

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia
Tese de Doutorado**

Participação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no recrutamento e ativação celular no granuloma hepático e possíveis associações destes mediadores imunológicos com a morbidade da esquistossomose em área endêmica e em modelo murino

**Jailza Lima Rodrigues Oliveira
Orientação: Deborah Negrão-Corrêa
2014**

Jailza Lima Rodrigues Oliveira

Participação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas no recrutamento e ativação celular no granuloma hepático e possíveis associações destes mediadores imunológicos com a morbidade da esquistossomose em área endêmica e em modelo murino

Tese apresentada ao programa de graduação do curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientação: Dra. Deborah Negrão-Corrêa

Depto. de Parasitologia – ICB/UFMG.

**Belo Horizonte
2014**

Laboratórios envolvidos

Imunologia de Helmintos – ICB/UFMG – Prof^ª. Dra. Deborah Ap. Negrão-Corrêa

Epidemiologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias –ICB/UFMG – Prof^ª. Dra. Mariangela
Carneiro

Imunofarmacologia–ICB/UFMG – Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Apoio Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES

Dedico esse trabalho a minha mãe, Selma Lessa, exemplo de vida, a quem guardo profundo respeito e admiração.

Agradecimentos

Deus agradeço pelas bênçãos em minha vida e pelos dias difíceis que me fizeram aprender que tudo é possível quando se tem fé, me tornando uma pessoa mais forte e melhor por dentro.

À minha família pelo acolhimento. Em especial ao meu filho Davi Emanuel, uma dádiva divina, razão da minha vida, pela sua existência sublime e por fazer minha vida mais feliz e completa. E também ao meu marido Guilherme, grande amor da minha vida, pela longa convivência, atenção, dedicação, e por estar sempre presente em todos os momentos. Agradeço principalmente à minha mãe, Selma, pela ajuda, dedicação e amor infinitos. Aos meus irmãos, minha avó, tios, primos, sobrinhos, e cunhados agradeço pela convivência e carinho. E também à D. Diva e ao Sr. Walter pela enorme ajuda.

Minha enorme gratidão à minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Deborah Negrão-Corrêa pela paciência, competência, serenidade, profissionalismo exemplar, pelo aprendizado e por ter contribuído imensamente com a minha formação.

Agradeço a Prf^a. Dr^a. Mariangela Carneiro pela ajuda e pelo enriquecedor aprendizado.

Aos alunos do Laboratório Imunologia de Helmitos Vinicius, Michelle, Vanessa, Laura, Fernanda, Izabella, João, Núbia, Márcia, Flôr, Maria, Cíntia, Ana Terezinha serei sempre grata pelo companheirismo, aprendizado, confiança, disponibilidade, imprescindível ajuda e convivências diárias. De forma especial agradeço a Emília pela grande ajuda e companheirismo

que foram essenciais no desenvolvimento deste trabalho. E ainda Adriana, Fernanda e Paula pela amizade que vai além da convivência no laboratório.

Aos colaboradores do GIDE Sr. Alberto, Zenir, Selma, Beth e principalmente ao Zé Carlos agradeço por proporcionarem toda a estrutura necessária para a realização dos experimentos com muita dedicação e carinho.

Ao Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, Prof. Dr. Ary Corrêa e Frankcinéia pelas imprescindíveis ajudas e colaborações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, professores e funcionários, especialmente à Sumara e à Sibeles.

À CAPES pela concessão da bolsa.

E todos que torceram e participaram de alguma forma deste trabalho.

*“No que diz respeito ao empenho, ao compromisso, ao esforço,
à dedicação, não existe meio termo. Ou você faz uma coisa
bem feita ou não faz.”*

Ayrton Senna

Lista de Abreviaturas

ALT/TGP	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
APCs	Células apresentadoras de antígeno
APC-CY7	<i>Allophycocyanin</i> conjugado a cianina
ARG-1	Arginase 1
AST/TGO	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina de soro bovino
CCL	Quimiocina (<i>C-C motif</i>) <i>ligand</i>
CCl ₄	Tetracloroeto de carbono
CCR	Receptor de quimiocina do tipo CC
CCL3 ^{-/-}	Animais deficientes na produção de CCL3
CCR5 ^{-/-}	Animais deficientes na produção de CCR5
CXCL	Quimiocina (<i>C-X-C motif</i>) <i>ligand</i>
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
ConA	Concavalina A
CXCR	Receptor de quimiocina do tipo CXC
DCs	Células dendríticas
DTH	Reação de hipersensibilidade tardia
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EPO	Peroxidase de Eosinófilos
FITC	FITC - <i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FIZZ/RELM-	Proteína expressa em macrófagos alternativamente ativados
FOXP3	Fator de transcrição membro da família <i>forkhead</i>
F4/80	Marcador expresso por macrófagos
HSCs	<i>Hepatic Stellate Cells</i>
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
Ig	Imunoglobulina
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular
Inos	Óxido nítrico sintetase
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
Lyso-PS	Lyso-fosfatidilserine
LPS	Lipofosfossacarídeo de bactéria Gram negativa
M2	Macrófagos do tipo 2/ Alternativamente Ativado
MCP	Proteína quimiotática para macrófagos
MIF	Fator Inibidor da Migração de Macrófagos
MHC II	Complexo de histocompatibilidade do tipo II
NAG	N-acetilglicosaminidase
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NKT	Células T <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico

OPD	O-fenilodiamina
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	Salina tamponada (“ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
PD-1	Receptor inibidor da função das células T
PDGF	“ <i>Plateled-derived growth fator</i> ”
PE	<i>Phycoeritrin</i>
PercP	<i>Peridinin-chlorophyll-protein complex</i>
RPMI	Meio de cultura cuja fórmula foi criada no <i>Roswell Park Memorial Institute, NY</i>
SFB	Soro fetal bovino
SEA	Antígenos solúveis de ovo de <i>Schistosoma mansoni</i>
STAT3	Sinal transdutor e ativador de transcrição 3
STAT4	Sinal transdutor e ativador de transcrição 4
STAT 6	Sinal transdutor e ativador de transcrição 6
sTNF-R1	Receptor solúvel de TNF- α do tipo 1
SWAP	Antígenos solúveis de verme adulto
TGF- β	Fator de transformação de crescimento
TNF- α	Fator de necrose tumoral
Th1	Células T CD4 ⁺ auxiliaadoras do tipo 1
Th2	Células T CD4 ⁺ auxiliaadoras do tipo 2
Th17	Células T CD4 ⁺ auxiliaadoras do tipo 17
Treg	Células T CD4 ⁺ designadas Regulatórias
US	Ultrassom
YM1	Membro da família da quitinase e expresso em M2
WT	Selvagens “ <i>Wild Tipe</i> ”
WHO	Organização Mundial de Saúde

Lista de Figuras

Figura 1. Distribuição mundial de espécies de <i>Schistosoma</i> . <i>S. mansoni</i> :	21
Figura 2. Prevalência da esquistossomose no Brasil (Scholte et al. 2014).	23
Figura 3. Ciclo evolutivo de <i>S. mansoni</i> . Adaptado de Ross et al. (2002)	27
Figura 4. Balanço da produção de citocinas na infecção primária por <i>S. mansoni</i> em camundongos	34
Figura 5. Principais componentes da resposta granulomatosa contra os ovos de <i>S. mansoni</i> no fígado e as principais citocinas e quimiocinas que regulam essa resposta.	44
Figura 6. Medidas ultrassonográficas categorizadas pelo Protocolo de Niamey 1996, conforme Richter et al. (2000 e 2001) e carga parasitária medida pelo número de ovos do parasito eliminados por grama de fezes (OPG) dos pacientes de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	75
Figura 7. Concentração da citocina MIF e do receptor solúvel de TNF- α (sTNF-R1) no plasma de pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> e em indivíduos controle.	77
Figura 8. Concentração do receptor solúvel de TNF- α (sTNF-R1) no plasma de pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em relação ao sexo em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. ...	78
Figura 9. Relação entre a carga parasitária e a concentração da citocina MIF ou do receptor solúvel de TNF- α (sTNF-R1) no plasma de pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	79
Figura 10. Associação dos níveis plasmáticos de MIF e organometria de fígado e baço em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	82
Figura 11. Associação dos níveis plasmáticos de sTNF-R1 e organometria de fígado e baço em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	83
Figura 12. Associação da concentração plasmática de MIF e as medidas de espessamento fibroso periportal em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	85
Figura 13. Associação da concentração plasmática de sTNF-R1 e as medidas de espessamento fibroso periportal em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	87
Figura 14. Associação entre a concentração plasmática de MIF ou de sTNF-R1 e as medidas de espessamento perivesicular em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	89
Figura 15. Concentração plasmática de CCL3, CCL7 e CCL24 em pacientes infectados por <i>S. mansoni</i> e em voluntários não infectados.	92
Figura 16. Concentração da quimiocinas CCL7 no plasma de pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em relação ao sexo em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	93
Figura 17. Relação entre a concentração plasmática de CCL3, CCL7 ou CCL24 e carga parasitária nos pacientes de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	94
Figura 18. Associação dos níveis plasmáticos de CCL3 e organometria de fígado e baço em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	96
Figura 19. Associação dos níveis plasmáticos de CCL7 e organometria de fígado e baço em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	97

Figura 20. Associação dos níveis plasmáticos de CCL24 e organometria de fígado e baço em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.....	98
Figura 21. Associação da concentração plasmática de CCL3 e as medidas de espessamento fibroso periportal em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.....	100
Figura 22. Associação da concentração plasmática de CCL7 e as medidas de espessamento fibroso periportal em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.....	101
Figura 23. Associação da concentração plasmática de CCL24 e as medidas de espessamento fibroso periportal em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.....	102
Figura 24. Associação entre a concentração plasmática de CCL3, CCL7 ou CCL24 e as medidas de espessamento perivesicular em pacientes infectados com <i>S. mansoni</i> em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.....	104
Figura 25. Delineamento Experimental I.....	135
Figura 26. Delineamento Experimental II.....	136
Figura 27. Avaliação da carga parasitária no decorrer da infecção por <i>S. mansoni</i> em camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}) e não deficientes (WT)..	154
Figura 28. Avaliação da carga parasitária no decorrer da infecção por <i>S. mansoni</i> em camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT)..	156
Figura 29. Volume do intestino (A), fígado (B) e baço (C) de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) cronicamente infectados por <i>S. mansoni</i>	156
Figura 30. Quantificação de hidroxiprolina nos granulomas isolados camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5(CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i> . Os valores representam a média ± EPM da quantidade de hidroxiprolina estimada em granuloma isolado de camundongos WT, CCL3 ^{-/-} e CCR5 ^{-/-} infectados com 25 cercárias/camundongo após a 12 ^a semana de infecção por <i>S. mansoni</i>	159
Figura 31. Atividade sérica de Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) em camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5(CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	160
Figura 32. Concentração das quimiocinas CXCL1, CCL3 e CCL11 em granulomas isolados camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5(CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) no decorrer da infecção por <i>S. mansoni</i>	163
Figura 33. Concentração de quimiocinas no fígado de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i> . Concentração tecidual de (A) CXCL1, (B) CCL3 e (C) CCL11.....	165
Figura 34. Concentração de citocinas no granuloma de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase aguda da infecção por <i>S. mansoni</i>	167

Figura 35. Concentração de citocinas no granuloma de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	169
Figura 36. Concentração de citocinas no granuloma de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	171
Figura 37. Concentração de citocinas no granuloma de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	172
Figura 38. Concentração de citocinas fígado de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	173
Figura 39. Concentração de citocinas de perfil Th-2 no fígado de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	175
Figura 40. Concentração de citocinas regulatórias no fígado de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	176
Figura 41. Atividade de Mieloperoxidase (MPO), Peroxidase de eosinófilos (EPO) e de N-acetilglicosaminidase (NAG) no granuloma camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a infecção por <i>S. mansoni</i>	180
Figura 42. Proporção e número de Granulócitos, Macrófagos e Linfócitos na suspensão celular isolada de granuloma hepático de camundongos C57/BL6 selvagens WT, camundongos C57/BL6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}) e de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) cronicamente infectados por <i>S. mansoni</i>	182
Figura 43. Proporção de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ obtidas do granuloma hepático de camundongos C57/BL6 selvagens (WT), camundongos C57/BL6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}) e de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) infectados por <i>S. mansoni</i>	184
Figura 44. Quantificação de células T CD3 ⁺ CD25 ⁺ e CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ IL-10 ⁺ purificadas do granuloma hepático de camundongos C57/BL6 selvagens (WT), camundongos C57/BL6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}) e de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) infectados por <i>S. mansoni</i> ..	186
Figura 45. Quantificação de células CD11b ⁺ CD193 ⁺ e a produção de células obtidas do granuloma hepático de camundongos C57/BL6 selvagens (WT), camundongos C57/BL6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}) e de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) infectados por <i>S. mansoni</i> ..	188
Figura 46. Quantificação de células CD11b ⁺ F4/80 ⁺ e a produção de células obtidas do granuloma hepático de camundongos C57/BL6 selvagens (WT), camundongos C57/BL6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}) e de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) infectados por <i>S. mansoni</i> ..	190
Figura 47. Quantificação da produção de quimiocinas em sobrenadante de cultura de células CD11b ⁺ purificadas do granuloma hepático de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5 ^{-/-}) e não deficientes (WT) na fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	192

Figura 48. Produção de citocinas por células CD11b⁺ purificadas de granulomas hepáticos de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) na fase crônica da infecção por *S. mansoni*.....194

Figura 49. Quantificação da atividade de arginase em macrófagos isolados de granulomas hepáticos hepáticos camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a infecção crônica por *S. mansoni*.....195

Lista de Tabelas

Tabela 1. Características da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.....	69
Tabela 2. Características Clínicas da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. ...	70
Tabela 3. Categorização segundo Richter et al. 2001 das medidas organométricas obtidas pela avaliação ultrassonográfica dos pacientes de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. O valor de p foi calculado através do teste de Mann-Whitney.	73
Tabela 4. Relação entre a concentração de sTNF-R1 e as variáveis obtidas na avaliação clínica dos pacientes de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.	80
Tabela 5. Modelo de análise multivariada para MIF, população Córrego do Choro, Padre Paraiso-MG.....	90
Tabela 6. Modelo de análise multivariada para sTNF-R1 na população Córrego do Choro, Padre Paraiso-MG.	91
Tabela 7. Modelo de análise multivariada para CCL3 na população Córrego do Choro, Padre Paraiso-MG.....	105
Tabela 8. Modelo de análise multivariada para CCL24 na população Córrego do Choro, Padre Paraiso-MG.....	106
Tabela 9. Produção de quimiocinas no fígado e nos granulomas de animais WT, CCL3 ^{-/-} , CCR5 ^{-/-}	177
Tabela 10. Produção de citocinas no fígado e nos granulomas de animais WT, CCL3 ^{-/-} e CCR5 ^{-/-}	177

Sumário

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1.1 Introdução.....	20
1.2. O ciclo evolutivo de <i>S. mansoni</i>	24
1.3. Apresentação clínica da esquistossomose	27
1.4. Resposta imunológica induzida pela infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> e a formação do granuloma.....	32
1.5 Granuloma: Proteção versus Patologia	44
2. JUSTIFICATIVA.....	50
3. CAPÍTULO I:.....	52
3.1. INTRODUÇÃO.....	53
3.2. OBJETIVOS	59
3.2.1. Objetivo geral.....	60
3.2.2. Objetivos específicos primeira etapa (capítulo I)	60
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	61
3.3.1. Área de Estudo.....	62
3.3.2. Coleta de dados	62
3.3.3. Dosagem citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas no plasma dos indivíduos selecionados	64
3.3.4. Processamento e análise de dados	65
3.3.5. Considerações Éticas.....	66
4.4. RESULTADOS.....	67
4.4.1. Características da população e da infecção.....	68
4.4.2. Dados clínicos e ultrassonográficos.....	69
4.4.3. Níveis da citocina MIF e do receptor solúvel de TNF- α (rTNFR1) na população de Córrego do Choro.....	76
4.4.4. Níveis da citocina MIF e do receptor solúvel de TNF- α (rTNF-R1) na população de Córrego do Choro em relação a carga parasitária.....	78
4.4.5. Relação entre concentração da citocina MIF ou do receptor solúvel de TNF- α (sTNF-R1) e parâmetros clínicos e ultrassonográficos	79
4.4.6. Níveis das quimiocinas CCL3, CCL7 e CCL24 na população de Córrego do Choro.....	92
4.4.7. Níveis das quimiocinas CCL3, CCL7 e CCL24 na população de córrego do Choro e a carga parasitária	94

