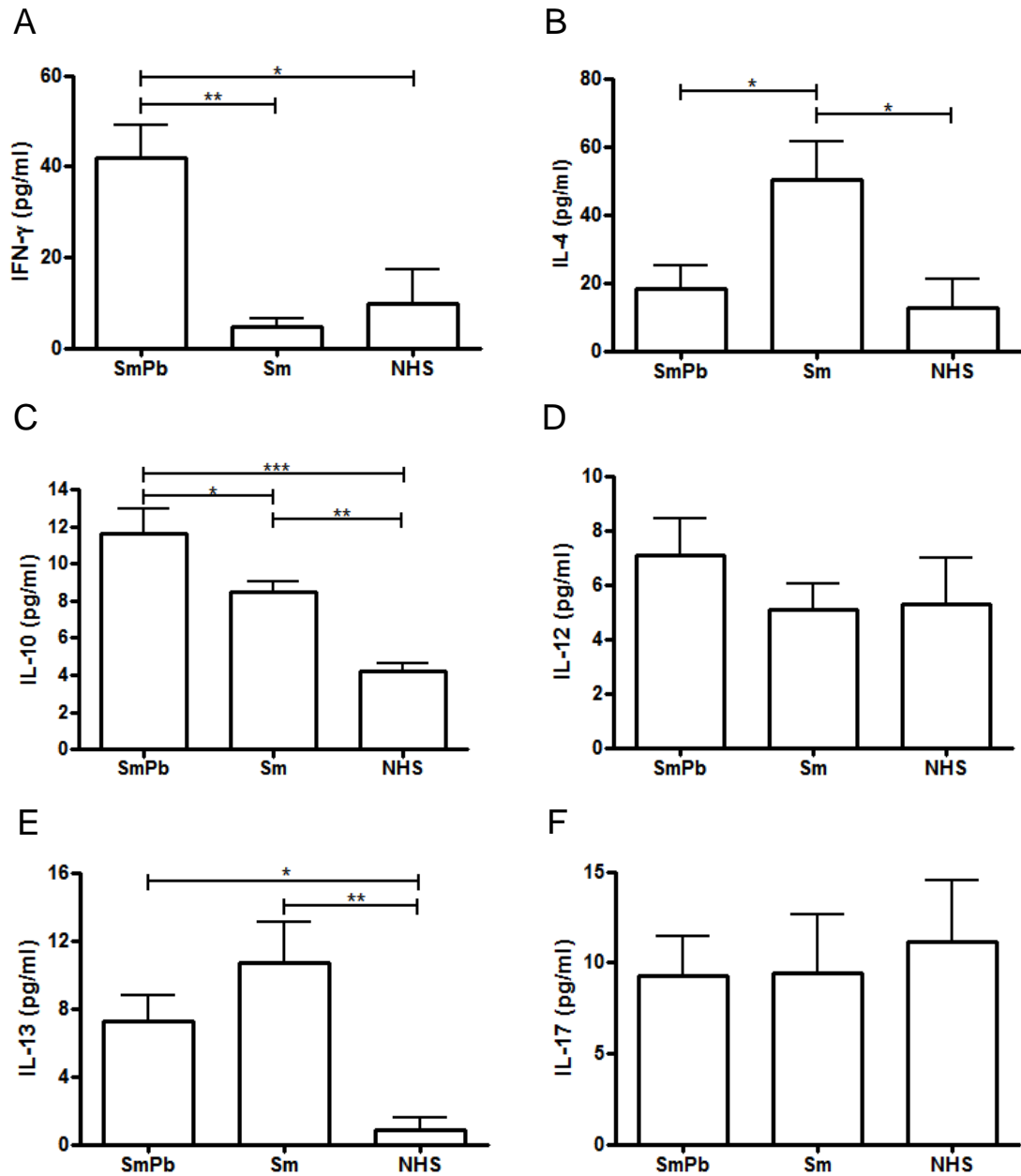


Figure 4. Cytokine profile in sera. The serum IFN- γ (A), IL-4 (B), IL-10 (C), IL-12 (D), IL-13 (E) and IL-17 (F) levels of the following groups were analyzed by ELISA and expressed in pg/ml: co-infected (SmPb), mono-infected (Sm) and healthy controls (NHS). The outliers were removed. *p < 0.05, **p < 0.01

5 MANUSCRITO 2

Granulomas and cytokines modulations in *Schistosoma mansoni* and *Paracoccidioides brasiliensis* co- infected mice

Maria Claudia Noronha Dutra Menezes*, Francisco José de Abreu*, Marina O. Kishima, Tania Longo Mazzuco#, Jefferson Crespigio#, Paula Leonello Álvares e Silva*, Eiko Nakagawa Itano*

*Department of Pathology Science, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.

Health Sciences Post-graduate program,

Correspondence to: Maria Claudia Noronha Dutra de Menezes (dutramen@uel.br) or Eiko Nakagawa Itano (itano@uel.br). Departamento de Ciências Patológicas, CCB. Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário. 86051-970 Londrina, PR, Brazil. E-mail: Tel/Fax: +55 43-3371-4267

Abstract

The helminth *Schistosoma mansoni* (Sm) and fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) are two important pathogens that cause chronic granulomatous disease, both endemic in Brazil. They are the agents of schistosomiasis mansoni and paracoccidioidomycosis (PCM) that have the Th2 and Th1 immune response as the main defense, respectively. In order to investigate the immunopathological impact in co-infection by these two agents it was used BALBc mice simultaneously infected with both or *P. brasiliensis* as secondary infection. It was used groups of mice: a) infected with *S. mansoni* and *P. brasiliensis* during 70 days (Sm70Pb70); b) infected first with *S. mansoni* and 28 days before the final period with *P. brasiliensis* (Sm70Pb28) and as controls *S. mansoni* alone for 70 days (Sm70) or *P. brasiliensis* alone for 70 (Pb70) or for 28 (Pb28) days. The liver histopathology and liver cytokines (IL-4, IL-10, IL-13 and IFN- γ) or serum cytokines (IL-4 and IFN- γ) levels were

performed in all groups. The co-infection resulted in a marked decreased *S. mansoni* and increased *P. brasiliensis* granulomas numbers compared to controls ($p < 0.05$). Increased liver IL-4 or IL-13 (Sm70Pb28 > Sm70Pb70) and IL-10 (Sm70Pb28) levels and increased serum IFN- γ level than control Sm70 were observed. In relation to Pb28 or Pb70 controls groups decreased liver IL-4, IL-10 and INF- γ (Sm70Pb70) and decreased INF- γ and increased IL-4 (Sm70Pb70) serum levels were observed. Additionally, it was detected presence of the *S. mansoni* and *P. brasiliensis* in other organs (lung, spleen and brain) in the co-infected group by histopathology analysis. In conclusion, our data show for the first time that co-infection with *S. mansoni* and *P. brasiliensis*, induce liver granulomas and cytokines modulations to each other and possible induction the severity of both diseases in experimental BALB/c mice.

Keywords: Immunomodulation, schistosomiasis, paracoccidioidomycosis, cytokines.

Introduction

Schistosomiasis is one of the major infectious diseases affecting developing countries. In Brazil, it is caused by *S. mansoni* and about 25 million persons live in the area of risk. Infection is acquired by exposure to water containing helminth cercariae. The parasite enters the host through the skin and locates at the mesenteric veins, where worm pairs deposit about 300 eggs per couple per day. The eggs may cross into the lumen of the intestine to exit the host, or they may be carried by the circulatory system via the portal vein into the liver [1][2]. Liver and intestinal pathology results from the immune response against eggs trapped in host tissues [3].

During the first weeks of mouse infection, a more Th1-like immune response is observed. After 5-6 weeks with the onset of eggs deposition, however a pronounced Th2 immune response comes up being characterized by high production of cytokines IL-4, IL-13 and IgE synthesis. In chronic infection (12 weeks) there is a modulation of the immune response leading to a decrease of Th2 response and decrease in the size of the new formed granulomas [4][2].

In humans, the chronic schistosomal disease affects mainly individuals with long-standing infections in rural areas [1] and paracoccidioidomycosis (PCM), caused by fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, one of the most important systemic mycoses in Latin America [5] is also associated with the poor rural areas [6][7]. The disease is thought to be acquired when airborne propagules produced by *P. brasiliensis* saprobic phase are inhaled into the host's lungs, where they convert to the yeast form. The infection can cause overt disease involving many body sites [8].

According to Restrepo [9], about 10 million people are infected with *P. brasiliensis* and 2% of them may develop the disease. There are two forms of the disease: the acute form (AF) and the chronic form (CF). The CF is more frequent in men older than 40 years, with multiple forms, ranging from benign and localized (unifocal) to severe and disseminated (multifocal) disease [10].

Resistance to *P. brasiliensis* infection is linked to Th1 pattern of immune response. Experimental infection with resistant and susceptible mice strains have reported the dissemination of the fungus associated with a pattern of Th2 cytokines. Resistant strains

produce a well-formed granuloma, whereas susceptible or suppressed T-cell animals appear to produce disorganised lesions, lacking the peripheral halo of small mononuclear cells with increased multiplication of fungus in the tissues [11][12][13] [14][15].

Both, the helminth *S. mansoni* and the fungus *P. brasiliensis* are pathogens that cause chronic granulomatous diseases, endemic mainly in rural areas in Brazil and there is no research on the impact of possible co-infection, once they present a Th2 and Th1 immune response as the main defense, respectively.

In this study it was investigated liver granulomas, liver cytokines (pro-inflammatory cytokines IFN- γ and the Th2-associated cytokines IL-4, IL-10 and IL-13), circulating cytokines (IFN- γ and IL-4) in BALBc mice co-infected by *S. mansoni* and *P. brasiliensis*.

Material and methods

Animals and parasites

Adult 6-8 weeks old BALB/c male mice (20 to 25g) fed "ad libitum" and held in the Animal Laboratory of Parasitology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina. *S. mansoni* (BH), kindly provided by Dr Ana Lucia Falavignha Guilherme. (State University of Maringá, PR, Brazil) was maintained in Swiss mice and *Biomphalaria glabrata* snails. For infection it was used cercariae from infected snails. *P. brasiliensis* virulent strain Pb18 (Pb18) was cultured in Sabouraud agar (Micromed, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), and maintained by sub-culturing at 35°C at 5-day intervals. For experimental infection, the yeast cells were collected in sterile saline, filtered through cotton and gauze layers and the concentration adjusted to 5×10^6 cells/ml.

Experimental infection

For concomitant infection, the animals were randomly divided into five groups with 5 animals each for experiment a) Sm70/Pb70 (infected with *S. mansoni* and *P. brasiliensis* during 70 days); b) Sm70Pb28 (infected with *S. mansoni* and six weeks later, mice were co-infected with *P. brasiliensis*). To determine the effect of co-infection, control groups were composed of mice infected only with *S. mansoni* by 70 days or with *P. brasiliensis* for 70 (Pb70) and 28

(Pb28) days. The animals were euthanized at 70 days, except the Pb28 group. The Ethics Committee for Animal Experimentation of our university approved all experimental protocols described in the present study.

Histopathology

The organs (liver, lung, heart), were removed, fixed in 10% paraformaldehyde solution and prepared by routine techniques of paraffin embedding. Histological 5 μ m sections were stained with haematoxylin/eosin (HE) or silver methenamine (Grocott) and the organs injury was evaluated by the presence of both fungus cells, eggs, and inflammatory cells within tissue granulomatous lesions. To assess the number of granuloma per mm², histological slides (n= 3 tissue sections for each animal) were evaluated under a microscope (objective 40X) for the counting of the granulomas, then they were photographed by a camera (Samsung SCC131B) attached to microscope Nikon E 100 and the area was calculated using the program Image J 1.44 (NIH USA).

Determination of stool egg load

The number of eggs per gram of feces was evaluated by quantitative copro-parasitological Kato and Katz assay [16], triple analyses.

Liver and serum cytokine Assays

The liver of each animal was aseptically removed, one portion was homogenized in sterile PBS, pH 7.4 (0.2 g of tissue/ml) and macerated. After centrifugation (600 g, 10 min), the supernatant from each sample (liver) and serum samples were submitted for cytokines analysis. Cytokines IL-4, IL-13 (eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA), IL-10 and IFN- γ (Invitrogen, Inc., Camarilo, CA, USA) levels were determined by commercial ELISA kits, according to the manufacturer's instructions. The absorbance was read into an ELISA microplate reader (iMarkTM Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) at 450 nm.