4.4.8. Parâmetros de Gravidade.....	95
4.5. DISCUSSÃO	107
4.6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS (CAPÍTULO I).....	123
5. CAPÍTULO II.....	125
5.1. INTRODUÇÃO.....	126
5.2 OBJETIVOS	129
5.2.1. Objetivo geral:.....	130
5.2.2. Objetivos específicos segunda etapa (capítulo II)	130
5.3. METODOLOGIA.....	132
5.3.1. Animais experimentais e infecção	133
5.3.2. Delineamento Experimental	134
5.3.3. Avaliação da Infecção	137
5.3.4. Avaliação da patologia	138
5.3.5. Avaliação da resposta imunológica.....	141
5.4. RESULTADOS.....	152
5.4.1. Avaliação de parâmetros parasitológicos em camundongos WT, CCL3 ^{-/-} , CCR5 ^{-/-} .	153
5.4.2. Efeito da ausência de CCL3 e CCR5 na patologia induzida pela infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	157
5.4.3. Perfil de resposta imunológica	161
5.4.3.1. Produção de quimiocinas no tecido e nos granulomas isolados de camundongos WT, CCL3 ^{-/-} e CCR5 ^{-/-}	161
5.4.3.2. Produção de citocinas no tecido e nos granulomas isolados de camundongos WT, CCL3 ^{-/-} e CCR5 ^{-/-}	166
5.4.3.3. Atividade enzimática como determinação indireta do infiltrado celular nos granulomas hepáticos isolados de camundongos CCL3 ^{-/-} , CCR5 ^{-/-} e WT	178
5.4.3.4. O efeito de CCL3 e de CCR5 na composição e ativação celular do granuloma hepático durante a infecção experimental por <i>S. mansoni</i>	181
5.4.3.5. Efeito da ausência de CCL3 e CCR5 na infiltração e ativação de células CD11b ⁺ no granuloma hepático	191
5.5. DISCUSSÃO	196
5.6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS (CAPÍTULO II).....	211
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	214
7. ANEXOS	243

Resumo

A formação e modulação do granuloma hepático em resposta a retenção de ovos de *Schistosoma mansoni* retidos nos tecidos é um processo inflamatório imuno-mediado de fundamental importância para evolução da morbidade da doença. No presente estudo avaliamos a participação de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias na morbidade da esquistossomose humana e no recrutamento e ativação de células para o granuloma hepático de camundongos experimentalmente infectados. Amostras de plasma 97 pacientes infectados por *S. mansoni*, com diagnóstico definido pelo exame de fezes pelo método de KATO-KATZ e a morbidade determinada por avaliações clínicas e ultrassonográficas foram utilizadas para determinação da concentração do receptor solúvel de TNF- α (sTNF-R1), MIF e das quimiocinas CCL3, CCL7 e CCL24 através da técnica de ELISA. Modelos multivariados de regressão linear foram usados para analisar a relação entre a concentração de quimiocinas e citocinas e as variáveis de morbidade investigadas. Os dados mostraram que a população de estudo apresentou baixa carga parasitária, com mediana de 36 ovos por grama de fezes, que não foi diferente entre sexo, faixa etária ou em pacientes que relataram tratamento anti-helmíntico anterior. Os níveis de MIF, CCL3, CCL7 e CCL24 no plasma não foram associados com carga parasitária, porém os níveis de sTNF-R1 foram positivamente associados à carga parasitária. Maiores concentrações plasmáticas de MIF e sTNF-R1 e das quimiocinas CCL3 e CCL24 foram positivamente associados com parâmetros de fibrose hepática, como aumento da espessura da veia porta e da vesícula biliar. Os níveis plasmáticos quantificados de CCL7 não apresentaram nenhuma relação com parâmetros de morbidade. Os dados indicam que níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas da resposta do tipo-2 podem ser indicadores de gravidade da esquistossomose crônica humana. Para o melhor entendimento do recrutamento e ativação de células para os granulomas hepáticos camundongos geneticamente deficientes na produção de CCL3, do receptor CCR5 e não deficientes foram infectados pela via subcutânea (25 cercárias/ animal) e comparativamente avaliados quanto à carga parasitária, parâmetros de morbidade e a composição e atividade de células isoladas do granuloma hepático. Não foram detectadas diferenças no número de vermes recuperados da circulação, do número de ovos depositados no fígado ou eliminados nas fezes dos animais dos diferentes grupos experimentais. Apesar da carga parasitária semelhante, os animais deficientes no receptor CCR5 apresentaram esquistossomose grave, com aumento de fígado e baço, maior deposição de colágeno no granuloma e aumento da produção de transaminases séricas, enquanto que camundongos deficientes em CCL3 apresentam patologia mais branda em relação aos animais selvagens. Na ausência de CCL3 há uma reduzida celularidade e menor produção de quimiocinas e citocinas de diferentes perfis. No granuloma hepático isolado de camundongos CCR5^{-/-} cronicamente infectados foi verificada maior concentração de citocinas pró-inflamatórias e de perfil TH2 que em animais CCL3^{-/-} e este aumento está associado com maior recuperação de linfócitos TCD4⁺ ativados e menor recuperação de linfócitos Treg. Além disso, há evidências de que a ausência de CCR5 influencia a ativação de macrófagos M2, levando a uma diminuição da atividade de ARG1 e da produção de TGF- β . Esses resultados indicam a participação de quimiocinas e de citocinas pró-inflamatórias no desenvolvimento das formas graves da esquistossomose.

Abstract

The formation and modulation of hepatic granuloma in response to retention of *Schistosoma mansoni* eggs retained in the tissues is an inflammatory immune-mediated process of fundamental importance for the evolution of morbidity. In this study we evaluate the involvement of pro-inflammatory chemokines and cytokines in human schistosomiasis and morbidity in the cells recruitment and activation in hepatic granuloma in experimentally infected mice. Plasma samples 97 patients infected with *S. mansoni*, with diagnosis by stool examination by Kato-Katz method and the morbidity determined by clinical and sonographic evaluations. The concentration of the soluble TNF- α receptor (sTNF-R1), MIF and chemokines CCL3, CCL24 and CCL7 were determined by ELISA. Multivariate linear regression models were used to analyze the relationship between the concentration of quimocinas and cytokines and co-morbidity variables investigated. Data showed that the study population had low parasite burden, with a median of 36 eggs per gram of feces, which was not different between genders, age or in patients who reported previous anthelmintic treatment. MIF levels, CCL3, CCL7 and CCL24 in plasma were not associated with parasite load, but the levels of sTNF-R1 were positively associated with the parasite load. Higher plasma concentrations of MIF and sTNF-R1 and chemokines CCL3 and CCL24 were positively associated with liver fibrosis parameters, such as increasing the thickness of the portal vein and gallbladder. Plasma levels quantified CCL7 showed no relationship to morbidity parameters. The data indicate that elevated levels of proinflammatory cytokines and type-2 chemokine response may indicate the severity of chronic human schistosomiasis. To better understand the recruitment and activation of cells for hepatic granulomas mice genetically deficient in the production of CCL3 and CCR5 receptor and non-deficient were infected subcutaneously (25 cercariae/animal) and comparatively evaluated for parasitic burden, morbidity parameters and the composition and activity of hepatic granuloma isolated cells. There wasn't differences in the number of worms recovered from the circulation, the number of eggs deposited in the liver and eliminated in the feces of the animals of the different experimental groups. Despite the similar parasite burden, the animals deficient in CCR5 receptor had severe schistosomiasis, an increase of liver and spleen, increased collagen deposition in the granuloma and increased production of serum transaminases, while mice deficient in CCL3 have milder disease in relation to wildlife. In these mice, granulomas was reduced cellularity and reduced production of cytokines and chemokines from different profiles. In the liver granulomas isolated from CCR5^{-/-} mice chronically infected was found higher concentration of pro-inflammatory cytokines and Th2 profile in CCL3^{-/-} animals, and this increase is associated with increased recovery CD4 lymphocytes activated and lower recovery of Treg lymphocytes . Furthermore, the absence of CCR5 influences the M2 macrophage activation leading to a decrease in ARG1 activity and TGF- β production. These results suggest the involvement of chemokines and pro-inflammatory cytokines in the development of severe forms of schistosomiasis.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Introdução

A esquistossomose é causada por vermes do gênero *Schistosoma* Weiland 1858, que pertencem ao Filo Platyhelminthes, Classe Trematoda, subclasse Digenea e Família Schistosomatidae. Sua área de ocorrência se estende a regiões tropicais e subtropicais do globo sendo uma das doenças parasitárias mais importantes no mundo (King et al., 2005; Enk et al. 2010). Estima-se que cerca de 800 milhões de pessoas vivam em área de risco de infecção e mais de 200 milhões estejam infectadas pelo parasito na África, Ásia, Caribe e América do Sul (Steinmann 2006). Estimativas indicam que 120 milhões de indivíduos infectados são sintomáticos e a evolução em formas graves da doença é observada em 20 milhões (Chitsulo et al 2000; Ross et al. 2002). Apesar da redução de casos fatais decorrentes da infecção por espécies de *Schistosoma*, a esquistossomose é uma doença crônica e sua transmissão ocorre em extensas áreas geográficas do planeta, com transmissão ativa não somente em áreas endêmicas, com surgimento de novos focos, sendo ainda hoje, uma importante causa de morbidade e mortalidade (King et al. 2005; Steinmann et al. 2006; Jia et al. 2007; Finkelstein et al. 2008; King & Dangerfield-Cha 2008). Além disso, a contínua expansão da área de transmissão e dispersão da esquistossomose devido a fatores ligados às práticas culturais, ao estilo e condições de vida de determinadas populações, reforçam a importância da esquistossomose enquanto problema de saúde pública (Gryseels et al. 2006, Bergquist et al. 2008, McManus et al.2008).

Das espécies de *Schistosoma* que são capazes de infectar o homem, as espécies *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma mansoni* Sambon 1907 e *Schistosoma japonicum* Katsurada 1904, com importância global e regional, são responsáveis pela maioria dos casos humanos, enquanto que *Schistosoma intercalatum* Fisher 1934, *Schistosoma mekongi*, Voge, Bruckner & Bruce, 1978, *Schistosoma malayensis* Greer 1988 são parasitos cuja

transmissão está relacionada a focos limitados e com menor importância epidemiológica (Ross et al. 2002; WHO 2002; Colley et al. 2014; Gryssels 2012; Gryssels et al. 2006). Conforme ilustrado na **Figura 1**, estas diferentes espécies de *Schistosoma* apresentam distribuição variada no globo: *S. japonicum* apresenta-se restrito ao Extremo Oriente, incluindo a China e as Filipinas; *S. mekongi* está limitado a algumas áreas do sudeste da Ásia; *S. haematobium* é a espécie com ampla dispersão na África e no Oriente Médio; *S. intercalatum* é encontrado na África, *S. malayensis* com pequenos e limitados focos na Malásia e *S. mansoni* presente na África, sendo a única espécie que infecta o homem na América Latina (WHO 2002).

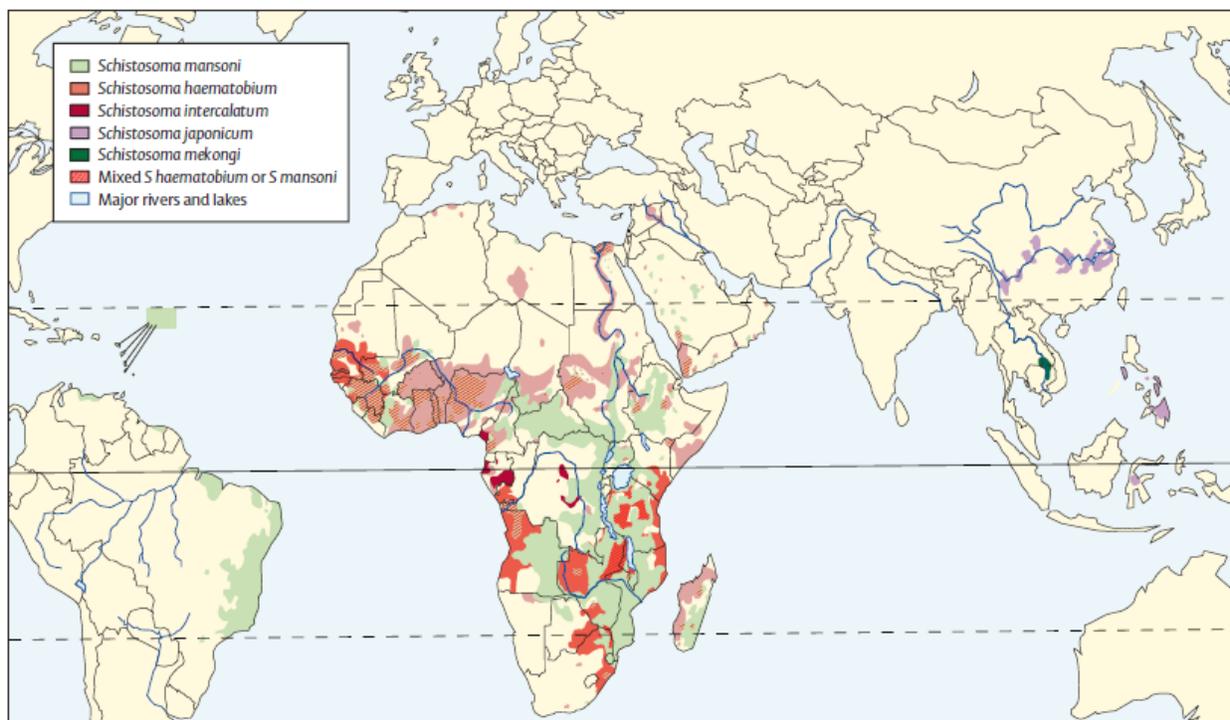


Figura 1. Distribuição mundial de espécies de *Schistosoma*. *S. mansoni*: África, Brasil, Suriname, Venezuela, Caribe, Egito, Península Arábica; *S. haematobium*: África, Egito, Sudão, Península Arábica; *S. japonicum*: China, algumas outras nas Filipinas e alguns pontos na Indonésia; *S. mekongi*: Laos e Camboja; *S. intercalatum*: oeste e centro da África. (Fonte: Colley et al. 2014).

A espécie *S. mansoni* é o agente da esquistossomose mansoni ou moléstia de Pirajá da Silva, única das infecções causadas pelo gênero *Schistosoma* que é endêmica no Brasil. Durante as últimas décadas, a distribuição da esquistossomose tem se alterado como resultado de transformações demográficas e ecológicas, tal como a expansão de áreas rurais na periferia de grandes centros urbanos (Scholte et al. 2014). Além de áreas com elevadas prevalências, a esquistossomose vêm expandindo sua área de ocorrência, que em geral está associada às modificações ambientais provocadas pelo homem, aos deslocamentos populacionais originados de áreas endêmicas e à insuficiente infraestrutura na rede de água e esgoto ou na disponibilidade de outras formas de acesso a esses serviços (Leal Neto et al. 2012) persistindo como problema em saúde pública.

Apesar de dados controversos, tem sido estimado que de 4 a 6 milhões de pessoas estejam infectadas por *S. mansoni* no Brasil, sendo que os Estados de Minas Gerais e Bahia concentram 70% destes casos (Amaral & Porto 1994; Drummond et al. 2006). Após a implementação de medidas de controle da esquistossomose, baseada principalmente na utilização de quimioterápicos mais eficazes, a prevalência da infecção no Brasil teve uma grande redução, passando de 23,3 % em 1977 para índices estimados de 6,0 % em 2004-2005 (Barbosa et al. 2008). Apesar da prevalência geral da esquistossomose na população brasileira não parecer elevada, levantamentos nacionais (Amaral & Porto 1994, Coura & Amaral 2004) demonstram a existência de áreas endêmicas onde a prevalência da esquistossomose supera 15% (**Figura 2**), bem como novos focos de transmissão que evidenciam a expansão da esquistossomose no Brasil. No Estado de Minas Gerais estima-se que prevalência da esquistossomose seja de 7,8 % (Katz & Peixoto 2000), sendo que 523 dos 853 municípios (61%) apresentam transmissão ativa da esquistossomose além de uma população de 10.870.063 vivendo em áreas endêmicas

(Drummond et al. 2010). Dados relativos ao período entre 2005 a 2009 (Scholte et al 2014) e os resultados preliminares do novo levantamento nacional da esquistossomose no Brasil mostram uma redução geral da prevalência da parasitose no país. Porém estas estimativas foram baseadas na técnica de Kato-Katz como método de diagnóstico para infecção por *S. mansoni* e geohelmintos e, segundo estudos realizados por Siqueira (et al. 2011) e Grenfell (et al. 2013), esta técnica não é eficiente para estimar a prevalência da esquistossomose em áreas onde os indivíduos apresentam baixa carga parasitária.