Statistical analysis

Data are expressed as a mean \pm SEM, unless otherwise described. ANOVA analyses of variance were applied. To compare level of cytokine in different groups, the Tukey multiple comparison analysis was used for nonparametric test. Differences with a $p < 0,05$ were considered significant. Analysis were performed using GraphPadPrisma 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Histopathology analysis

Histopathological liver analysis (stained with HE) shows a smaller number of *S. mansoni* eggs granulomas in both *S. mansoni* and *P. brasiliensis* co-infected mice than *S. mansoni* alone, $p < 0.05$. Therefore large number of *P. brasiliensis* granulomas in co-infected (Sm70Pb70) than control group (Pb70) was observed in the liver, $p < 0,05$ (Fig.4A-D). Grocott staining shows also a large number of *P. brasiliensis* yeast cells in the liver of Sm70Pb70 with budding (Fig. 7 A-B). It was also observed destruction of *P. brasiliensis* granuloma in close contact with *S. mansoni* eggs (C) and *P. brasiliensis* granuloma and *S. mansoni* worm contact (D) in co-infected mice (Sm70Pb70).

Histological tissues analysis (lung, spleen and brain) by HE staining showed the presence of *S. mansoni* in spleen in 60% of the animals from both Sm70Pb70 and Sm70Pb28 groups and in the lung in 60% from Sm70Pb28 group (Table 1). *P. brasiliensis* infection in the lung was considered intense in all animals from Sm70Pb70 and moderate in all Sm70Pb28 animals groups. *P. brasiliensis* was detected in the spleen and brain in 100% of animals from Sm70Pb70 and 20% (spleen) in the control groups animals (Sm70). (Table 2)

Stool egg load

No differences between the numbers of eggs per gram of feces were observed between the groups, $p > 0.05$ (Fig. 1C).

Cytokine levels

In both *S. mansoni* and *P. brasiliensis* co-infected mice resulted in a marked increased liver IL-4 and IL-13 levels than control mono infected (Sm70) ($p < 0.05$) and higher in Sm70Pb28 than Sm70Pb70 group ($p < 0.05$). Also in Sm70Pb28 group also resulted in an increased liver IL-10 level than control (Sm70) ($p < 0.05$) (Fig. 2) Serum IFN- γ levels were higher in both groups (Sm70Pb70, Sm70Pb28) than control mono infected (Sm70) ($p < 0.05$), but similar between the Sm70Pb70 and Sm70Pb28 groups ($p > 0.05$). (Fig. 3)

The opposite effect in PCM with significantly decreased IL-4, IL-10 and INF- γ (Sm70Pb70) levels in liver and decreased INF- γ and increased IL-4 (Sm70Pb70) serum levels in relation to control (Pb70 or Pb28) ($p < 0.05$) were observed (Figs. 5 A, B, C, D and Figs. 6 A, B). No difference was observed in liver IL-13 levels between the Sm70Pb70 and Sm70Pb28 in relation to controls (Pb70 or Pb28) groups, $p > 0.05$. (Fig. 5, 6)

DISCUSSION

The liver is one of the major tissues affected in schistosomiasis and our research focused mainly this organ as is associated to *P. brasiliensis* infections, both agents that induce the granulomas formation and are potentially overlapping diseases in Brazil. This association resulted in significantly decreased *S. mansoni* granuloma number in a concomitant infection started with both infections and maintained for 10 weeks (Sm70Pb70) or even less inhibition in *P. brasiliensis* as secondary infection (Sm70Pb28). The main organ affected in PCM is the lung, but the fungus can spread to various organs, including liver, depending on the immune response [17][18] and as expected both *S. mansoni* and fungi were detected in the liver and opposite to *S. mansoni* granuloma, higher number of *P. brasiliensis* granuloma was detected in the liver of concomitant infection (Sm70Pb70) in relation to fungi mono infected group.

In schistosomiasis or in PCM, CD4⁺ T helper lymphocytes are central in orchestrating the formation and growth of granulomas. Mouse schistosomiasis experimental model has demonstrated that the host mounts an initial pro-inflammatory Th1 type immune response, followed by anti-inflammatory Th2-type response, with reduced granuloma around eggs [19][20]. In this study it was observed an increase in IL-4 and IL-10 liver levels, the Th2 cytokines, in Sm70Pb28 when compared to *S. mansoni* mono infected group, but as not expected, it was not observed in Sm70Pb70 group that presented sharp decline in granulomas number. This reduction is possibly due to non-granuloma formation for new eggs produced by *S. mansoni*, considering signs of eggs degradation inside the granuloma, and also no statistically difference observed in granuloma size.

IL-10 regulates Th1/Th2 balance and is important for polarization a down modulation of *S. mansoni* eggs granulomatous response in chronic phase [1]. And also granuloma suppression has been described in the literature data by administration of exogenous IL-10 or by using the IL-10 gene knockout mice or injection of antibodies to IL-10 resulting in increased granuloma size [21][22][23][24][1].

The high level of IL-10 detected in the liver and no detection of reduction in the size of granuloma could be due to higher IL-4 liver levels detected in this co-infected group[25] demonstrates that IL-4 plays an important role in the egg-directed granulomatous response.

IL-4 promotes Th2 regulation, dampens down Th1 regulation and also promotes IL-13 production [1] and also higher IL-13 liver levels were detected in both co-infected groups, but more evident in Sm70Pb28 than Sm70Pb70. Chiaramonte [26] found that the average size of egg induced granulomas was unaltered in IL-13-deficient mice but the marked fibrotic changes were almost completely ablated in the absence of IL-13 even after several months of infection. Fallon [27] demonstrated that during a dynamic type 2 cytokine disease process IL-13 is detrimental to survival following infection, whereas IL-4 is beneficial. On the other hand IL-13Receptor $\alpha 2$ present the down-regulation role of the granulomatous inflammatory response and prolongs host survival in schistosomiasis [19].

Although the immune response to *S. mansoni* observed in the liver is predominantly Th2, as higher IL-4, IL-10 and IL-13 levels detected, in the circulation it was detected high INF- γ level in both co-infected groups, perhaps due to INF- γ from others tissues infected by *P. brasiliensis*.

In experimental PCM model, resistant mice strains mounts Th1 immune response and a well-formed granuloma, whereas susceptible or suppressed T-cell animals produce Th2 response and disorganised granulomatous lesions, lacking the peripheral halo of small mononuclear cells with increased multiplication of fungus in the tissues [28][29][11][12].