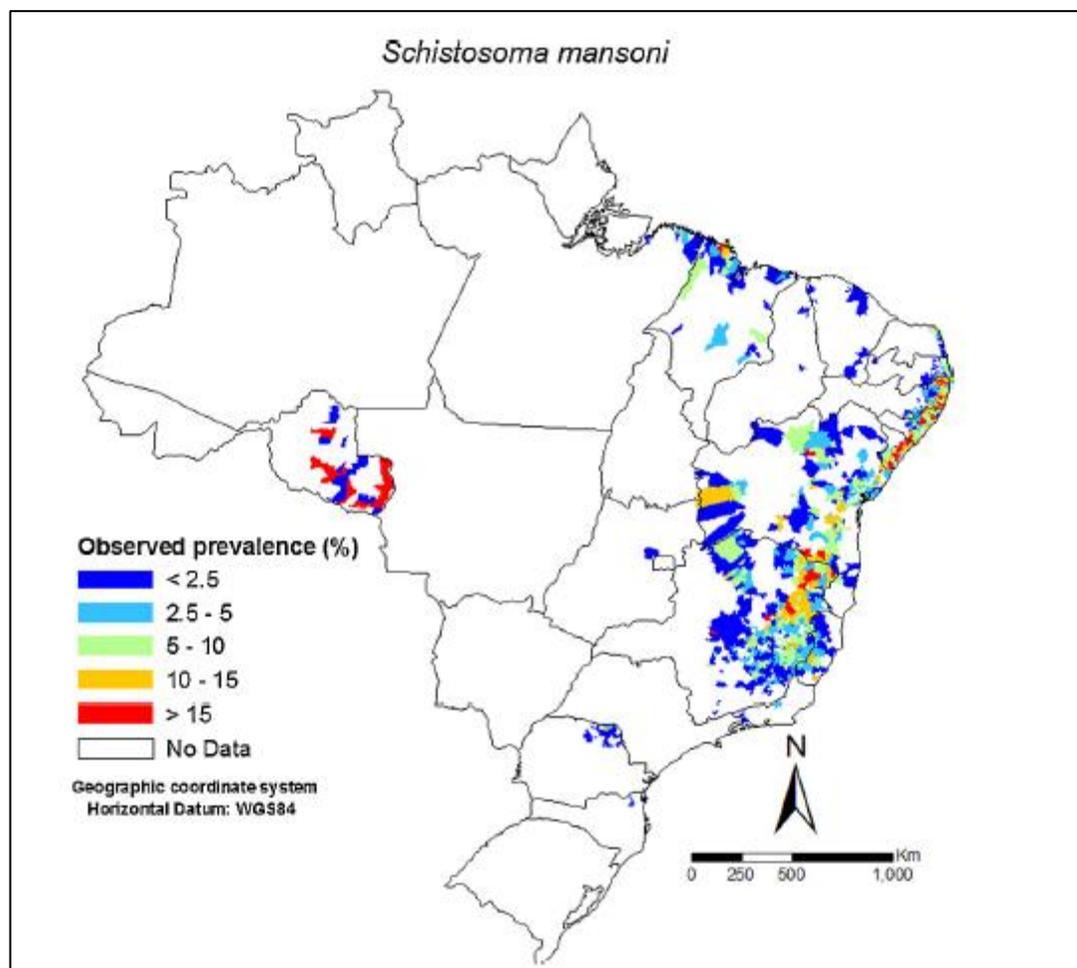


Figura 2. Prevalência da esquistossomose no Brasil de 2005 a 2009 obtidos pelo Programa Nacional de Controle da Esquistossomose (Scholte et al. 2014).

Para seu desenvolvimento, *S. mansoni* necessita de um hospedeiro definitivo, que incluem humanos e outros mamíferos (Modena et al. 2008), e um hospedeiro intermediário, que são algumas espécies do gênero *Biomphalaria*. Dentre as espécies de mamíferos que são encontradas naturalmente infectadas no Brasil, o homem tem sido considerado, até o momento, a principal espécie com importância epidemiológica associada à transmissão do parasito (Gryseels et al. 2006). No entanto, existem trabalhos demonstrando que outros mamíferos podem ser fonte de infecção. Estudos realizados na região de Sumidouro, no Rio de Janeiro, indicam que roedores do gênero *Nectomys* são altamente susceptíveis à infecção por *S. mansoni* e podem ter importância na dinâmica da transmissão da esquistossomose nesta região, sendo considerados reservatórios silvestres dessa doença humana em algumas condições específicas (Gentile et al. 2006). Além disso, há relatos da eliminação de ovos viáveis de *S. mansoni* por bovinos em condições semi-naturais sugerindo a participação desses animais na manutenção e disseminação da doença (Modena et al. 2008).

1.2. O ciclo evolutivo de *S. mansoni*

O ciclo de vida de *S. mansoni* encontra-se esquematizado na **Figura 3**. Os ovos maduros de *S. mansoni* são eliminados nas fezes do hospedeiro vertebrado infectado e, ao entrar em contato com fontes hídricas, como rios e lagos, a larva, denominada miracídio, eclode do ovo, nada e encontra o seu hospedeiro intermediário. No Brasil, as três espécies de *Biomphalaria* que já foram encontradas naturalmente infectadas por *S. mansoni* são: *Biomphalaria tenagophila*, *B. straminea* e *B. glabrata*, com grande ênfase para esta última espécie (Paraense 2001; Schotlte et al. 2012). Durante a penetração no caramujo, os miracídios liberam o conteúdo das glândulas de adesão e penetração, perdem suas placas ciliares e sofrem modificações fisiológicas,

transformando-se em esporocistos. Os esporocistos sofrem dois ou mais ciclos de reprodução assexuada formando as cercárias, formas larvárias de *S. mansoni* que, liberadas no ambiente aquático, são infectantes ao homem. Condições como iluminação e temperatura da água exercem influência sobre essa liberação da cercária (Bogea et al. 1996; Wolmarans et al. 2002). As cercárias infectam o hospedeiro definitivo por penetração ativa através da pele ou mucosa quando este entra em contato com águas infestadas. Durante este processo, as cercárias perdem a cauda sofrem modificações estruturais, fisiológicas e bioquímicas e se transformam em esquistossômulos (Curwen & Wilson 2003; Whitfield et al. 2003). Os esquistossômulos adaptam-se às condições fisiológicas do meio interno do hospedeiro, migram pelo tecido subcutâneo e alcançam o sistema circulatório. Através da corrente sanguínea e/ou linfática, os esquistossômulos atingem o ventrículo direito e são levados, via artéria pulmonar aos pulmões. Dos pulmões migram aos vasos intra-hepáticos, preferencialmente, via circulação passiva, pela aorta para o sistema porta-hepático através da veia porta, ou circulando sistemicamente por vários órgãos antes de atingirem artérias que derivam no sistema porta-hepático (Lenzi et al. 2008a). Entretanto, também se admite que parte dos esquistossômulos possa atingir os vasos intra-hepáticos migrando ativamente através da veia cava e artéria hepática, ou ainda, por migração transdiafragmática (Lenzi et al. 2008a). Nos ramos do seio porta-hepático os esquistossômulos completam seu desenvolvimento, tornam-se vermes adultos, diferenciando-se em machos e fêmeas. Em camundongos *Swiss Webster*, experimentalmente infectados, são observados vermes acasalados nas veias portais do hilo hepático a partir do 25º dia após a penetração e a postura de ovos tem início entre o 30º e o 35º dias após infecção (Lenzi et al. 2008 a). O número de ovos produzidos diariamente pela fêmea de *S. mansoni* varia de acordo com a espécie do hospedeiro e da linhagem do parasito, entretanto, a maioria dos estudos

indicam a produção de 150-400 ovos/fêmea/dia infecção (Lenzi et al. 2008 a) com média de 300 ovos por dia (Boros 1989; Hams et al. 2013; Lundy & Lukacs 2013). Do total de ovos eliminados pelo parasito, cerca de 40% a 50% são capazes de atravessar o endotélio, a membrana basal do vaso, a mucosa intestinal e alcançar a luz intestinal sendo eliminado nas fezes (Pearce & Macdonald 2002; Wynn et al. 2004). Grande parte dos ovos produzidos pelas fêmeas do *S. mansoni* fica retida na mucosa intestinal e quando não deixam os vasos, são carreadas pelo fluxo sanguíneo e se acumulam nos órgãos internos principalmente no fígado, onde se tornam alvo da resposta imune do hospedeiro (Boros & Warren 1970; Warren 1982; Burke et al. 2009; Hams et al. 2013; Chuah et al. 2014).

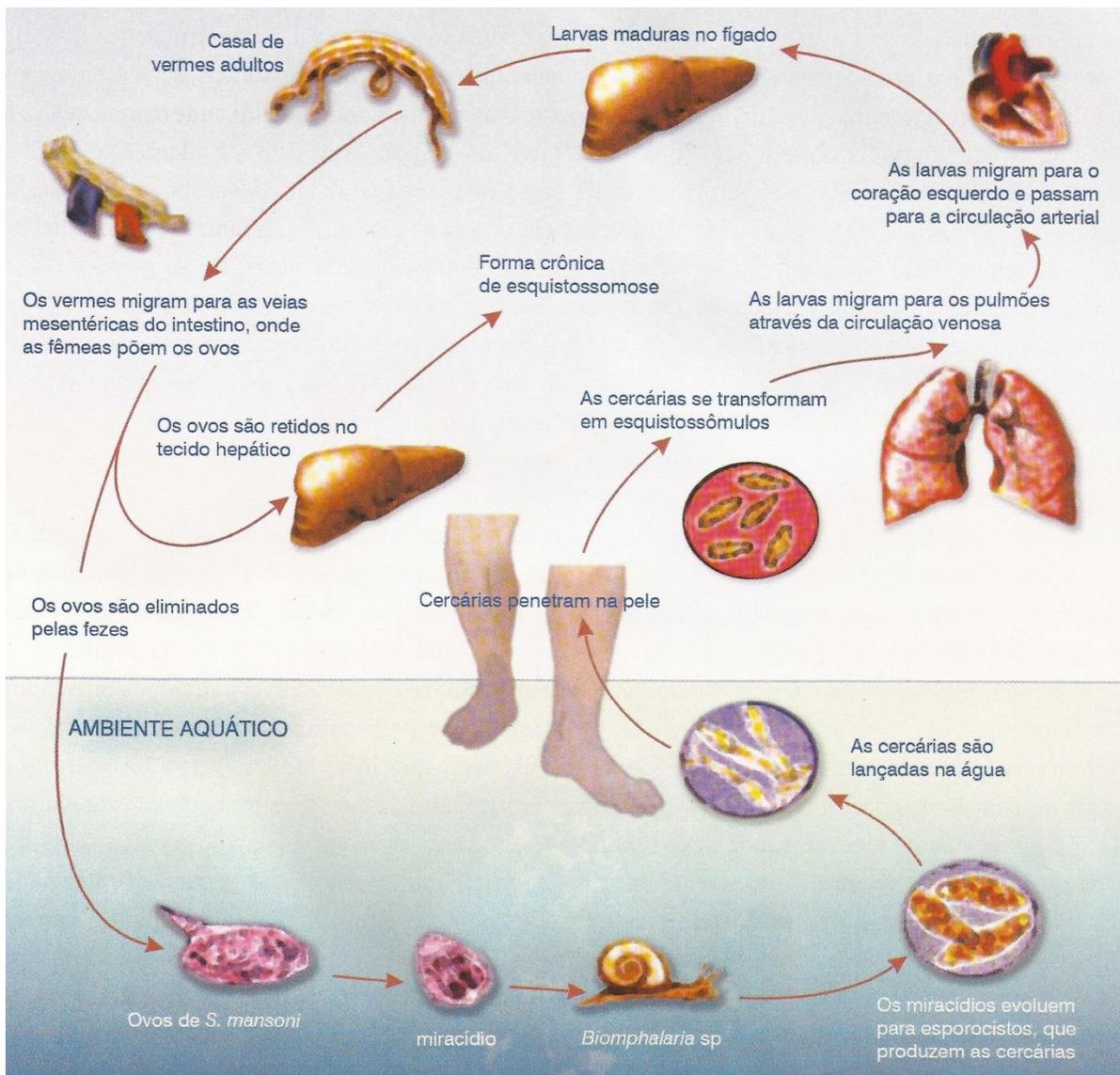


Figura 3. Ciclo evolutivo de *S. mansoni*. Adaptado de Ross et al. (2002)

1.3. Apresentação clínica da esquistossomose

Em populações residentes em áreas endêmicas a fase aguda da esquistossomose geralmente apresenta-se assintomática (Bina & Prata 2003; Caldas et al. 2008). Os quadros sintomáticos que ocorrem na fase aguda da esquistossomose são frequentemente observados em pessoas não

previamente expostas ao parasito, como turistas, imigrantes e outras pessoas que acidentalmente são expostas à infecção primária (Raso et al. 1986; Zuidema 1981; Gazzineli et al. 1985; Lambertucci et al. 1993; King et al. 1998; Bottieau et al. 2006; Caldas et al. 2008). A fase aguda da esquistossomose pode ser dividida em fase pré-postural, que compreende a fase de migração e desenvolvimento dos vermes, e fase pós-postural (Hyat et al. 1979) que inicia-se com a postura e estende-se até o início da modulação da resposta immune. Nesta fase os sintomas característicos, quando presentes, são dermatite cercariana e síndrome ou febre de *Katayama*. A dermatite cercariana é uma resposta de hipersensibilidade mediada pela produção de IgE reativo a antígenos de cercárias, que é caracterizada por uma reação maculo-papular e prurido que se manifesta em algumas horas após contato com águas contaminadas e pode persistir por alguns dias (Gryssels et al. 2006; Ross et al. 2002). Os sintomas da síndrome de Katayama se desenvolvem devido a uma reação de hipersensibilidade mediada por imuno-complexos contra a migração dos esquistossômulos e o início da oviposição (Gryssels et al. 2006; Ross et al. 2002; Ross et al. 2007). Os sintomas se manifestam 14-84 dias após a exposição ou após a uma reinfeção e são caracterizados por febre, fadiga, mialgia, malaise, dor de cabeça, tosse não produtiva e eosinofilia, com infiltrados celulares detectáveis em radiografia. Sintomas abdominais também podem ocorrer mais tardiamente nesta fase, causados principalmente pela migração e posicionamento dos vermes maduros e eliminação dos ovos (Gryseels et al. 2006). A maioria dos pacientes se recupera espontaneamente, porém, alguns desenvolvem doença mais séria e persistente com perda de peso, dispnéia, diarreia, dor abdominal difusa, hepatomegalia. Complicações neurológicas, pulmonares, cardíacas, hepáticas ou intestinais podem ocorrer nesta fase (Boros 1989). Em casos mais raros, hepatite aguda com necrose focal e enterocolites são observadas (Raso 1986; Caldas et al. 2008).

A modulação da resposta imunológica caracteriza o início da fase crônica da esquistossomose, fase em que, geralmente, se observa o desenvolvimento dos casos graves de esquistossomose. Baseado nos estudos realizados em pacientes humanos, três alterações patológicas contribuem para morbidade da fase crônica da esquistossomose: reações granulomatosas ao redor dos ovos do parasito, fibrose e alterações vasculares (Andrade 2004). A esquistossomose crônica pode ser clinicamente classificada em formas intestinal, hepatointestinal e a forma mais grave da doença denominada de forma hepatoesplênica (Bogliolo 1958; Prata & Bina 1968; Warren 1979; Andrade 2004). Na esquistossomose humana, a maioria dos pacientes apresenta a forma intestinal podendo ser assintomáticos, ou apresentar sintomas abdominais, como dor local, diarreia intermitente e fezes sanguinolentas, além de fadiga e cefaleia. Essas manifestações clínicas podem estar associadas à inflamação e a fibrose do intestino (Dunne & Pearce 1999). Alguns autores sugerem a não existência de uma forma intestinal pura, pois certo grau de acometimento do fígado é frequente em todos os pacientes com esquistossomose, mesmo aquelas em que o fígado não é o eixo das manifestações principais da doença (Raso & Pedroso 1987). Na forma hepatointestinal observa-se, além da presença de sintomas intestinais, a presença de sintomas associados às lesões hepáticas. Nos pacientes que apresentam a forma intestinal ou hepato-intestinal da esquistossomose, os granulomas periovulares se formam isoladamente nas ramificações terminais mais finas da veia porta, dando a impressão de estarem situados em pleno parênquima hepático. Outra característica frequente nos pacientes com a forma branda da esquistossomose (intestinal e hepatointestinal) é que os granulomas aparecem em pequeno número e em várias fases de evolução para cicatrização (Andrade & Prata 1963; Andrade 2008).

A infecção humana por *S. mansoni*, apesar da gravidade das lesões, na maioria dos indivíduos resulta em uma forma crônica relativamente leve (Stadecker 2001), mas a evolução em formas graves da doença é observada em cerca de 10% dos pacientes (Bica et al 2000; Carvalho & Andrade 2005; Hams et al., 2013). Em casos graves, a inflamação granulomatosa induzida pela deposição de ovos do parasito pode produzir extensa fibrose periportal, manifestação principal da esquistossomose denominada hepatoesplênica, causando obstrução do vaso e aumento da pressão portal (Boros & Warren 1970; Andrade 1987; Cheever et al., 2000; Andrade 2009; Wynn & Barron 2010), que são responsáveis por lesões hepáticas graves que caracterizam a forma clínica hepatoesplênica. Essa forma grave da esquistossomose primeiramente descrita por Prata & Andrade (1963) é caracterizada morfológicamente pela fibrose hepática periportal, dita *pipestem*, descrita por Symmers (1904). A intensa fibrose periportal, denominada de fibrose de *Symmers*, é geralmente associada a sinais de hipertensão, com alterações congestivas e obstrutivas de ramos intra-hepáticos e ao longo da parede da veia porta, que dificultam a perfusão sanguínea do órgão em decorrência de uma excessiva deposição de colágeno no fígado (Andrade & Cheever 1971; Lambertucci 1993; Silva et al. 2006). O fígado pode estar aumentado, com tamanho normal, ou mesmo, ligeiramente encolhido e a sua superfície pode se apresentar nodular (Lambertucci et al. 1993). Como consequência, o baço aumenta por incremento do leito vascular, congestão da polpa vermelha e/ou hiperplasia do parênquima (Teixeira-Carvalho et al. 2002). A circulação colateral aumenta devido à formação de anastomoses que tentam diminuir o fluxo sanguíneo, desviando-o de áreas de elevada pressão (Lacerda et al. 2002). Nesta situação é frequentemente relatado o rompimento de varizes gástricas e esofagianas gerando perdas significativas de sangue, percebida pela hematêmese e melena, sendo a principal causa óbitos em humanos (Khier et al. 1999).

A morbidade causada pela esquistossomose hepatoesplênica é, nos dias atuais, amplamente avaliada pela técnica de ultrassom e suas características foram descritas por diferentes autores (Homeida et al. 1988; Lambertucci et al. 2000; Hatz 2001). A principal característica da forma hepatoesplênica da doença é o espessamento fibroso periportal central e em suas ramificações (Lambertucci et al. 2001). O emprego da técnica de ultrassom em estudos de campo expandiu o critério de avaliação dos pacientes e deixou claro que a avaliação clínica não reflete precisamente o estágio da doença (Lambertucci et al. 2000; Caldas et al. 2008). Em adição ao exame clínico de palpação abdominal, medidas ultrassonográficas, tal como o tamanho do fígado, da veia porta, espessamento fibroso portal central e dos seus ramos periféricos, além do tamanho do baço, determinam com melhor precisão o estágio da doença. Para a padronização das metodologias aplicadas nos diferentes estudos, o Protocolo de Cairo foi desenvolvido (Cairo Working Group 1992). Este protocolo foi revisado em Niamey em 1996 na Nigéria (Niamey Working Group 2000) e durante o primeiro Simpósio Satélite de Ultrassonografia em Esquistossomose realizado em Belo Horizonte (Richter et al. 2001).

Múltiplos fatores levam alguns indivíduos a desenvolverem a forma grave da doença e a contribuição de cada elemento ainda não foi claramente determinado (Abath et al. 2006). A carga parasitária elevada e reinfecções frequentes são os principais fatores associados à evolução dos casos graves de esquistossomose (Bina & Prata 2003; Carvalho & Andrade 2005; Carvalho et al. 2008). Entretanto, Abath et al. (2006) e Andrade (2008) relataram o desenvolvimento de formas graves da esquistossomose em indivíduos com baixa intensidade de infecção, demonstrando que a carga parasitária não é o único fator determinante no desenvolvimento da patologia grave. Estudos epidemiológicos indicam que fatores genéticos e imunológicos também tem papel determinante na evolução da morbidade da esquistossomose (Buttherworth et al. 1985; Cheever

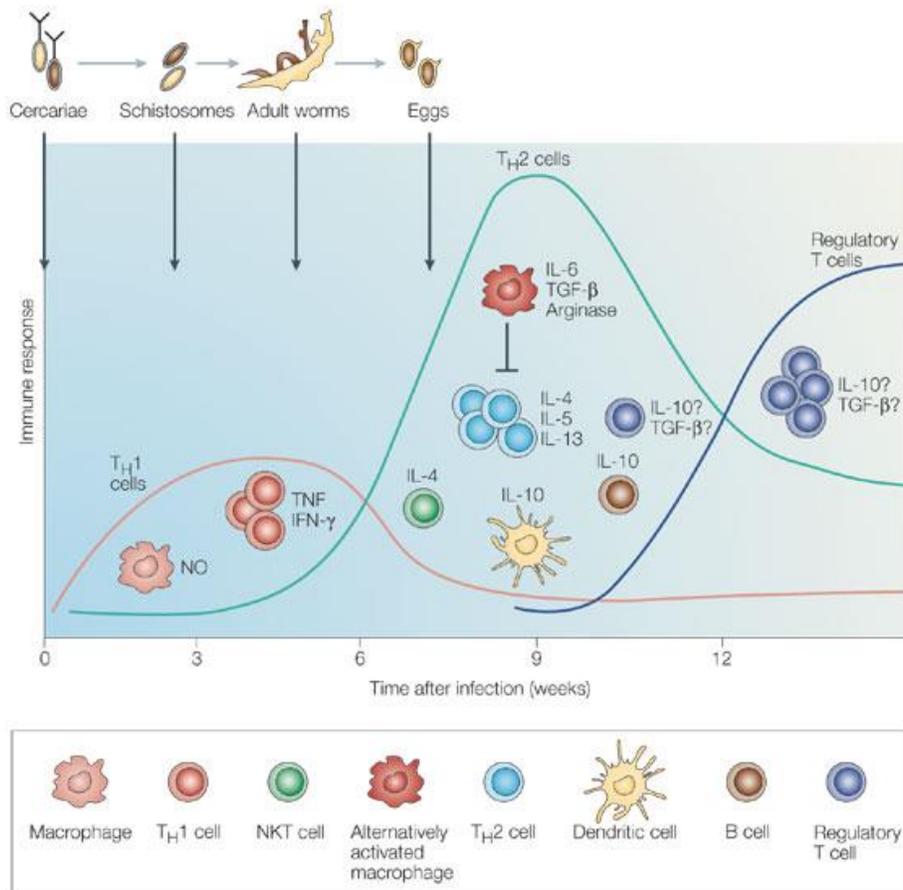
et al. 1987; Dessein et al. 1999; Dunne & Pearce 1999). Evidências experimentais indicam que a capacidade do hospedeiro de induzir e modular o processo inflamatório em resposta a liberação de antígenos do ovo do parasito seja um fator determinante na evolução das formas graves da doença (Wynn et al. 1994; Fallon 2000; Pearce et al. 2004; Gyssels 2012; Hams et al. 2013).

1.4. Resposta imunológica induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni* e a formação do granuloma

A resposta imunológica induzida por *S. mansoni* em seu hospedeiro vertebrado está intimamente envolvida no desenvolvimento de muitas das alterações patológicas que acompanham a infecção (Boros 1989; Carvalho et al. 2008; Lundy & Lukacs 2013). Modelos experimentais têm sido amplamente utilizados para o estudo da imunopatologia da esquistossomose em virtude das similaridades com o sistema imune humano, a viabilidade de uso de vários reagentes e a possibilidade de testar linhagens de camundongos geneticamente modificadas (Lundy & Lukacs 2013). Conforme ilustrado na **Figura 4**, dados obtidos com infecção experimental de camundongos demonstram que o perfil da resposta imunológica varia no decorrer da infecção por *S. mansoni*. A migração dos esquistossômulos, diferenciação e maturação dos vermes adultos induz uma resposta com predomínio de células CD4⁺ Th1 (Vella & Pearce 1992; Pearce et al. 1991; Wynn et al. 1998; Hoffmann et al. 2000; Pearce & Macdonald 2002; Stadecker et al. 2004) e consequente produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL-6), interferon-gama (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2), IL-12 (Dunne & Pearce 1999; Stadecker 1998). Os mediadores imunológicos da patogênese da forma aguda ou os possíveis antígenos do parasito que induzem esta resposta ainda não estão completamente esclarecidos, entretanto, há estudos que indicam a importância dos antígenos de

esquistossômulos como prováveis mediadores da resposta (Hiatt et al. 1979; Capron & Dessaint 1985; Butterworth et al 1994; Angeli et al. 2001; Silva et al. 2008).

Com o início da produção e deposição de ovos e à liberação de antígenos do parasito nos sinusóides hepáticos observa-se a produção local de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1) e de quimiocinas, como consequência da interação dos produtos excreto-secretados pelos ovos com as células residentes teciduais (Joseph & Boros 1993; Lukacs et al. 1993; Wynn et al. 1993; Burke et al. 2010; Cjaza 2014). Inicialmente, esses mediadores inflamatórios são produzidos por células hepáticas residentes, entre elas as células endoteliais, os hepatócitos, as células de Kupffer e as células estreladas hepáticas (HSCs), e células do sistema imune local, como células dendríticas (DCs), ‘natural killer’ (NK) e células T ‘natural killer’ (NKT) (Lundy & Lukacs 2013; Marra & Tacke 2014). Em conjunto citocinas e quimiocinas, de uma maneira coordenada, vão atuar no recrutamento celular, retenção e modulação da inflamação formada ao redor dos ovos depositados nos tecidos do hospedeiro (Almadi et al. 2011).



Nature Reviews | Immunology

Figura 4. Balanço da produção de citocinas na infecção primária por *S. mansoni* em camundongos (Dunne & Cooke 2005). A resposta imune inicial que se desenvolve é a resposta Th1. À medida que os vermes se desenvolvem e os ovos são liberados, células NKT são ativadas, células dendríticas produzem mais IL-10 e menos IL-12, e uma resposta Th2 se desenvolve. Em adição mais IL-10 é produzida em resposta a aos antígenos do ovo e do verme. Além disso, populações de macrófagos alternativamente ativados (M2) e células regulatórias também se desenvolvem. IFN- γ , interferon- γ ; NO, óxido nítrico; TGF- β , *transforming growth factor*- β ; TNF, *tumour-necrosis factor*.

A produção inicial de TNF- α estimula a expressão de ICAM-1 (Amiri et al. 1992; Hasseb et al. 2001), que é importante no influxo de leucócitos, como monócitos, neutrófilos e linfócitos, para o estabelecimento da resposta celular ao redor do ovo do parasito. Estas células efetoras que são atraídas para o sítio inflamatório produzem citocinas que aumentam a produção de ligantes

(quimiocinas) e a atração de mais células efetoras em uma espécie de *feedback* inflamatório (Antonelli et al. 2014). Desta forma, TNF- α e a citocina IL-1 são fortes indutoras da expressão da subfamília de quimiocinas CXC que são importantes nas fases iniciais da inflamação e na reparação tecidual (Charo et al. 2006; Wasmuth et al. 2010). Em modelos de infecção por *S. japonicum*, a deposição de ovos no tecido induz aumento da expressão de CXCL1 e CXCL2 e o recrutamento de neutrófilos; entretanto, na infecção por *S. mansoni* e *S. haematobium* observa-se uma menor infiltração deste tipo celular (Chuah et al. 2014). Foi demonstrado que uma proteína secretada por *S. mansoni* se liga a CXCL8 (IL-8), uma quimiocina envolvida na quimotaxia de neutrófilos, inibindo a infiltração destas células para o sítio inflamatório (Smith et al 2005), o que explicaria uma menor infiltração de neutrófilos no granuloma induzido pelos ovos de *S. mansoni*.

Outra citocina pró-inflamatória, denominada de MIF “*Macrophage Inhibitory Factor*”, tem produção aumentada durante a formação do granuloma induzido por *S. mansoni* (Weinstock et al. 1983) e participa do recrutamento e sobrevivência de eosinófilos para o granuloma na fase aguda (Magalhaes et al. 2009). Os dados obtidos com a infecção experimental de animais geneticamente deficientes na produção de MIF, realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Rodrigues et al. 2009), indicam que essa citocina também participa do recrutamento e ativação de células mononucleares e na manutenção ou amplificação da resposta do tipo-2 durante a formação do granuloma esquistossomótico, entretanto, seu papel na esquistossomose humana não foi avaliado.

Um grande número de quimiocinas é produzido pelas células hepáticas residentes as quais podem direcionar o influxo de células imunes específicas (Czaja 2014). Em decorrência de injúrias teciduais, células estreladas hepáticas (HSCs), células de Kupffer, endoteliais e

hepatócitos secretam CCL2 (MCP-1) que induz a infiltração de macrófagos e monócitos via ativação do receptor CCR2 (Chensue et al.1995;Wasmuth 2010; Marra & Tacke 2014) que são as primeiras células respondedoras nesta fase da infecção. Além da produção de CCL2, as principais quimiocinas secretadas pelas células residentes em resposta a injúrias hepáticas são CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CXCL9 (MIG), CXCL10 (IP-10), CXCL12 (SDF-1) promovendo o posicionamento de leucócitos no fígado nas proximidades do estímulo antigênico no início do processo inflamatório (Wasmuth et al. 2010; Czaja 2014; Marra &Tacke 2014). Estudos mais detalhados sobre a participação de quimiocinas na formação do granuloma induzidos por *S. mansoni* foram realizados em modelos de formação sincronizada de granulomas pulmonares induzidos pela embolização de *beads* de agarose acopladas a antígenos do parasito ou de ovos do parasito. Estes estudos mostram que durante a formação de granulomas pulmonares há expressão dos genes das quimiocinas CCL2 e CCL12 (MCP-5), que são ligantes de CCR2 sendo importantes no recrutamento de células mononucleares durante as fases iniciais da formação do granuloma (Chiu et al 2002). Na fase inicial, denominada fase pré-granulomatosa, as células migrantes, predominantemente macrófagos, linfócitos e eosinófilos, arranjam-se desordenadamente na proximidade dos ovos, formando agregados celulares (Lenzi et al 1998).

Embora as reações imunes inatas no fígado dominem a resposta inicial, células do sistema imunológico adaptativo como os linfócitos B e T e macrófagos, que ocorrem em um segundo momento da resposta imunológica, são determinantes na coordenação inflamação durante a formação da resposta celular denominada de granuloma (Marra & Tacke 2014) e, conseqüentemente na patogênese da inflamação hepática crônica associada à esquistossomose. As células efectoras atraídas para o sítio inflamatório, por sua vez, produzem citocinas que

umentam a produção de ligantes (quimiocinas) e a atração de mais células efetoras em uma espécie de *feedback* pró-inflamatório (Czaja 2014).

Os granulomas são estruturas organizadas formadas por células migrantes, especialmente macrófagos, eosinófilos, linfócitos T-CD4⁺, que juntamente com células dos órgãos afetados, alteram a produção e deposição de uma matriz extracelular heterogênea, que resulta na formação uma estrutura esférica compacta que se organiza ao redor do ovo do parasito (Boros & Warren 1970; Lenzi 1991; Lenzi et al. 2008). A formação do granuloma envolve interações dinâmicas e intrincadas entre célula-célula e célula-matriz, que sofrem profundas modificações no decorrer da infecção. Entre a quinta e sexta semanas após a infecção, percebe-se o início da mudança no perfil da resposta imunológica (**Figura 4**), sendo observado aumento de produção de citocinas do tipo-2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-13, fundamental para o desenvolvimento do granuloma. A importância das citocinas Th2 na formação do granuloma foi experimentalmente demonstrada pela significativa redução no tamanho do granuloma em camundongos geneticamente deficientes em STAT 6 (sinal transdutor e ativador de transcrição 6), essencial para o desenvolvimento da resposta Th-2, e em animais tratados com anti-IL-4 (Kaplan et al, 1998) e infectados por *S. mansoni*. Em contraste, a infecção por *S. mansoni* em camundongos geneticamente deficientes em STAT 4 (sinal transdutor e ativador de transcrição 4), fator intracelular indispensável para desencadear a resposta Th-1, não reduz o tamanho do granuloma (Mackenzie et al. 1999). Na formação do granuloma, a principal fonte de IL-4 são células T CD4⁺ diferenciadas em Th2 que são ativadas e recrutadas para o fígado e intestino, principais locais de deposição de ovos do parasito. A diferenciação de células Th2 é induzida por células dendríticas e macrófagos que reconhecem lipídios e carboidratos derivados do parasito (Pearce et al. 2004; Thomas et al. 2003; Perona-Wright et al. 2006), especialmente lacto-N-fucopentaose III (LNFPIII) encontrado em

glicoproteínas secretadas pelo ovo de *S. mansoni* (Okano et al. 1999, 2001; Thomas et al. 2003). Receptores de lectinas do tipo C (Van Die et al. 2003) e receptores do tipo Toll, como TLR-2 e TLR-4 (Van Der Kleij et al. 2002; Goodbridge et al. 2004), expressos na superfície de células dendríticas (DCs) ou outras células do sistema inato podem estar envolvidas no reconhecimento destes glicoconjugados e lipídeos secretados pelo ovo do parasito. O reconhecimento de padrões moleculares destes antígenos pelas DCs induz um processo alternativo de maturação e ativação destas células, que resulta na ausência de produção de IL-12 (Macdonald et al. 2001; Perona-Wright et al. 2006). As células dendríticas que foram ativadas por antígenos de helmintos seriam células apresentadoras de antígeno (APCs) determinantes no processo de diferenciação de linfócitos Th2. Outras células não linfocitárias, como eosinófilos (Sabin et al. 1995,1996) e basófilos (Rao et al. 2002; Scharamm et al. 2003; 2007; Lundy & Luckacs 2013) ativadas durante a infecção por *S. mansoni* podem produzir IL-4, que auxilia na regulação da produção de IL-12 e IFN- γ e estimula a diferenciação a Th2.

Após 8 semanas da infecção por *S. mansoni* em camundongos, os granulomas apresentam uma grande riqueza celular, compreendendo células migrantes e locais (fibroblastos e miofibroblastos) dispostas de maneira mais organizada, permitindo a caracterização de 3 camadas distintas: a região central que apresenta um predomínio de macrófagos, a camada medial composta principalmente por fibras arranjasdas concentricamente e a camada periférica, onde observa-se uma riqueza celular e fibras reticulares frouxamente dispostas (Weinstock & Boros 1983; Lenzi et al. 1998; Lenzi et al. 2008b). Nesta fase, denominada de granuloma exudativo-produtivo, a resposta Th2 apresenta-se altamente polarizada e bem estabelecida (Cheever et al. 2000; Pearce et al. 2004; Stadecker et al. 2004). A produção local aumentada de IL-4 e IL-13 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a expressão de MHC-II e

CD23 em monócitos/macrófagos e células B (De Waal Malefyt et al. 1993), auxiliando na amplificação da resposta Th2 e na infiltração de outros tipos celulares.