The immune response to *P. brasiliensis* in intermediate resistant BALBc mice used in this study should be the Th1 type and higher Th1 cytokines, INF- γ , level was detected in control *P. brasiliensis* mono infected after 70 days than co-infected Sm70Pb70. However also decreased IL-4 and IL-10 liver levels were detected in co-infected Sm70Pb70 than control *P. brasiliensis* mono infected (Pb70) suggesting the mixed Th1 and Th2 down regulation in liver from co-infected group. But decreased circulating INF- γ and increased IL-10 levels were detected in blood samples in relation to control *P. brasiliensis* mono infected, suggesting the systemic Th2 down modulation in co-infected (Sm70Pb70), while the liver appears to be a mixed Th1 and Th2 down regulated immune response in PCM induced by *S. mansoni* co-infection. Even at lower liver levels of Th1 and Th2 cytokines it was observed larger size of *P. brasiliensis* granuloma in co- infected Sm70Pb70 but not statistically significant. Possibly due to both Th1 and Th2 cytokines modulation, with opposite effects on the size of granuloma, there was great variation, making the deviation very large and without statistical significance.

In mice co-infected by *S. mansoni* and *Plasmodium chabaudi*, it was demonstrated by [30] decrease in IL-4 and IL-5 levels, Th2 cytokines, in supernatant of spleen cells stimulated with *S. mansoni* antigen (SEA), suggesting the Th1 cytokines modulation by *P. chabaudi*. Therefore our findings in effect of *P. brasiliensis* on systemic cytokines profiles in schistosomiasis with higher circulating INF- γ are consistent with the [30]. The liver INF- γ levels were higher in co infected but not statistically significantly in relation to control and also it was observed higher Th2 cytokines. The immune response in the liver favors the tolerance as Kupffer cells and liver endothelial cells act as antigen-presenting cells (APC) favoring immunosuppression, partly due to secretion of IL-10 according to [31]. Then the high IFN- γ level detected in the circulation, beside higher liver IL-10 level, may be due to tolerogenic aspect of the liver and to production of INF- γ by other organs that are also affected in PCM. In schistosomiasis, during the early weeks of an infection, T-lymphocyte activation and memory/effector cell expansion and differentiation required for hepatic granuloma formation occur in extrahepatic microenvironments [24].

By using experimental *S. mansoni* and *Leishmania donovani* co-infection model [32] showed that established *S. mansoni* infections in mice fail to control *L. donovani* growth and also suggested that granulomatous tissue responses to helminth organisms can form a discrete niche facilitating survival of intracellular pathogens. In our study, it was observed yeast with multiples budding in the liver, indicating fungal multiplication, suggesting then facilitating survival niche also for *P. brasiliensis* in the co-infected liver with *S. mansoni*. Interestingly it was also detected disorganized *P. brasiliensis* and *S. mansoni* granulomas lacking the outline granuloma, allowing close contact between the two different agents, in the liver. This outline absence appears to occur both in the presence of the *S. mansoni* eggs or worm, but more evident for egg. This opened granuloma should facilitate the spread of the fungus to other sites in the liver, resulting in an increase in the number of granulomas as detected in this study. Still it may facilitate the fungal dissemination to other organs. In this context, it was detected the *P. brasiliensis* in the lung, brain and spleen in 100% of the Sm70Pb70 animals and also intense lung infection in this group.

The opened granuloma also should facilitate the release of *S. mansoni* egg from the liver, which could contribute to a decrease in the number of granuloma and dissemination to other organs that require further study. Interestingly, in the group with reduced number of granuloma/egg in the liver, it was not observed difference in *S. mansoni* stool egg load. And also it was detected *S. mansoni* in others tissues (lung and spleen) in co-infected groups, not observed in *S. mansoni* mono-infected, suggesting more disseminated disease even with reduced *S. mansoni* eggs number in the liver.

Considering the no concordance in cytokines levels between Sm70Pb70 and Sm70Pb28, both co-infected group, require further additional studies with different periods of infection by using resistant or susceptible mice and also including others cytokines and chemokines.

Our data show, for the first time that co-infection with *S. mansoni* and *P. brasiliensis*, induce the liver granulomas and cytokines modulations to each other and possible induction of the severity diseases in experimental BALB/c mice.

Acknowledgments

We thank Mari S. Kaminami, Nilson de Jesus Carlos and Pedro Sebastião Dionizio for technical assistance, This work was supported by Fundação Araucária/PR, CAPES.

REFERENCES

1. Burke, ML, Jones MK, Gobert GN, LI YS, Ellis MK, et al. (2009) Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology* 31:163–176.
2. Pearce E, Macdonald A (2002) The immunobiology of Schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology* 2: 499-511.
3. Doenhoff MJ (1998) A vaccine of schistosomiasis: alternative approaches. *Parasitology Today*14:105-109.
4. Schramm G, Haas H (2010) Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. *Microbes and Infection* 12: 881-888.
5. Coutinho ZF, Silva D, Lazera M, Petri V, Oliveira RM, et al. (2002) Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980–1995). *Cadernos Saude Publica* 18: 1441–1454.
6. San-Blas (1993) Paracoccidioidomycosis and etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology* 31(2): 99-113.
7. Brumer E, Castaneda E, Restrepo A (1993) Paracoccidioidomycosis: an Update. *Clinical Microbiology Reviews* 2: 89-117.
8. Mendes RP Chapter 16. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del-Negro G. (1994) *Paracoccidioidomycosis*. 1st ed. Boca Raton, Florida: CRC Press: 233- 258.
9. Restrepo, A (1990) Actualización sobre la paracoccidioidomycosis y su agente etiológico, 1986-1989. *Interciencia* 15: 193-199, 1990.