Linfócitos do tipo 2 expressam principalmente CCR3, CCR4 e CCR8 e são atraídos pela produção local de CCL11 (eotaxina), CCL17 (TARC), CCL22 (MDC) (Cjaza 2014). A migração de eosinófilos, célula que compõe 50 – 70 % da população celular nas fases iniciais da formação do granuloma (Weinstock & Boros 1983; Moore et al. 1977, Wynn et al. 2004; Reiman et al. 2006), da circulação em direção aos tecidos inflamados também é estimulada pela produção local da quimiocina CCL11. Além disso, a produção local de CCL3, CCL7, CCL17 e CCL22 também foram relacionadas ao recrutamento de eosinófilos em modelos de formação de granulomas pulmonares (Lukacs et al. 1993; Shang et al. 2002; Chensue et al. 2013).

A mudança do perfil de citocinas produzidas no sítio inflamatório afeta a produção de quimiocinas. Quiu et al. (2001), demonstraram que há uma divisão temporal na expressão de quimiocinas durante a formação do granuloma, sendo as quimiocinas CXC e algumas CC (CCL2, CCL3, CCL4-MIP-1 β) são inicialmente expressas e outras como CCL1 (TCA-3), CCL7, CCL8 (MCP-2), CCL11 e CCL20 (LARC) apresentam pico de expressão mais tardia em modelos sincronizados de granulomas pulmonares. Ainda neste modelo, a neutralização de IFN- γ resultou em diminuição da expressão das quimiocinas CXCL9-11(MIG, IP-10, I-TAC) e aumento das quimiocinas CCL4, CCL7, CCL17 e CCL22 (Chensue et al. 2013). Por outro lado, a depleção de citocinas do tipo 2, como IL-4 e IL-13, não acarretou em nenhuma alteração na produção de citocinas CXC, mas resultou em diminuição significativa da maioria das citocinas CC durante a formação do granuloma pulmonar. Estes dados indicam a importância de citocinas Th1 na expressão de quimiocinas CXC e no controle de quimiocinas CC que são induzidas pela polarização de uma resposta do tipo 2. Por outro lado, o estudo com granulomas pulmonares

revela a influencia da produção de citocinas do tipo 2 no aumento de expressão de citocinas CC (Chensue et al. 2013). Adicionalmente, Park et. (2001), além da avaliação de granulomas pulmonares, também demonstrou na formação de granulomas hepáticos induzidos por *S. mansoni* a expressão coordenada de expressão de quimiocinas durante uma resposta predominantemente do tipo 1 ou do tipo 2. Desta forma, a polarização da resposta imune resulta na mudança do perfil de produção de quimiocinas no decorrer da formação/modulação do granuloma induzido por *S. mansoni* (Chiu et al. 2002; Chiu et al. 2003; Chensue et al. 2013).

Os macrófagos são células fundamentais na formação do granuloma, além de atuar na produção de citocinas e quimiocinas, essas células também são determinantes no processo de remodelação e regeneração tecidual (Ragheb & Boros 1989; Marra et al. 2009; Fernandes et al. 2014). Os macrófagos ativados por citocinas Th-2, como IL-4 e IL-13 que são prevalentes durante a formação do granuloma, são designados macrófagos do tipo 2 (M2) ou como alternativamente ativados em comparação à ativação clássica em ambiente de citocinas Th1 (Gordon 2003; Martinez et al. 2008; Allen & Wynn 2011). Os M2 participam de muitos processos fisiológicos e patológicos e, em conjunto com fibroblastos e células T, são particularmente importantes em reparar danos teciduais causados por parasitos (Martinez et al. 2009; Allen & Wynn 2011). Os M2 são distinguidos pela alta expressão de arginase-1 (ARG1), do receptor de IL-4 (IL-4R α) e do receptor de manose (CD206), YM1 (*closely related soluble chitinase-like lectins*) que é um fator quimiotático para eosinófilos, FIZZ1/REM- α (*resistin-like secreted protein*) que possui atividade enzimática na degradação de quitina presente em larvas e ovos de helmintos (Gordon 2003; Maizels et al. 2004; Anthony et al. 2007; Mosser & Edward 2008; Wynn & Barron 2010). A enzima ARG1, produzida pelo macrófago M2, quebra L-arginina (substrato também utilizado pela enzima iNOS) resultando na produção de L-ornitina

que é convertida em prolina, aminoácido essencial envolvido na produção de colágeno (Hesse et al., 2001; Wynn 2004; Wilson et al. 2007; Murray & Wynn 2011). M2 são elementos fundamentais na reparação e remodelação tecidual característica da fase produtiva fibrótica do granuloma (Lenzi et al. 1998b; Anthony et al. 2007; Wynn 2004 e 2007). No entanto, os macrófagos M2, derivados das células de Kupffer e de monócitos circulantes e ativados no ambiente Th-2, também contribuem com o processo de fibrose (Hesse et al. 2001; Liu et al. 2004; Wynn 2004; Wilson et al. 2007). Os macrófagos produzem mediadores que ativam diretamente os fibroblastos incluindo TGF- β e PDGF (*platelet-derived growth factor*). No fígado, TGF- β promove a diferenciação de HSCs em miofibroblastos, enquanto que PDGF estimula a proliferação de HSCs (Bataller & Brenner 2005). Dependendo do seu estado de diferenciação e sinais do microambiente local, os macrófagos além de serem capazes de secretar uma variedade de fatores de crescimento e citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas, também atuam na regulação da resposta inflamatória através da produção de citocinas imunomoduladoras como IL-10 e TGF- β , (Martinez et al. 2008; Mosser & Edwards 2008). Além disso, os M2 podem regular a função de células T efetoras, em decorrência do consumo de arginina, da indução de ligantes de PD-1, um receptor inibidor da função de células T, os quais limitam a resposta de células T nos granulomas, além de recrutar células T regulatórias (Treg) e Th2 (Barron & Wynn 2011). No decorrer da infecção, os macrófagos presentes no granuloma se tornam alongados, frequentemente fusiformes e se dispõem radialmente de forma concêntrica em torno do ovo, ficando justapostos uns aos outros, formando interdigitações entre membranas que favorecem o encontro entre eles. O citoplasma se torna abundante, e adquirem aspecto de células epitelióides. Simultaneamente, os macrófagos fundem-se uns aos outros originando células gigantes multinucleadas (Pereira & Bogliolo 2000).

A resposta Th17 tem sido relacionada ao desenvolvimento de grave lesão hepática na esquistossomose experimental (Rutitzky & Stadecker 2006; Smith et al. 2011). A possível participação de Th17 no agravamento da patologia hepática provocada pelo granuloma de *S. mansoni* foi sugerida pela observação de que animais tratados com anticorpos neutralizantes anti-IL-17 apresentaram uma inibição da inflamação granulomatosa hepática e consequente melhora na patologia (Rutitzky et al. 2005). Linfócitos Th17 expressam receptores CXCR3 e CCR6 e são atraídos para o fígado pela produção das quimiocinas CXCL9, CXCL10 e CXCL11 (Czaja et al. 2014). A participação das células Th17 na patologia e na evolução das formas graves da esquistossomose em humanos ainda foi esclarecida (Abath et al. 2006; Chuah et al 2014).

Nas semanas subsequentes, ocorre uma gradual regulação da função das células T CD4⁺ e da imunopatologia, em um processo denominado imunomodulação (Andrade & Warren 1964; Boros et al. 1975). Os granulomas que se formam em torno do ovo tornam-se gradativamente menores, fenômeno mediado pela produção de IL-10 e essencial para promover a sobrevivência do hospedeiro durante a infecção (Pearce & Macdonald 2002; Wynn et al. 2004; Wilson et al. 2007; Chuah et al 2014). Em modelos de infecção natural, foi demonstrado a aumento da expressão de Foxp3, fator de transcrição de células Treg, no fígado e no baço, sendo o pico de expressão coincidindo com a modulação do granuloma. Células denominadas T regulatórias, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg produzem IL-10, citocina regulatória chave da resposta imune induzida durante a esquistossomose (Hesse et al. 2004; Wilson et al. 2007; Turner et al. 2011). As células Treg expressam CXCR3 e são atraídas principalmente pela secreção de CXCL9 durante doenças crônicas hepáticas (Czaja 2014). Estudos com animais deficientes na produção de IL-10, mostram que esta citocina pode regular a patologia por controlar a produção de citocinas Th1 e prevenir o desenvolvimento de uma resposta do tipo 2 excessiva durante a formação do

granuloma (Hoffmann et al. 2000; Hesse et al. 2004; Taylor et al. 2006). Evidências experimentais mostram que células dendríticas (DCs) e células B também produzem IL-10 (Hesse et al. 2004) e que as células Treg podem não ser a principal origem de IL-10 durante a infecção (Baumgart et al. 2006; Lundy & Lukacs 2013). Outros mecanismos podem estar envolvidos na modulação da resposta granulomatosa, entre eles a ativação de Linfócitos B regulatórios, que podem atuar tanto via produção de IL-10 como via produção de anticorpos (Cheever et al. 1985; Vas et al. 2012; Fairfax et al. 2012). Adicionalmente, estudos tem revelado que a produção do receptor solúvel IL-13, denominado de IL-13R α 2, também tem papel fundamental no controle da fibrose hepática. A produção de IL-13R α 2 atua sequestrando IL-13 antes da sua ligação com o seu receptor IL-4/IL-13R α 1 expresso na superfície celular de macrófagos e HSCs e, conseqüentemente, resulta em menor ativação celular e produção de colágeno (Chiarimont et al. 2003; Hesse et al. 2004; Wynn 2004; Wilson et al. 2007). Como a própria IL-13 induz a expressão de seu receptor, um mecanismo de *feedback* parece atuar dentro dos limites da resposta Th2 para regular potenciais danos relacionados com o processo de fibrose. Já a participação de TGF- β parece ser ainda mais complexa (Lundy e Lukacs 2013). Esta citocina exerce um efeito inibitório em macrófagos e em células de perfil Th1 em modelos experimentais (Qadir et al. 2001). Em contraste, num contexto de citocinas pró-inflamatórias, atua como um potente cofator de diferenciação de células de perfil Th17, bem como induz a produção de colágeno por fibroblastos e por isso pode ter papel no desenvolvimento da patologia (Wynn 2004).

Em resumo os dados experimentais mostram que a modulação do granuloma durante a fase crônica depende de uma ação combinada de respostas Th1, Th2, Th17 e Treg no decorrer da infecção (Hams et al. 2013). A regulação da resposta é complexa e a precisa contribuição de cada

população celular e dos elementos que medeiam o processo geral de modulação ainda é incerta (Walsh et al. 2007; Burke et al. 2009). A participação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas tem papel central na formação e modulação da resposta granulomatosa, conforme esquematizada na **Figura 5**; entretanto, sua associação com a morbidade da esquistossomose humana ainda não está claramente estabelecida.

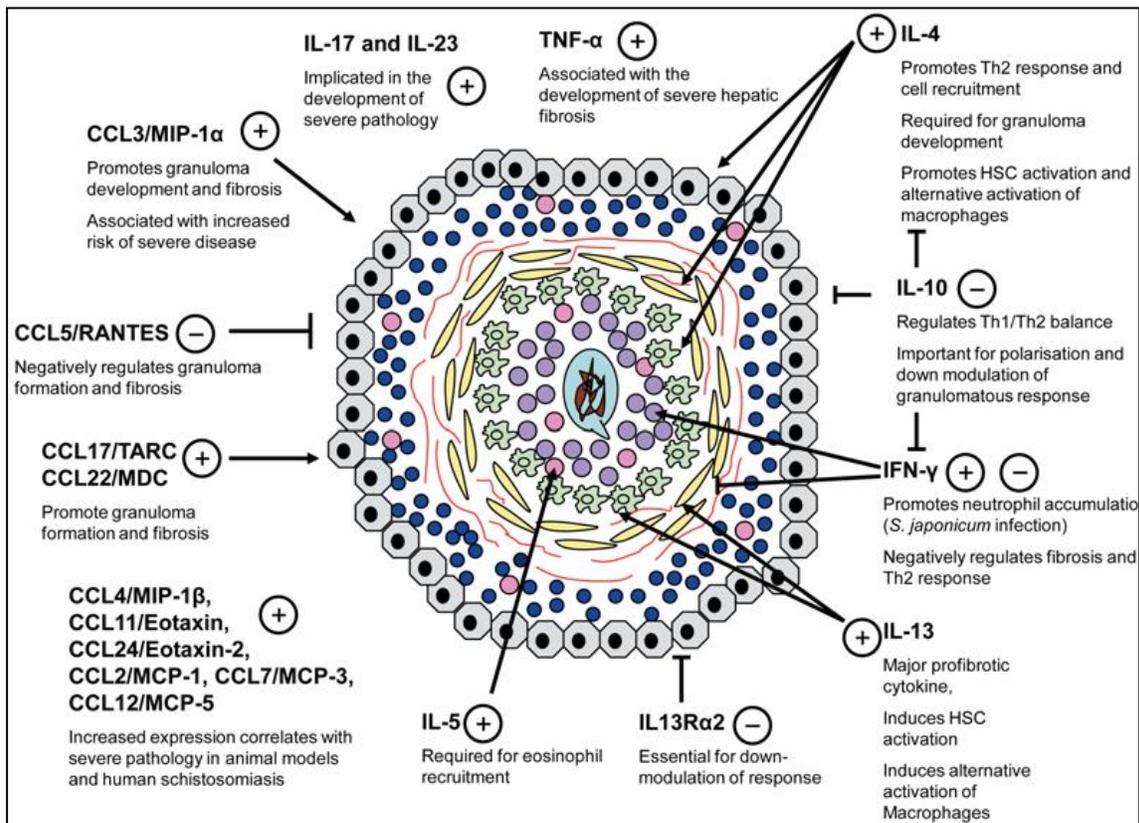


Figura 5. Principais componentes da resposta granulomatosa contra os ovos de *S. mansoni* no fígado e as principais citocinas e quimiocinas que regulam essa resposta (Fonte: Burke et al. 2009).

1.5 Granuloma: Proteção versus Patologia

A patologia da esquistossomose crônica tem sido associada à intensidade e extensão da reação celular induzida pela retenção de ovos do parasito nos tecidos do hospedeiro (Bogliolo 1958; Raso & Neves 1965; Warren 1968; Carvalho 2008; Andrade 2009). Os vermes se estabelecem no plexo venoso portal-mesentérico, e por essa razão a patologia primariamente se desenvolve nos tecidos de maior acumulação de ovos do parasito: intestino e fígado (Stadecker et al. 2001; Hams et al. 2013). Para muitos autores, a formação do granuloma constitui um importante mecanismo de defesa do hospedeiro, pois a reação celular permite a contenção da lesão tecidual causada pela secreção de enzimas, toxinas e antígenos do ovo (Boros et al. 1989; Dunne 1991; Dunne et al. 1999; McDonald et al 2002). Além disso, a formação do granuloma preserva a parede intestinal, evitando uma subsequente invasão bacteriana na circulação durante a infecção (Fallon et al. 2000). No entanto, este fato é controverso, já que o trabalho publicado por Teixeira et al. (2001), demonstrou que granulomas hepáticos podem ser focos ou substratos para abscessos piogênicos causados por *Staphylococcus aureus*. O estabelecimento de uma resposta do tipo Th2 no curso da doença previne um quadro agudo marcado pela predominância de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 que pode ser letal (Amsden et al. 1980; Dunne & Doenhoff 1983; Fallon & Dunne 1999; Rutitzky et al 2001; Macdonald et al. 2002). Linhas de pesquisa independentes têm associado à patologia da esquistossomose crônica com a persistência de um estado pró-inflamatório marcado pelo aumento de citocinas tipo Th1, como IFN- γ e TNF- α , e exacerbada inflamação granulomatosa, mediada por Th17 (Stadecker et al. 2004). Adicionalmente, a patologia da esquistossomose também tem sido relacionada à deficiência de indução de citocinas Th2 e de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (Brunet et al. 1997; Hoffmann et al. 2000; Rutitzky et al. 2001), redução de células B (Hernandez et al. 1997) e de

macrófagos alternativamente ativados (Herbert et al. 2004), que podem resultar em intensas e extensas lesões hepáticas (Stadecker et al. 2004).

O estabelecimento da resposta Th2 também é importante no processo de eliminação dos ovos. Para atingirem o lúmen do intestino e serem liberados pelas fezes, os ovos de *S. mansoni* também dependem do estabelecimento de uma reação granulomatosa, mediada por linfócitos T, para atravessar o endotélio, a membrana basal e o epitélio do intestino, onde são liberados (Pearce & Macdonald 2002). Karanja et al. (1997) demonstraram haver uma correlação entre reduzida excreção de ovos e a baixa contagem de linfócitos TCD4⁺ em pacientes portadores de imunodeficiência humana (HIV). Em modelos experimentais, os estudos realizados com camundongos deficientes em linfócitos T e B apresentaram excreção de ovos de *S. mansoni* nas fezes reduzida (Amiri et al. 1992; Ozaki et al. 1997; Fallon et al. 1999) ou retardada (Cheever et al. 1999). Conforme discutido, grande parte dos ovos que são produzidos chega à circulação portal e se depositam nos tecidos, principalmente no fígado. Por isso, a inflamação intestinal, ao facilitar a eliminação dos ovos do parasito, também atua como um mecanismo de proteção do hospedeiro.

Apesar da importância da formação do granuloma para a proteção do hospedeiro contra as lesões que o parasito pode causar aos tecidos, a resposta inflamatória formada ao redor dos ovos disseminados do parasito é fator determinante no desenvolvimento da patologia durante a fase crônica da esquistossomose. Uma resposta Th2 prolongada pode contribuir para o desenvolvimento da fibrose hepática (Cheever et al. 2000). Citocinas produzidas por células Th2 podem ser responsáveis por mediar certos aspectos da patologia associada à esquistossomose crônica, como progressão da fibrose hepática e a hepatoesplenomegalia (Cheever et al. 1987; Wynn & Cheever 1995; Hoffmann et al. 1998; Fallon et al. 2000; Andrade et al. 2009). Em

camundongos infectados por *S. mansoni*, a deficiência de produção de IL-13 (IL13^{-/-}) (Fallon et al. 2000) e dos receptores de IL-4 (IL-4 α ^{-/-}) e IL-13 (IL-13 α 1^{-/-}) (Jankovic et al. 1999; Ramalingan et al. 2008) ou mesmo o tratamento com anticorpos neutralizante anti-IL-13R α 2 solúvel (Chiaromonte et al. 1999) resultaram no desenvolvimento de fibrose hepática branda, menor morbidade e mortalidade. Além disso, IL-13 estimula a diferenciação das HSCs em miofibroblastos ativados, os quais são um dos principais elementos responsáveis pela produção de colágeno e pela fibrogênese no granuloma (Wynn & Barron 2011).

O desenvolvimento da resposta imunológica induzida pela infecção por *S. mansoni*, bem como os mecanismos de imunorregulação discutidos até o momento, foram baseados em dados obtidos com infecções experimentais realizadas principalmente em camundongos. Os mecanismos imunopatogênicos elucidados em modelos experimentais não são facilmente investigados em humanos, e por isso, o entendimento da resposta ainda está longe de estar completo. Estudos em áreas endêmicas indicam que múltiplos fatores da resposta imune estejam envolvidos no desenvolvimento das formas clínicas durante a esquistossomose crônica (Corrêa-Oliveira et al. 1998; Abath et al. 2006). Em humanos, tem sido demonstrado que a resposta imune celular e humoral está envolvida no desenvolvimento/manutenção do granuloma esquistossomótico, bem como nos eventos modulatórios durante a infecção crônica (Corrêa-Oliveira et al. 1998; Abath et al. 2006; Caldas et al. 2008; Negrão-Correa et al. 2014). Apesar de uma variabilidade no perfil de resposta em humanos, um perfil misto de resposta Th1-Th2 em resposta à SEA e SWAP, com predominância de Th1 é observada durante a fase aguda (de Jesus et al. 2002), com um predomínio de perfil Th-2 quando a infecção torna-se crônica principalmente em indivíduos com as formas intestinais e hepatointestinais (Araújo et al. 1996; Mwatha et al. 1998; Araújo et al. 2004). Além disso, acredita-se que IL-10 esteja envolvida na

regulação da resposta imune, no controle da morbidade e na modulação da resposta imune em pacientes crônicos assintomáticos (Araújo et al., 1996; Malaquias et al., 1997; Montenegro et al., 1999). No entanto, o perfil de citocinas em pacientes com hepatoesplenomegalia é mais variável (Abath et al. 2006). Desta forma é possível verificar que alguns estudos mostram associação entre pacientes com doença crônica grave com o aumento da produção de citocinas de perfil Th2, principalmente IL-13 (Montenegro et al. 1999; De Jesus et al. 2004; Teixeira-Carvalho et al. 2008), enquanto que outros estudos sugerem que a esquistossomose grave em humanos esteja associada à produção de citocinas do tipo 1 (Falcão et al. 1998; Mwatha et al. 1998).

Apesar do crescente interesse do papel de quimiocinas na determinação do processo inflamatório de diferentes patologias, a participação destes elementos na formação e modulação do granuloma esquistossomótico ainda é pouco conhecida. Trabalhos que avaliaram a cinética de formação de granulomas pulmonares sendo tem sido realizados em modelos experimentais. A neutralização de CCL17 (TARC) e CCL22 (MDC) levou a formação de granulomas menores e menor grau de fibrose (Jakubzick et al. 2004). O aumento dos níveis das quimiocinas CCL2, CCL3, CCL4, CCL7, CCL11 e CCL12, e os receptores de quimiocinas CCR1, CCR2, CCR3 e CCR4, CCR5 também foram associados à formação/modulação do granuloma esquistossomótico (Quiu et al. 2001; Park et al. 2001; Chiu & Chensue 2002; Chiu et al. 2003; Souza et al. 2005; Souza et al. 2011). Por outro lado, a produção de CCL5 regula negativamente a formação de granulomas experimentais (Chensue et al. 1999; Souza et al. 2008). Estudos do nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que a produção de anticorpos está relacionada com a gravidade da doença humana (Negrão-Corrêa et a. 2014) e a participação quimiocinas e receptores de quimiocinas (Souza et al. 2005 e 2011) e de citocinas pró-inflamatórias (Rodrigues et al. 2009) no desenvolvimento da doença grave em modelos experimentais. No entanto, participação de

quimionas e de citocinas pró-inflamatórias na formação do granuloma e na evolução da esquistossomose humana ainda é pouco conhecida (Falcão et al. 2002; Souza-Pereira et al. 2006; Silveira-Lemos et al. 2010) e será foco deste estudo.

2. JUSTIFICATIVA

Apesar das evidências da importância da resposta imune na evolução da esquistossomose, o papel de citocinas pró-inflamatórias e das quimiocinas na formação do granuloma e evolução da patologia grave em humanos ainda é pouco explorado. Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostram que quimiocinas, como CCL3 e outros ligantes do receptor CCR5, bem como citocinas pró-inflamatórias (Soares et al. 2005 e 2011, Rodrigues et al. 2009) são determinantes na evolução da esquistossomose grave em modelos murinos. Entretanto, a associação destes marcadores inflamatórios com a morbidade da esquistossomose na população humana naturalmente infectada ainda é pouco conhecida. Grande parte dos estudos que avaliam a participação de quimiocinas na durante a infecção por *S. mansoni* foi realizada em modelos de granuloma induzido no pulmão. O fígado é um órgão complexo e clinicamente relevante durante a infecção por *S. mansoni* no qual residem muitas células especializadas em direcionar a inflamação local que é caracterizada por uma resposta granulomatosa fibrótica crônica. Assim modelos de formação de granulomas hepáticos devem ser mais bem caracterizados, já que a formação de granulomas neste órgão é clinicamente determinante na morbidade da esquistossomose. Também não temos uma informação mais detalhada de quais células são ativadas pela quimiocina CCL3 e/ou pela ativação do receptor CCR5 a sua influência durante a formação e modulação do granuloma induzido por ovos de *S. mansoni*. Assim, nosso objetivo será investigar a associação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas com a gravidade da esquistossomose humana e avaliar a participação da quimiocina CCL3 e o receptor CCR5 na formação e ativação celular do granuloma hepático, caracterizando o efeito da produção de quimiocinas na ativação celular no granuloma hepático durante a evolução da esquistossomose em modelos experimentais.

3. CAPÍTULO I:

Associação entre os níveis das citocinas inflamatórias MIF e TNF- α e das quimiocinas CCL3, CCL7 e CCL24 com a patologia da esquistossomose em população naturalmente infectada.

3.1. Introdução

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*. Entre as espécies que infectam o homem, *Schistosoma mansoni* é a principal causadora da doença hepato-intestinal que afeta mais de 100 milhões de pessoas residentes na África sub-Saariana, no Caribe e na América do Sul, incluindo o Brasil (Crompton 1999; Gryssels et al. 2006; Hotez et al. 2008). *S. mansoni* alcança a maturidade após atingir o sistema porta-hepático do hospedeiro definitivo e os vermes acasalados migram para as veias mesentéricas, onde as fêmeas eliminam centenas de ovos diariamente. Apenas 40 % dos ovos produzidos pela fêmea atravessam o endotélio e a mucosa intestinal e são eliminados pelas fezes do hospedeiro (Pearce & MacDonald 2002; Wynn et al. 2004). O restante dos ovos fica retido nos tecidos, principalmente intestino e fígado, induzindo uma resposta celular do tipo granulomatosa que causa efeitos patológicos locais e sistêmicos. A formação do granuloma esquistossomótico é processo dinâmico que inicialmente promove a migração e acumulação de células inflamatórias, especialmente linfócitos, macrófagos e eosinófilos, ao redor dos ovos do parasito em resposta as lesões teciduais e ativação de células residentes. As células infiltradas estimulam a diferenciação e ativação de miofibroblastos e macrófagos M2, intensificando a produção de matriz extracelular e deposição de colágeno, que culmina na formação do granuloma. O granuloma sequestra os ovos do parasito e seus produtos, que são lesivos ao tecido (Boros et al. 1989; Dunne 1991; Dunne et al. 1999; Mcdonald et al 2002), mas a intensificação deste processo causa fibrose e, conseqüentemente, evolução dos quadros graves da esquistossomose crônica (Cheever et al. 1987; Wynn & Cheever 1995; Hoffmann et al. 1998; Fallon et al. 2000; Andrade et al. 2009).

Estudos experimentais demonstraram que a formação do granuloma é dependente da indução da resposta Th-2 e sua modulação durante a fase crônica da esquistossomose tem a participação de IL-10 (Pearce et al. 1991; Cheever et al. 1998; Pearce & MacDonald 2002). Estudos epidemiológicos também indicam que em pacientes infectados por *S. mansoni* níveis elevados de IL-5 e IL-13 foram associados com aumento da fibrose hepática (Henri et al. 2002; Booth et al. 2004; De Jesus et al. 2004), enquanto que altos níveis de IFN- γ e IL-10 protegem contra fibrose (Malaquias et al. 1997; Falcão et al. 1998; Correa-Oliveira et al. 1998; Henri et al. 2002; Booth et al., 2004), sugerindo que fatores imunológicos possam ser biomarcadores de morbidade de esquistossomose. Entretanto, a maioria das citocinas é produzida localmente e tem uma meia vida curta, dificultando a mensuração adequada no sangue dos indivíduos infectados.

Apesar da sua importância no estabelecimento da resposta imunológica, a participação das quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias na determinação da fibrose hepática e consequente evolução da esquistossomose grave em populações naturalmente infectadas ainda não foi bem esclarecido (Wynn et al. 2004; Burke et al. 2009; Chuah et al. 2014). A liberação de antígenos por ovos de *S. mansoni* retidos nos sinusóides hepáticos induz a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α (*tumor necrosis factor- alpha*) e MIF (*Macrophage migration inhibitory factor*). Em modelos experimentais, a produção de TNF- α induz recrutamento celular durante a formação do granuloma ao redor do ovo (Amiri et al. 1992; Lukacs et al. 1994; Cheever et al. 1999; Bogliolo 2000) e a neutralização desta citocina resulta na redução do tamanho do granuloma hepático em camundongos infectados com *S. mansoni* (Joseph & Boros 1993). Entretanto, o papel de TNF- α na esquistossomose humana ainda é controverso; níveis elevados de TNF- α , ou dos receptores solúveis sTNF-RI e sTNF-RII, em pacientes infectados por *S. mansoni* foram associados à hepatoesplenomegalia (Zwingerberger, 1990; Mwatha et al.

1998). Adicionalmente, a produção elevada de TNF- α por células sanguíneas re-estimuladas por antígenos do parasito foi associada ao aumento do risco de desenvolver fibrose hepática em pacientes com esquistossomose em áreas endêmicas da África (Booth et al. 2004; Henri et al. 2002) e do Brasil (Silva-Teixeira et al. 2004). No entanto, Magalhães et al. (2004) e Alves-Oliveira et al. (2006) não encontraram nenhuma relação entre o aumento dos níveis de TNF- α com o desenvolvimento de fibrose ou outros fatores de morbidade da esquistossomose. Além de TNF- α , MIF (*Macrophage Inhibitory Factor*) é uma citocina pró-inflamatória, evolutivamente conservada e constitutivamente produzida por uma grande variedade de tipos celulares, que apresenta papel fundamental na indução e regulação de doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatoide, colite, diabetes e câncer (Lue et al. 2002; Calandra et al. 2003; Sanchez-Samora et al. 2014). Estudos indicam que a produção de MIF, direta ou indiretamente, promove a expressão ou produção de outras moléculas pró-inflamatórias, incluindo a citocina TNF- α , e atua na regulação de macrófago, linfócitos T e B (Calandra et al. 1994; Calandra et al. 1995; Bacher 1997; Donnely et al. 1997; Kleemann et al. 2000; De Jong et al. 2001), sendo determinante no balanço Th1/Th2 durante o processo inflamatório (Sabroe et al. 2000; Bach et al. 2008). A possível participação da produção de MIF na esquistossomose ainda não está claramente determinada. Em modelo experimental murino foi verificado aumento da produção de MIF durante a formação do granuloma induzido por *S. mansoni* (Weinstock et al. 1983); posteriormente, foi demonstrada a importância da produção de MIF no recrutamento e sobrevivência de eosinófilos para o granuloma hepático durante a fase aguda da esquistossomose experimental (Magalhaes et al. 2009). Trabalhos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa (Rodrigues et al. 2009) indicam que MIF também afeta o recrutamento e ativação de células mononucleares e a manutenção ou amplificação da resposta do tipo-2 durante a formação

do granuloma esquistossomótico em camundongos. Entretanto, a participação de MIF, na morbidade da esquistossomose humana ainda não foi avaliada.

O recrutamento, a retenção e a modulação do granuloma são determinados pela ação combinada de citocinas e quimiocinas, sendo demonstrado que polarização da resposta do tipo-2 inibe quimicinas CXC e estimula produção de CC (Chiu et al. 2002; Chiu et al. 2003; Almadi et al., 2011; Chensue et al., 2013). Desta forma, o perfil de quimiocinas produzido pelo hospedeiro pode refletir a produção de citocinas, além de ser determinante na evolução da morbidade da esquistossomose. As quimiocinas CC são detectadas em sítios inflamatórios e são as maiores quimoatraentes para células T, células B, monócitos, eosinófilos e basófilos (Charo et al. 2006; Wasmuth et al. 2010). Entre as quimiocinas do grupo CC, CCL3, um dos ligantes dos receptores CCR1 e CCR5, tem sua produção aumentada desde as fases iniciais da formação do granuloma e se mantém nas fases mais tardias da resposta granulomatosa (Quiu et al. 2001; Chiu et al. 2003; Chensue et al. 2013). A produção de CCL7, que se liga aos mesmos receptores de CCL3 (CCR1 e CCR5) e também aos receptores CCR2 e CCR3, tem sua produção aumentada nos primeiros dias de retenção do ovo no pulmão (Quiu et al. 2001; Chiu et al. 2003; Park et al. 2001) e, conjuntamente com CCL2 e CCL12, pode ser responsável pelo recrutamento de macrófagos/monócitos que ocorre nas fases iniciais da formação do granuloma (Oldis et al. 1981; Chiu et al. 2004). A polarização da resposta Th-2 no final da fase aguda da esquistossomose além de estimular a produção de quimiocinas da família MCP (proteína quimiotática de monócitos), também estimula a produção das eotaxinas 1 e 2 (CCL11 e CCL24), que promovem o recrutamento de linfócitos Th2 e eosinófilos (Zimmermann et al. 2003). Estudos realizados em modelos de granulomas pulmonares demonstram a participação de CCL7 e CCL11 no recrutamento de células que expressam o receptor CCR3, como os eosinófilos (Chiu

et al. 2002; Chiu et al. 2003; Shang et al. 2002). No modelo natural de infecção, durante a formação de granuloma hepático em camundongos infectados por *S. japonicum*, a expressão CCL3 foi aumentada a partir da deposição de ovos no fígado, sendo maior entre 6-7 semanas da infecção, enquanto que a expressão de CCL7 foi maior em fases mais tardias da resposta granulomatosa, coincidindo com o pico da resposta do tipo-2 e com a deposição de colágeno no tecido (Burke et al. 2010). A produção de CCL24, agonista específico para CCR3, é aumentada em ambientes com predominância de resposta do tipo-2 (Silveira-Lemos et al. 2008), sendo importante no recrutamento e ativação de eosinófilos, basófilos e linfócitos Th2. Burke et al. (2010) demonstraram o aumento da expressão de CCL24 nas fases iniciais de formação de granuloma induzido por *S. japonicum*, associada ao recrutamento de eosinófilos, e sua produção se manteve durante as fases mais tardias, enquanto que a produção de CCL11 apresentou pico de expressão tardia. Porém, ainda não se conhece sobre a sua participação na evolução de quadros crônicos da infecção tanto em modelos experimentais quanto em humanos.