10. Franco, MF Mendes RP, Rezkallah-Iwasso M, Montenegro MR (1989) Paracoccidioidomycosis. Baillière's Clinical Tropical Medicine and Communicable Diseases 4: 185-219.
11. Singer-Vermes, LM, Caldeira CB, Burger E, Calich VLG (1993) Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. Clinical and Experimental Immunology. 94: 75-79.
12. Calich VLG, Kashino SS (1998) Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 31: 615-623.
13. Peraçoli MTS, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PCM et al. (2003). Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. Microbes and Infection 5: 413-418.
14. De Souto JT, Figueredo F, Furnaleta A, Pfeifer K, Rossi M et al. (2008) Interferon- γ and tumor necrosis factor -2 determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. Journal American Pathology 156: 1811-1820.
15. Livonesi MC, Rossi MA, de Souto JT, Campanelli AP, de Sousa RL, et al.(2009). Inducible nitric oxide synthase-deficient mice show exacerbated inflammatory process and high production of both Th1 and Th2 cytokines during paracoccidioidomycosis. Microbes and Infection 11: 123-32.
16. Katz et al. (1970) Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. Journal Parasitology 56: 1032-3 1970.
17. Franco M (1987) Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. Journal of Medical and Veterinary Mycology 25: 5-18.
18. Brummer E, Castaneda E, Restrepo A. (1993) Paracoccidioidomycosis: an Update. Clinical Microbiology Reviews 2: 89-117.
19. Wynn TA, Cheever AW, Williams MC, Heeny S, Caspar P, Kuhn R, Sher A. IL10 regulates liver pathology in acute murine schistosomiasis but not required for immune down modulation of chronic disease. Journal of Immunology v.160, p.4473- 4480, 1998.

20. Mentink-Kane MM, Cheeve AW, Thompson RW, Hari DM, Kabatereine NB, et al. (2004) IL-13 receptor α 2 down-modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis. *Proceedings of National Academy of Sciences* 101: 586–590.
21. Flores-Villanueva PO, Zheng XX, Strom TB, Stadecker MJ. (1996) Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. *Journal of Immunology* 156: 3315-20.
22. Falcão PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, et. (1998) Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulatesthe in vitro granuloma formation. *Parasite Immunology* 20: 447-454.
23. Sadler CH, Rutitzky LI, Stadecker MJ, Wilson RA (2003) IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infect ion of mice with *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Immunology* 33:880-888.
24. Stavisky AB (2004) Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infection and Immunity*: 72: 1-2.
25. Yamashida T, Boros DL (1992) IL-4 influences IL-12 production and granulomatous inflammation in murine Schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology* 149: 3659-3664.
26. Chiaramonte MG, Cheever AW, Malley, Donaldson Dd, Wynn TA (2001) Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin 13 blockade as a tratament for established and progressive liver fibrosis *Hepathology*: 34-273- 282.
27. Fallon PG, Richardson EJ, McKenzie GJ, Mckenzi ANJ (2000) *Schistosome* infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *Journal of Immunology* 164: 2585-2591.
28. Calich V L, Singer-Vermes L M, Siqueira AM, Burger E (1985) Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *British Journal of Experimental Pathology*: 66,585-594.
29. Vaz Cac, Mackenzie DWR, Hearn VM, Camargo ZP, Singer-Vermes LM, Burger E, Calich VLG (1992) Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. *Clinical and Experimental. Immunology Oxford*,88: 119-123.

30. Helmby H, Kullberg M, Troye-Blomberg M (1998) Altered immune responses in mice with concomitant *Schistosoma mansoni* and *Plasmodium chabaudi* infections. *Infection and Immunity* 66: 5167–5174.
31. Grispe IN (2011) The liver as lymphoid organ. *Annual Reviews Immunology* 27:147-163.
32. Hassan MF, Zhang Y, Engwerda CR, Kaye PM, Sharp H, Bickle QB (2006) Granuloma Provides a Favorable Microenvironment for Sustained Growth of *Leishmania donovani*. *American Journal Pathology* 169: 943-953.

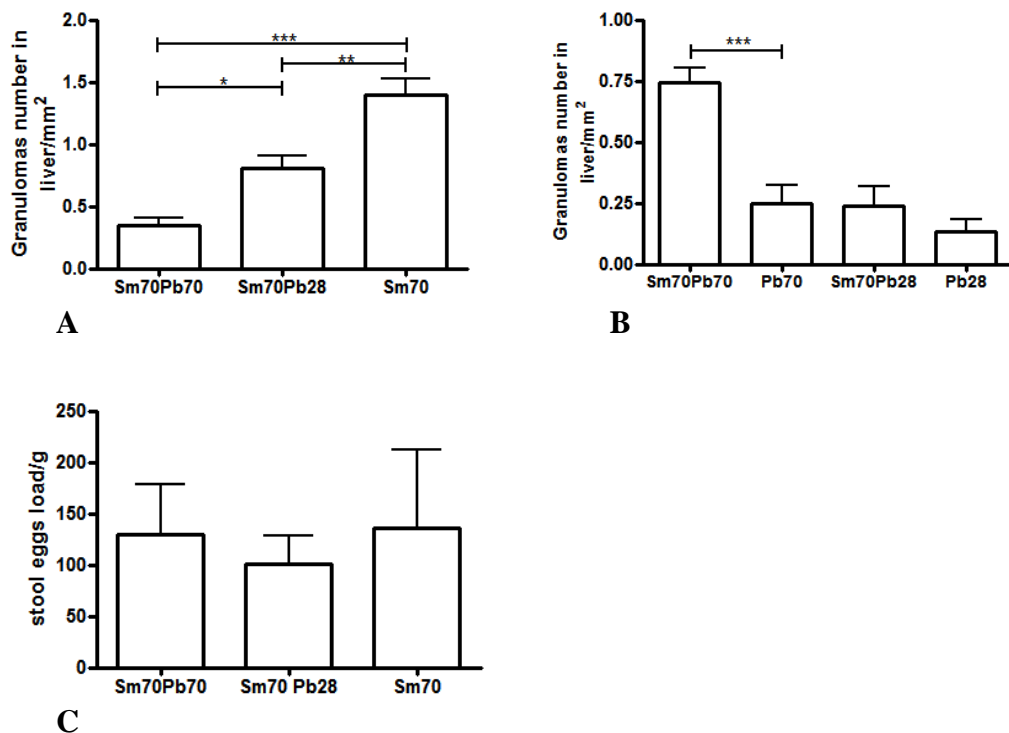


Figure1. *S. mansoni* and *P. brasiliensis* liver granulomas numbers and, stool *S. mansoni* eggs load in BALBc mice co-infected by *S. mansoni* and *P. brasiliensis*.

1A) Number of *S. mansoni* liver granulomas number; 1B) Number of *P. brasiliensis* liver granulomas number and 1C) Stool *S. mansoni* egg load. The amount of granuloma in liver was determined by the granuloma count in HE stained tissue sections in triplicate and calculated by the area of each tissue section and expressed in mm². The number of eggs per gram of feces was evaluated by quantitative copro parasitological Kato and Katz assay, in triplicate. Sm70/Pb70 (infected with *S. mansoni* and *P. brasiliensis* during 70 days); Sm70Pb28 (infected with *S. mansoni* and six weeks later, co-infected with *P. brasiliensis*), Sm70 (infected only with *S. mansoni* by 70 days), Pb70 (infected only with *P. brasiliensis* by 70 days) and Pb28 (infected only with *P. brasiliensis* by 28 days).