Estudo realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a infecção por *S. mansoni* em camundongos geneticamente deficientes na produção de CCL3 (Souza et al. 2005) ou no receptor CCR5 (Souza et al. 2011), altera significativamente a composição celular (eosinófilos e macrófagos), o teor de hidroxiprolina e o tamanho do granuloma hepático, sugerindo impacto na morbidade da esquistossomose. Apesar dos estudos granuloma esquistossomótico, relativamente é pouco conhecido sobre o papel de quimiocinas e seus receptores em pacientes naturalmente infectados por *S. mansoni*, e principalmente seu papel na morbidade da doença (Chuah et al., 2014; Falcão et al. 2002; Souza et al., 2005; Silveira-Lemos et al., 2010). Souza et al. (2005) e Falcão et al. (2002) demonstrarem que há aumento dos níveis plasmáticos de CCL3 em pacientes com doença crônica, de área endêmica com altas taxas de

infecção. Silveira-Lemos et al. (2010) relataram que em indivíduos infectados durante a fase aguda da infecção em comparação com indivíduos não infectados, há um aumento da produção de CCL11 e de CCL24. Entretanto, a influencia de quimiocinas na patologia induzida pela infecção por *S. mansoni* ainda é pouco conhecida (Burke et al. 2009; Chuah et al. 2013). Desta forma, pretende-se investigar a associação das quimiocinas CCL3, CCL7 e CCL24 e as citocinas pró-inflamatórias MIF e TNF- α com a morbidade da esquistossomose em população naturalmente infectada.

3.2. OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo geral

Avaliar possíveis associações entre a concentração plasmática de citocinas inflamatórias MIF e TNF- α e das quimiocinas CCL3, CCL7 e CCL24 e a morbidade da esquistossomose em população de área endêmica infectada por *S. mansoni*.

3.2.2. Objetivos específicos primeira etapa (capítulo I)

(1) Quantificar os níveis plasmáticos da citocina pró-inflamatória MIF e do receptor solúvel de TNF- α (sTNF-R1) nos pacientes com esquistossomose clinicamente definida por ultrassonografia;

(2) Quantificar os níveis plasmáticos das quimiocinas CCL3, CCL7 e CCL24 nos pacientes com esquistossomose clinicamente definida por ultrassonografia;

(3) Avaliar a associação da concentração de citocina pró-inflamatória (MIF, TNF- α) e de quimiocinas (CCL3, CCL7, CCL24) com a carga parasitária dos pacientes selecionados para o estudo;

(4) Avaliar a associação da concentração de citocina pró-inflamatória (MIF, TNF- α) e das quimiocinas (CCL3, CCL7, CCL24) alterações clínicas dos pacientes selecionados para o estudo;

(5) Avaliar a associação da concentração de citocina pró-inflamatória (MIF, TNF- α) e das quimiocinas (CCL3, CCL7, CCL24) com a organometria (baço e fígado) e com o espessamento periportal e perivesicular medidos através de exame de ultrassom abdominal dos pacientes selecionados para o estudo.

3.3. MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1. Área de Estudo

Os 97 indivíduos infectados por *S. mansoni* avaliados no presente estudo foram selecionados entre os participantes originalmente examinados em um estudo seccional de esquistossomose, denominado de Projeto Queixadinha, realizado entre residentes no Vale do Jequitinhonha, região nordeste de Minas Gerais (Lambertucci et al., 2001). O projeto Queixadinha realizou exame clínico e parasitológico de 741 indivíduos infectados em várias comunidades rurais do Vale do Jequitinhonha. Na ocasião da coleta das amostras, não foram reportados casos de malária nas regiões investigadas e os indivíduos foram sorologicamente negativos para *Leishmania*.

Para o atual estudo foi aleatoriamente selecionada a comunidade rural de Córrego do Choro, uma das comunidades rurais avaliadas no Projeto Queixadinha, localizada no Município de Padre Paraíso, situado na região do Médio Jequitinhonha, a 102 Km de Teófilo Otoni, no nordeste de Minas Gerais. A localidade contabilizava 140 indivíduos comprovadamente infectados por *S. mansoni*, sendo que para as análises imunológicas do presente estudo, foram excluídas as crianças (≤ 13 anos) e os idosos acima de 70 anos, na tentativa de minimizar aspectos da resposta imune de idosos e crianças não diretamente relacionados com a esquistossomose (Speziali et al. 2004). Também foram selecionados para o presente estudo somente pacientes com amostra de plasma que não havia sido previamente descongelada, totalizando 97 pacientes de 14 a 68 anos.

3.3.2. Coleta de dados

A metodologia utilizada para a coleta de dados foi previamente descrita em detalhes por Lambertucci et al (2001). Em resumo, aos indivíduos participantes do estudo, foi aplicado um

questionário para a coleta de informações sócio-econômicas e da história clínica associada à esquistossomose. As entrevistas foram realizadas por estudantes previamente treinados para a obtenção das informações, as respostas foram codificadas e os resultados armazenados em bancos de dados criados para o Projeto Queixadinha.

A verificação da infecção por *S. mansoni* nos indivíduos examinados, bem como a estimativa de carga parasitária foi realizada através do método coproscópico de Kato-Katz (Katz et al. 1972). Para tanto foram coletadas duas amostras fecais de cada participante em dias alternados e foram examinadas duas lâminas por amostra. Os resultados foram incluídos no banco de dados após a devida conversão para número de ovos por grama de fezes (OPG).

A avaliação clínica dos indivíduos infectados incluiu um exame físico geral e relatos de tratamento prévio de esquistossomose. A palpação abdominal do fígado e do baço foi realizada com os pacientes em decúbito dorsal, durante respiração profunda, por dois médicos experientes. Foram considerados palpáveis, quando a borda foi sentida abaixo do rebordo costal esquerdo pelos dois examinadores (Tavares-Neto & Prata 1990). A avaliação ultrassonográfica (US) foi realizada pela equipe de clínicos da Faculdade de Medicina da UFMG que participaram do Projeto Queixadinha, empregando-se o equipamento Hitachi EUB 200 e seguindo a metodologia descrita anteriormente (Coutinho 1990; Lambertucci et al. 2000). A quantificação da carga parasitária, os dados clínicos e ultrassonográficos dos pacientes examinados no projeto Queixadinha também foram armazenados em bancos de dados.

No presente estudo, a morbidade dos indivíduos selecionados foi classificada por aspectos clínicos e pelo método quantitativo definido pelo protocolo de Niamey (proposto em 1996 e revisto por Richter et al. 2000 e 2001), envolvendo as medidas obtidas pelo exame ultrassonográfico do tamanho do baço e do fígado, diâmetro e espessura da parede da veia porta

no seu vaso principal e em suas ramificações e da parede da vesícula biliar obtidas a partir do banco de dados do Projeto Queixadinha.

3.3.3. Dosagem citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas no plasma dos indivíduos selecionados

Durante a avaliação clínica dos indivíduos examinados pelo Projeto Queixadinha, foi coletada uma amostra de 5 ml de sangue venoso de cada indivíduo em tubo *Vacutainer* com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O plasma foi devidamente separado, rotulado, estocado a -20°C e utilizados para os testes imunológicos realizados no presente estudo. Também foram recolhidas amostras de plasma de 8 indivíduos voluntários não infectados de área não endêmica para controle negativo da quantificação plasmática de citocinas e quimiocinas.

A concentração da citocina MIF e do receptor solúvel de TNF- α , sTNF-R1, foram determinadas nas amostras de plasmas dos indivíduos através da técnica de ELISA sanduíche, utilizando-se Kit DuoSet da R&D Systems, seguindo as instruções do fabricante para a realização do ensaio. No presente estudo, a quantificação de TNF- α foi indiretamente estimada pela concentração do receptor solúvel de TNF- α do tipo-1. Estudos realizados em pessoas tratadas com recombinante de TNF- α mostram que o aumento sérico dessa citocina induz a produção de receptores solúveis do tipo 1 e 2, que apresentam meia vida mais longa facilitando a sua detecção (Lantz et al. 1990). Relação direta entre o aumento da concentração de TNF- α e do receptor solúvel de TNF- α do tipo-1 também foi demonstrado durante a infecção por *S. mansoni* (Hasseb et al. 2001).

Para a dosagem de CCL3, CCL7 e CCL24, as amostras de plasma foram submetidas a um processo de precipitação proteica, conforme descrito anteriormente por Falcão et al. (2002). O procedimento é importante para preservar as quimiocinas, melhorando a especificidade dos ensaios de ELISA. Em 200µl de plasma foram adicionados 200 µl de solução de ácido tricloracético 20% em NaCl 1,35M. A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por cinco minutos. Após este período, o precipitado foi sedimentado pela centrifugação a 10 000g por 5 minutos a 4°C e 300µl do sobrenadante foi coletado e adicionados 1200 µl de tampão neutralizante (0,5ml de tampão NaPO₄ 1M pH7,4; 0,45ml de NaOH 1M; 50µl vermelho de fenol 10mg/ml completados para 50 ml com água destilada). As amostras que permaneceram ácidas ou básicas foram neutralizadas conforme o pH para um valor próximo a 7,4 de acordo com a coloração do indicador vermelho de fenol. A dosagem das concentrações plasmáticas das quimiocinas dos participantes do estudo foi realizada pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando-se Kit DuoSet da R&D Systems, seguindo as instruções do fabricante para a realização do ensaio.

3.3.4. Processamento e análise de dados

As variáveis de interesse para este estudo foram selecionadas no banco de dados original. Para o presente estudo, as variáveis obtidas através das análises imunológicas foram acrescentadas ao banco de dados. As bases de dados foram geradas utilizando EPI-INFO versão 6.04, e análises estatísticas foram realizadas utilizando STATA versão 11.0 software (Stata Corporation, 2010). Testes de normalidade foram determinados com o teste de Shapiro-Wilk. As médias das variáveis quando categorizadas foram comparadas pelo teste T de Student ou análise variância (ANOVA) e os testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis foram utilizados para comparação de medianas. A análise de regressão linear foi utilizada para avaliar a associação

entre as variáveis repostas, cada quimiocina ou citocina, e as co-variáveis coletadas, presente no banco de dados (fatores sociais ou demográficos, análise clínica, medidas ultrassonográficas e carga parasitológica). Análise de correlação foi empregada nos testes em que as diferenças foram significativas. As variáveis com valores de $p < 0,25$ foram selecionadas para a construção do modelo de regressão linear múltipla. Além disso, variáveis com baixa frequência e que mostraram co-linearidade foram excluídos da análise multivariada. Modelos completos foram construídas com todas as variáveis dependentes selecionadas na análise univariada, partindo-se do modelo completo e descarte sucessivo das variáveis não significativas. As variáveis que permaneceram no modelo foram aquelas estatisticamente significativas com intervalo de confiança (IC) de 95% e valor de $p < 0,05$. Homocedasticidade dos modelos finais foi testada para a validação do modelo final de regressão linear multivariado, através da análise dos resíduos.

3.3.5. Considerações Éticas

O consentimento dos indivíduos foi obtido no estudo original, antes da realização dos exames e após o esclarecimento de todo procedimento mediante assinatura de um termo de consentimento. Os resultados dos exames foram encaminhados pessoalmente ou entregues ao Serviço Municipal de Saúde. Os pacientes receberam tratamento específico para esquistossomose, Oxaminiquina oral na dosagem única de 15mg/Kg para adultos e 20mg/Kg para crianças. No presente trabalho, a utilização das amostras de plasma para quantificação de imunoglobulinas (Negrão-Correa et al., 2014), citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas foi considerada extensão do projeto Queixadinha, sendo aprovada pelo (COEP- UFMG), conforme protocolo ETIC 274/05.

4.4. RESULTADOS

4.4.1. Características da população e da infecção

Dentre os 97 indivíduos infectados selecionados para o estudo atual 48,5% são homens e 51,5% mulheres com uma distribuição homogênea em relação à idade ou faixa etária. Não houve diferença significativa entre a proporção de homens e mulheres ou entre a distribuição de indivíduos nas diferentes faixas etárias ($p > 0,05$). Entre os indivíduos examinados 32 (33%) relataram tratamentos prévios para esquistossomose (**Tabela 1**). Dos 97 indivíduos infectados, 76 (79%) apresentaram menos de 100 ovos eliminados por grama de fezes, com média de 89,5 por grama de fezes (OPG) \pm 169,5 e mediana de 36 ovos/g fezes, sendo caracterizada como área de baixa intensidade de infecção (WHO 2002). Na população em estudo, não houve diferença estatística entre carga parasitária em relação ao sexo, à idade ou a faixa etária dos pacientes selecionados nesta área (**Tabela 1**). Também não foi verificada diferença na carga parasitária em relação aos pacientes que receberam ou não receberam tratamento específico para esquistossomose anteriormente (**Tabela 1**).

Tabela 1. Características da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.

Características	Números	Carga Parasitária OPG	P
Sexo			
Homens	47 (48,5%)	88,6 ± 147,69	0,487
Mulheres	50 (51,5%)	90,4 ± 189,3	
Idade			
14-19	27 (27,8%)	137 ± 283	0,774
20-29	18 (18,6%)	61 ± 101	
30-39	21 (21,7%)	56 ± 73	
40-49	14 (14,4%)	96 ± 120	
50-68	17 (17,5%)	82 ± 83	
Tratamento			
Sim	32 (33%)	88,5 ± 160,7	0,917
Não	65 (67%)	89,9 ± 174,9	

O valor de p foi calculado através do teste de Mann-Whitney e pelo teste de Kruskal-wallis seguido pelo teste de Dunns.

4.4.2. Dados clínicos e ultrassonográficos

O exame clínico revelou que 7,2% dos 97 indivíduos examinados apresentaram hematêmese, em 2,1% foi constatada presença de veias colaterais e 9,3% pacientes (9 indivíduos) apresentaram baço palpável, e dentre eles, 4 também apresentaram consistência dura. Além das alterações sistêmicas e esplênicas, 50 (51,6%) pacientes apresentaram hepatomegalia, entre os quais 20% com alteração na consistência do órgão (fígado duro ou endurecido), 8% tinham alterações de contorno do órgão (fígado rugoso) e 4% dos pacientes apresentaram fígado nodular (**Tabela 2**).

Tabela 2. Características Clínicas da população de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.

Avaliação clínica	Tipo	Número (n=97)	Porcentagem
Hematemese (n=97)	Sim	7	(92,8%)
	Não	90	(7,2%)
Veias Colaterais (n=97)	Ausentes	95	(97,9%)
	Alteradas	2	(2,1%)
Baço (n=97)	Normal	88	(90,7%)
	Palpável	9	(9,3%)
Fígado (n=97)	Normal	47	(48,4%)
	Palpável	50	(51,6%)
Contorno Fígado (n=50)	Liso	46	(92%)
	Rugoso	4	(8%)
Superfície do fígado (n=50)	Lisa	48	(96%)
	Nodular	2	(4%)
Consistência do Fígado (n=50)	Normal	40	(80%)
	Endurecida e dura	10	(20%)

A descrição das medidas contínuas obtidas durante o exame de ultrassom abdominal está resumida na **Tabela 3**. Foi obtida a média $84,6 \pm 26,7$ mm e mediana de 85 mm para a medida do tamanho do baço (longitudinal). Entre os parâmetros hepáticos, constatou-se que o tamanho longitudinal do lado direito do fígado teve média $119,6 \pm 17,8$ mm com mediana de 119 mm, já o lobo esquerdo do fígado teve média de $97 \pm 18,5$ mm com mediana de 96 mm. O diâmetro da veia porta determinado pela ultrassonografia, variou de 5 a 15 mm com mediana de 10 mm e média $9,6 \pm 2,2$ mm, e a espessura da parede da veia porta na bifurcação, variou de 2 a 8 mm, com mediana igual a 4 mm. A medida da espessura da parede da vesícula biliar apresentou

mediana de 3 mm e média $3,5 \pm 1,1$ mm. As medidas organométricas e de espessamento fibroso foram analisadas em sua forma contínua e também categorizadas (**Tabela 3**) conforme recomendado pelo protocolo de Niamey 1996 e revisto por Richter et al. (2000 e 2001) após ajuste pela média de altura, que na população da área de estudo teve média de $1,57 \pm 9,8$ m. A categorização das medidas ultrassonográficas foi realizada da seguinte forma: Tamanho longitudinal do baço <120 mm e ≥ 120 mm; Tamanho do fígado <85 mm e ≥ 85 mm; Tamanho longitudinal lobo esquerdo <90 mm e ≥ 90 mm; Tamanho longitudinal lobo direito; Diâmetro da veia porta <11 mm e ≥ 11 mm; Espessura da veia porta no seu vaso principal <6 mm e ≥ 6 mm; Espessura parede veia porta bifurcações secundárias <5 mm e ≥ 5 mm; Espessura da parede da vesícula biliar <4 mm e ≥ 4 mm.

Foi constatado que somente 4 pacientes (4,1%) apresentaram baço maior que 120 mm, medida considerada como alterada na população em estudo. A categorização das medidas do tamanho do fígado demonstrou que 72,2% (n=70) dos pacientes apresentaram aumento no tamanho do lobo esquerdo (comprimento acima de 85 mm), enquanto 27,8% dos pacientes (n=27) apresentaram valores normais. Diferentemente do lobo esquerdo em que se constatou aumento do lobo em decorrência da infecção crônica, no lobo direito do fígado observa-se uma redução, e medidas comprimento inferior a 85 mm na população de estudo foram considerados alteradas. Dentre os indivíduos examinados 4,2 % (n=4) apresentaram alterações. Pacientes com aumento de baço e diminuição do lobo direito do fígado podem ser classificados como hepatoesplênicos, ou seja, apresentam o quadro mais grave da esquistossomose. As medidas de espessamento de veia porta e suas ramificações e da vesícula biliar foram utilizadas como indicativo de fibrose na população infectada. Entre os indivíduos examinados 32% dos indivíduos (33 pacientes) apresentaram aumento do diâmetro da parede da veia porta, 41,3% (40

pacientes) tiveram a espessura da veia porta aumentada e 31,6% (30 pacientes) apresentaram a espessura da parede da veia porta aumentada na sua bifurcação. A mensuração da parede da vesícula biliar revelou que 40,2% (39 pacientes) dos indivíduos apresentaram a espessura da vesícula biliar aumentada, ou seja, com espessura maior ou igual a 4 mm. Portanto, na população avaliada apenas 4 pacientes apresentaram a forma clínica hepatoesplênica da esquistossomose, mas uma proporção superior a 30% dos indivíduos selecionados para o estudo apresentou algum sinal de fibrose, como espessamento periportal e perivesicular conforme demonstrado na **Tabela 3**.