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

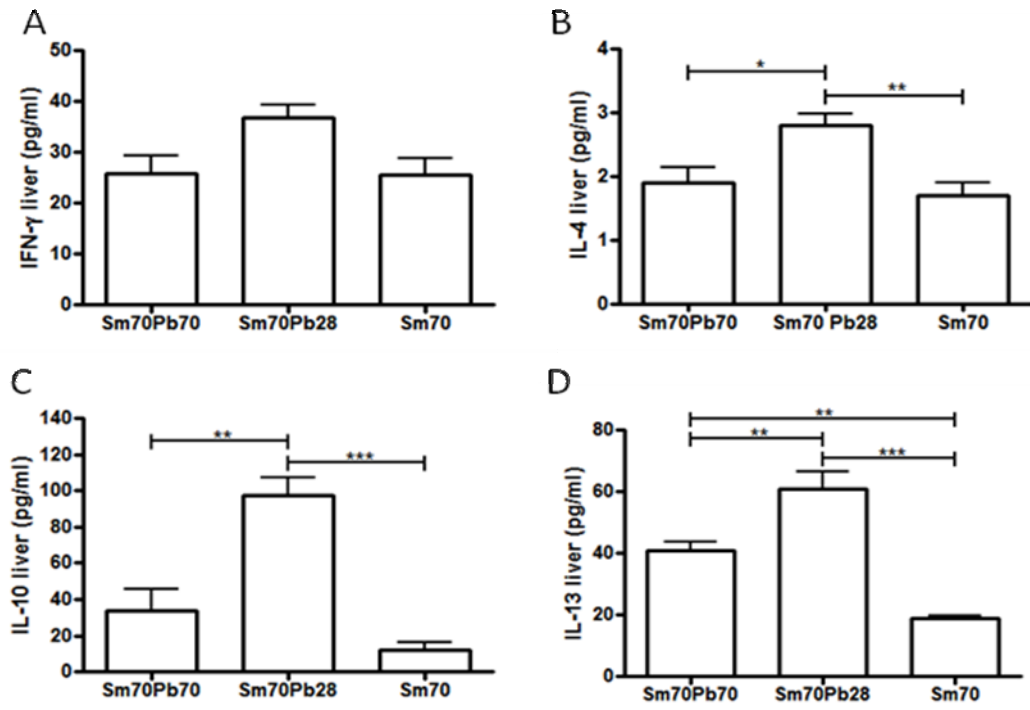


Figure 2. Effect of *P. brasiliensis* on liver cytokines profiles in schistosomiasis.

The IFN- γ (2A), IL-4 (2B), IL-10 (2C), IL-13 (2D) levels determined by ELISA in groups of mice: *S. mansoni* and *P. brasiliensis* co-infected (Sm70Pb70), *P. brasiliensis* as secondary infection (Sm70Pb28) and control *S. mansoni* mono-infected (Sm70). The results are expressed as mean and SEM in pg/ml. (n=5 each group). * p < 0.05, ** p < 0.01

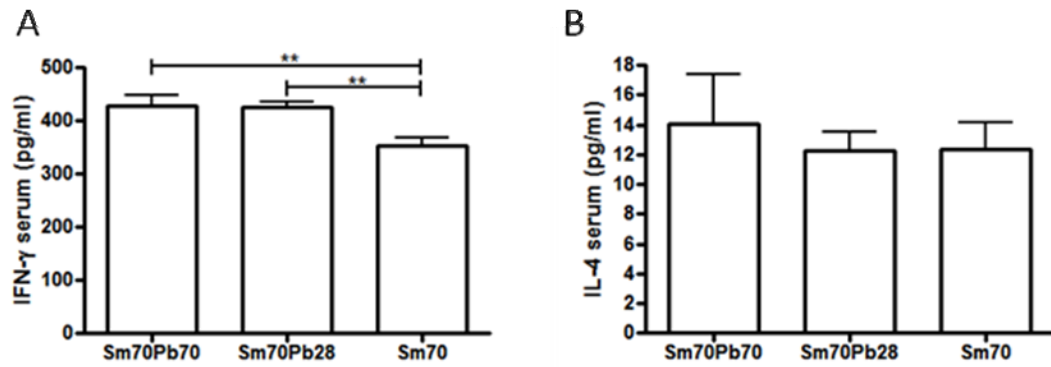


Figure3. Effect of *P. brasiliensis* on serum cytokines profiles in schistosomiasis.

The IFN- γ (3A), IL4 (3B), levels determined by ELISA in groups of mice: *S. mansoni* and *P. brasiliensis* co-infected (Sm70Pb70), *P. brasiliensis* as secondary infection (Sm70Pb28) and control *S. mansoni* mono-infected (Sm70). The results are expressed as mean and SEM in pg/ml. (n=5 each group). ** p < 0.01.

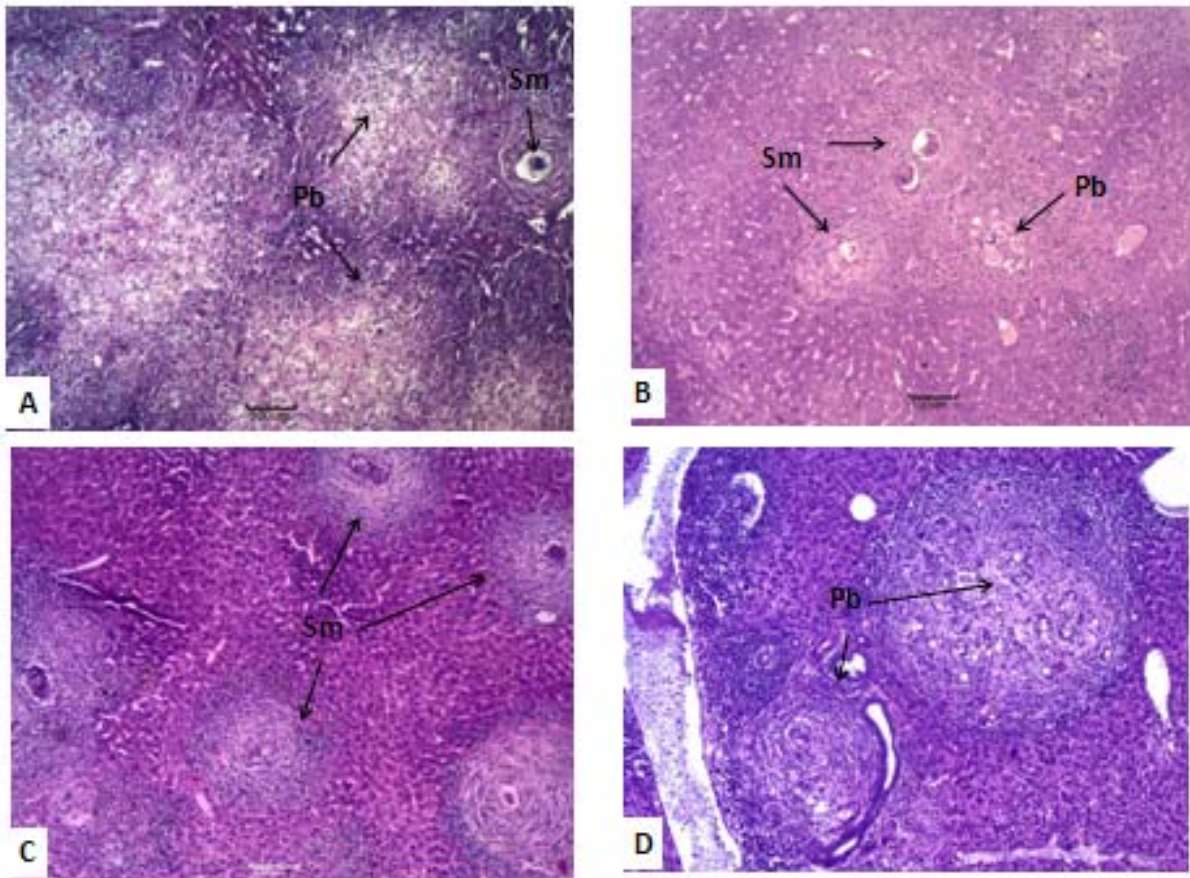


Figure 4. *S. mansoni* and *P. brasiliensis* granulomas in liver.

Histomorphology of liver sections: HE stained, show a large amount of *P. brasiliensis* granuloma (Pb) in co-infected mice (Sm70Pb70) (A) in relation to control mono-infected 70 days (Pb70) (D); a large amount of *S. mansoni* (Sm) granuloma in control mono-infected 70 days (Sm70) (C) in relation to co-infected mice (Sm70Pb70) (A) or Sm70Pb28 (B). Images were acquired using a 5x objective

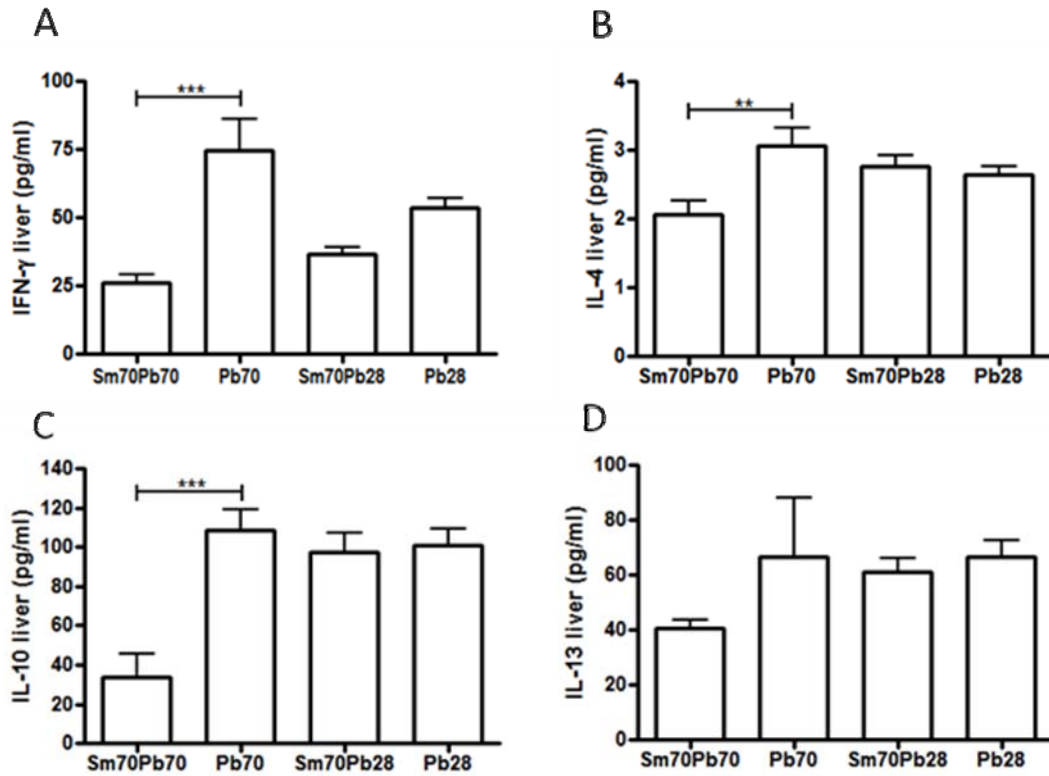


Figure 5. Effect of *S. mansoni* co-infection on liver cytokines profiles.

The IFN- γ (7A), IL-4 (7B), IL-10 (7C), IL-13 (7D) levels determined by ELISA in groups of mice: *S. mansoni* and *P. brasiliensis* co-infected (Sm70Pb70), *P. brasiliensis* as secondary infection (Sm70Pb28), control *P. brasiliensis* mono-infected for 70 days (Pb70) and control *P. brasiliensis* mono-infected for 28 days (Pb28). The results are expressed as mean and SEM in pg/ml. (n=5 each group). ** p < 0.01, *** p < 0.001.

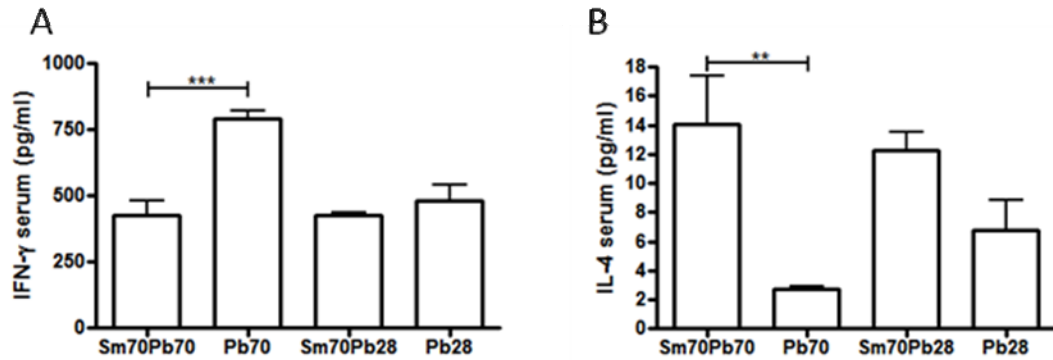


Figure 6. Effect of *S. mansoni* co-infection on cytokines profiles in the serum.

The IFN- γ (8A), IL-4 (8B) levels determined by ELISA in groups of mice: *S. mansoni* and *P. brasiliensis* co-infected (Sm70Pb70), *P. brasiliensis* as secondary infection (Sm70Pb28), control *P. brasiliensis* mono-infected for 70 days (Pb70) and control *P. brasiliensis* mono-infected for 28 days (Pb28).

The results are expressed as mean and SEM in pg/ml. (n=5 each group).

** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

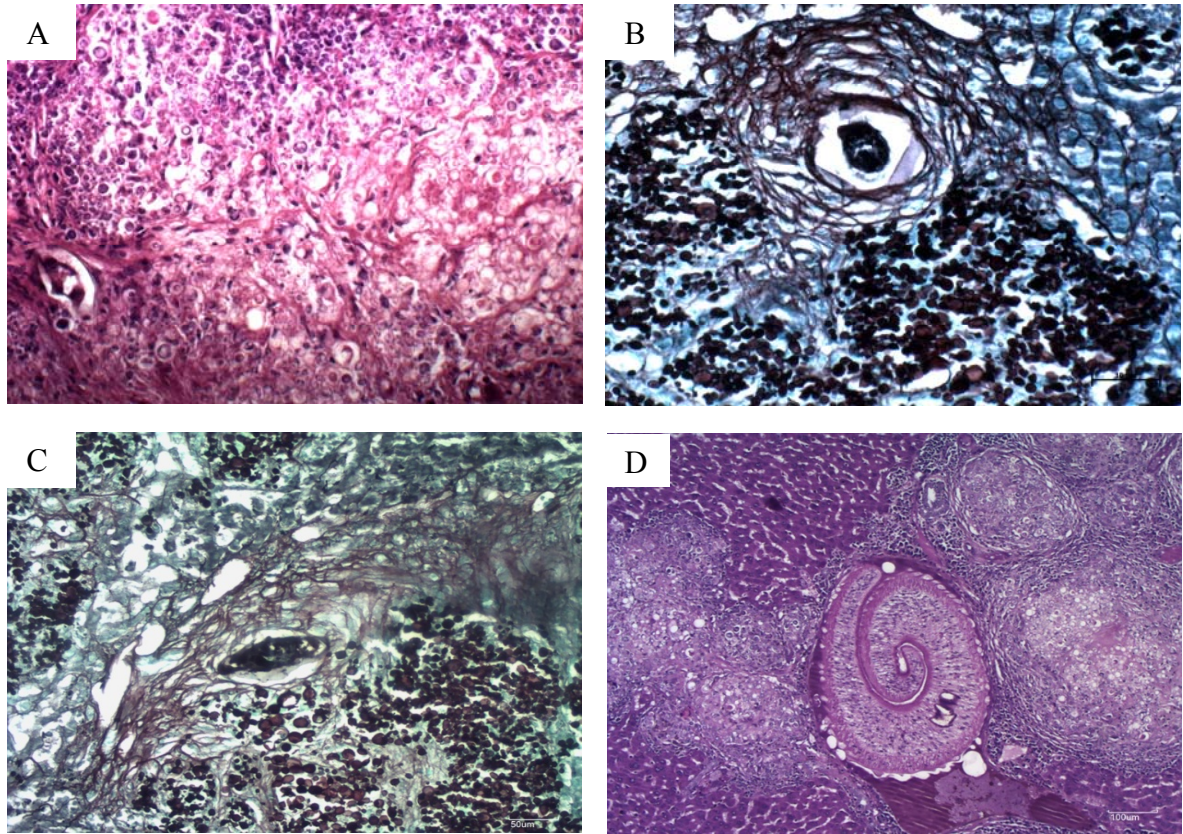


Figure 7. *P. brasiliensis* and *S. mansoni* egg and worm in liver

Liver sections HE stained (A,D) and Crocott stained (B,C), show a large amount of *P. brasiliensis* (A) with budding (B). Granulomas lacking the peripheral halo and *P. brasiliensis* and *S. mansoni* eggs/ worm (C and D) in close contact in co-infected mice (Sm70Pb70). Images (A,B,C) were acquired using a 20x objective, and (D) using a 5x objective.

Table 1. Percentage of animals with *S. mansoni* in other organs.

Groups	Lung	Spleen	Brain	Heart
	Sm	Sm	Sm	Sm
	%	%	%	%
Sm70Pb70	0.0	60	0.0	0.0
Sm70Pb28	60	60	0.0	0.0
Sm70	0.0	0.0	0.0	0.0

Table 2. Percentage of animals with *P. brasiliensis* in other organs.

Groups	Lung	Int. Infection			Spleen	Brain
	Pb	M	Mo	I	Pb	Pb
	%	%	%	%	%	%
Sm70Pb70	100	0.0	0.0	100	100	100
Pb70	100	0.0	10	0.0	20	60
Sm70Pb28	100	0.0	10	0.0	0.0	0.0
Pb28	80	40	40	0.0	0.0	0.0

*Intensity of infection in the lung

M: mild; Mo: moderate; I: intense

6 CONCLUSÃO

O estudo mostrou pela primeira vez a existência de seres humanos portadores de esquistossomose crônica apresentando sorologia positiva para *P. brasiliensis*. Os dados apresentados sugerem que essa co-infecção possa modular citocinas.

A partir de dados obtidos no modelo animal, podemos deduzir que o impacto da infecção associada entre *S. mansoni* e *P. brasiliensis* provoca modulação de citocinas e reduz o número de granulomas hepáticos. Sugerindo, que essa situação provoque uma alteração no curso das doenças levando a um agravamento.