Tabela 3. Categorização segundo Richter et al. 2001 das medidas organométricas obtidas pela avaliação ultrassonográfica dos pacientes de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. O valor de p foi calculado através do teste de Mann-Whitney.

Órgão (Tamanho em mm)	Tamanho (mm) Média ± DP	N (%)	Carga parasitária Ovos/g fezes Médias ± DP	Valor de p
Baço – Tamanho Longitudinal	84.6 ± 26.7			0.280
<119		93 (95,9%)	84,37 ± 167,3	
≥120		4 (4,1%)	208,8 ± 203,9	
Fígado – Lobo esquerdo	97.0 ± 18.5			0.458
<85		27 (27.8)	68.5 ± 81.6	
≥85		70 (72.2)	97.6 ± 192.9	
Fígado- Lobo direito	119.6 ± 17.8			0.957
<90		4 (4.17)	82.5 ± 41.1	
≥90		92 (95.83)	87.1 ± 171.9	
Espessura parede veia porta	5.3 ± 2.0			0.481
<6		57 (58.7)	106.6 ± 207	
≥6		40 (41.3)	65.2 ± 89.1	
Diâmetro veia porta	9.6 ± 2.2			0.238
<11		65 (67.0)	74.2 ± 168.9	
≥11		32 (33.0)	120.5 ± 169.2	
Espessura parede veia porta Ramificações secundárias	4.14 ± 1.17			0.488
<5mm		65 (68.4)	83.0 ± 191.0	
≥5mm		30 (31.6)	109.3 ± 116.0	
Vesícula biliar – Espessura parede	3.5 ± 1.1			0.259
<4mm		57 (58,8%)	106,7 ± 207,4	
≥4mm		39 (40,2%)	66,5 ± 89,6	
Ignorado		1 (1,0%)		

Conforme pode ser verificado na **Tabela 3** e na **Figura 6**, não houve associação significativa entre carga parasitária (medida pelo número de ovos do parasito eliminado nas fezes e convertida em OPG) e as medidas ultrassonográficas categorizadas, sugerindo que na população em estudo, a carga parasitária não influenciou no desenvolvimento de fibrose.

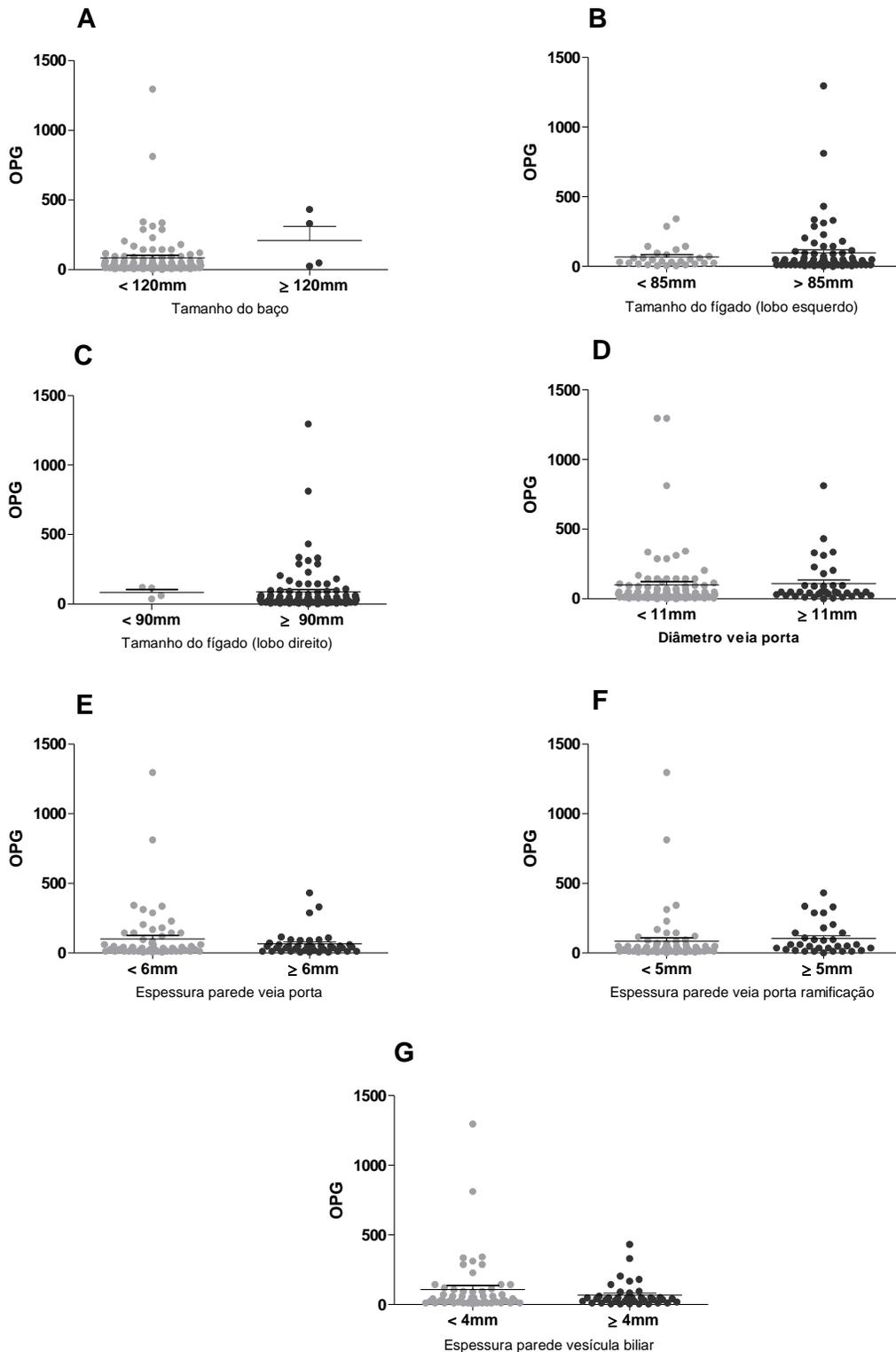


Figura 6. Medidas ultrassonográficas categorizadas pelo Protocolo de Niamey 1996, conforme Richter et al. (2000 e 2001) e carga parasitária medida pelo número de ovos do parasito eliminados por grama de fezes (OPG) dos pacientes de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. (A) Tamanho longitudinal do baço, (B) Tamanho longitudinal do lobo esquerdo do fígado (C) Tamanho longitudinal do lobo direito do fígado, (D) Diâmetro da Veia Porta, (E) Espessura da parede da veia porta no hilo, (F) Espessura da parede da veia porta na bifurcação e (F) Espessura da parede da vesícula biliar. As ultrassonografias foram realizadas em pacientes com exame parasitológico positivo em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney.

4.4.3. Níveis da citocina MIF e do receptor solúvel de TNF- α (rTNFR1) na população de Córrego do Choro

Dos 97 pacientes selecionados, 9 indivíduos não possuíam amostras de plasma congeladas para a dosagem de citocinas e quimiocinas, portanto, realizou-se a análise com 88 indivíduos infectados por *S. mansoni*, residentes em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. A concentração de MIF e de rTNF-R1 no plasma de indivíduos portadores de esquistossomose e dos controles não infectados está esquematizada na **Figura 7**. A concentração de MIF no plasma, quantificada pela técnica de ELISA, nos indivíduos infectados examinados neste estudo teve valor médio de 5856 pg/ml \pm 4097 pg/ml e mediana de 4960 pg/ml, valor estatisticamente maior em relação ao grupo de indivíduos controle que não apresentavam a infecção. Não foi observada diferença estatística na concentração de MIF entre homens e mulheres infectados, ou entre pacientes com diferentes faixas etárias. A concentração de MIF também foi semelhante entre os indivíduos infectados que relataram contato constante com coleções hídricas e aqueles que não possuíam histórico de contato, e entre os pacientes que relataram ter sido submetido ao tratamento para esquistossomose em relação aos indivíduos que não haviam sido tratados anteriormente (dados não mostrados).

Conforme detalhado na metodologia, o aumento de TNF- α no plasma dos indivíduos foi indiretamente estimado pela concentração do seu receptor solúvel (sTNF-R1). Observou-se um aumento significativo da concentração de sTNF-R1 nos pacientes infectados por *S. mansoni* em relação ao grupo de indivíduos controle, que não apresentavam a infecção. Na população infectada por *S. mansoni*, a concentração plasmática média de sTNF-R1 foi de 726 pg/ml \pm 237,7 pg/ml e mediana de 691 pg/ml (**Figura 7B**).

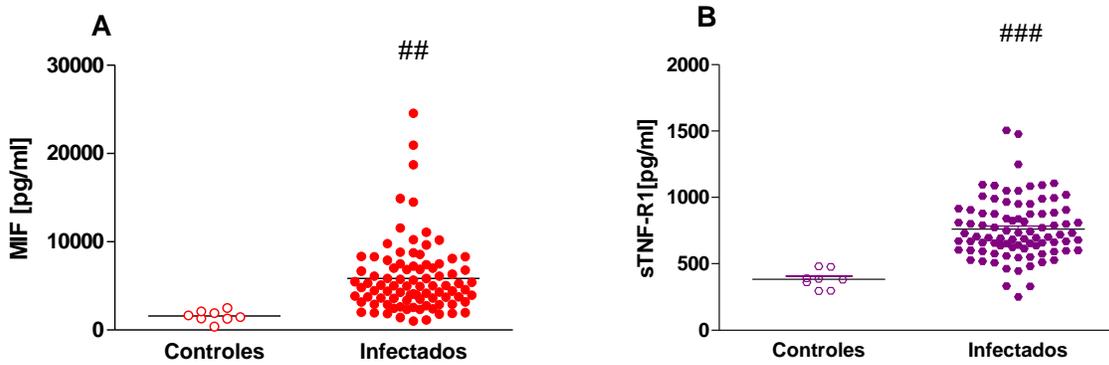


Figura 7. Concentração da citocina MIF e do receptor solúvel deTNF- α (sTNF-R1) no plasma de pacientes infectados com *S. mansoni* e em indivíduos controle. As concentrações plasmáticas foram medidas em indivíduos controles livres da infecção (n=8) e em pacientes infectados por *S. mansoni*. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, em que ## representa $p < 0,01$ e ### representa $p < 0,001$ em relação aos não infectados.

Nos indivíduos infectados examinados neste trabalho, a concentração de sTNF-R1 foi diferente em relação ao sexo, sendo verificado que os indivíduos do sexo masculino apresentaram níveis estatisticamente maiores de sTNF-R1 em relação aos níveis dos pacientes do sexo feminino, conforme ilustrado na **Figura 8**. Não houve diferença da concentração de sTNF-R1 em indivíduos infectados com relação à idade ou faixa etária, ao histórico de contato com água, ou com relatos de tratamento quimioterápico prévio.

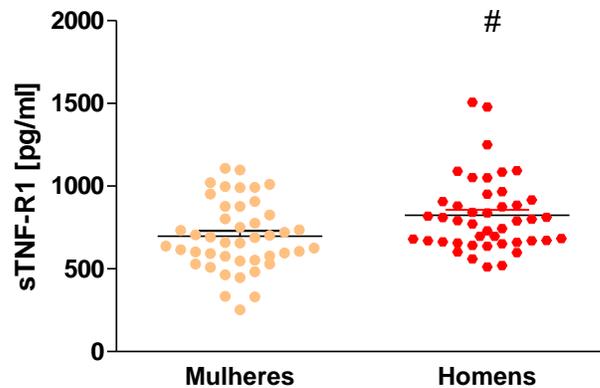


Figura 8. Concentração do receptor solúvel de TNF- α (sTNF-R1) no plasma de pacientes infectados com *S. mansoni* em relação ao sexo em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. As concentrações plasmáticas do receptor foram quantificadas pela técnica de ELISA em pacientes infectados em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, em que # representa $p < 0,05$.

4.4.4. Níveis da citocina MIF e do receptor solúvel de TNF- α (rTNF-R1) na população de Córrego do Choro em relação a carga parasitária

Não foi constatada relação entre concentração de MIF e carga parasitária, conforme verificado pela análise de regressão linear (**Figura 9A**). A ausência de associação entre a carga parasitária e a concentração de MIF permanece mesmo quando a variável OPG foi categorizada de acordo com a intensidade da infecção em baixa (< 100 opg), moderada (100-399 opg), ou alta (≥ 400 opg), conforme WHO (2002) e analisada pelo teste de Kruskal-Wallis (dados não mostrados). Em contrapartida, a análise de regressão revelou uma associação positiva entre a concentração plasmática de sTNF-R1 e o número de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes dos pacientes, conforme demonstrado no **Figura 9B**.

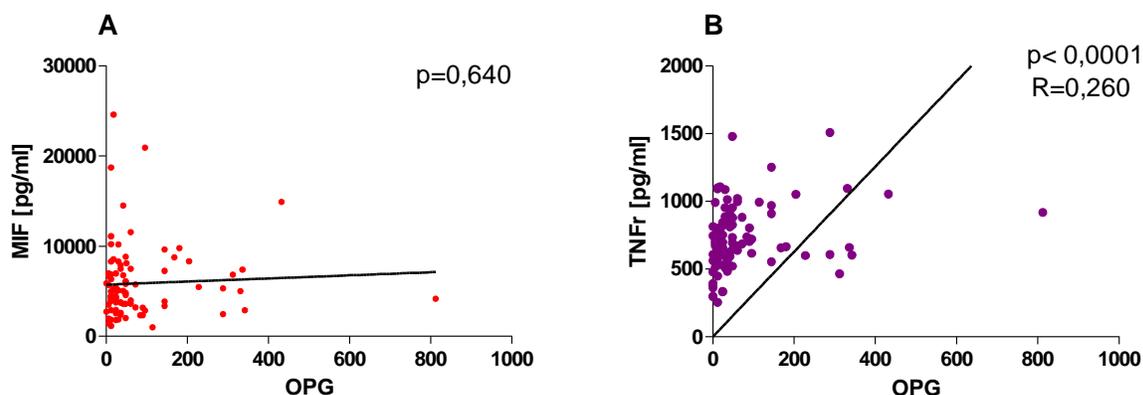


Figura 9. Relação entre a carga parasitária e a concentração da citocina MIF ou do receptor solúvel de TNF- α (sTNF-R1) no plasma de pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. (A) A concentração plasmática de MIF não está relacionada à carga parasitária, pois pelo teste de regressão linear não houve associação. (B) Regressão linear positiva entre os níveis de sTNF-R1 no plasma de pacientes infectados com *S. mansoni* em relação à carga parasitária.

4.4.5. Relação entre concentração da citocina MIF ou do receptor solúvel de TNF- α (sTNF-R1) e parâmetros clínicos e ultrassonográficos

Para a comparação dos níveis de MIF e de sTNF-R1 com as variáveis associadas à gravidade da esquistossomose, foram analisados parâmetros clínicos e medidas ultrassonográficas disponíveis no banco de dados em relação. As variáveis clínicas analisadas em relação ao fígado foram: superfície palpável ou normal, normal ou nodular e a consistência durante o exame clínico, além de medidas do lado direito e esquerdo obtidas durante a palpação. Do baço, foram obtidas medidas do seu tamanho no rebordo costal esquerdo, além da constatação de sua consistência e se órgão foi palpável ou não. Nenhuma associação foi encontrada entre os níveis plasmáticos de MIF e as variáveis obtidas da avaliação clínica, presente no banco de dados. Entretanto, a concentração de sTNF-R1 foi estatisticamente elevada em pacientes que apresentaram consistência do fígado endurecida ou dura e superfície rugosa durante a palpação clínica. Além disso, pacientes infectados que apresentaram consistência do

baço dura ou endurecida durante o exame clínico apresentaram concentração de sTNF-R1 estatisticamente mais elevada (**Tabela 4**).

Tabela 4. Relação entre a concentração de sTNF-R1 e as variáveis obtidas na avaliação clínica dos pacientes de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.

Órgão	Avaliação Clínica	sTNF-R1 média	Valor P
Baço	Normal	750 ± 25	0,112
	Palpável	858 ± 69	
	Normal	709 ± 11	0,04
	Endurecida/dura	994 ± 65	
Fígado	Normal	772 ± 38	0,626
	Palpável	749 ± 30	
	Normal	733 ± 29	0,015
	Nodular	1074 ± 21	
	Normal	719 ± 27	0,004
	Endurecida/dura	922 ± 20	

Exceto para os valores de p, os dados representam a média ± desvio padrão da concentração de sTNF-R1 em pg/ml. Os valores foram determinados pelo teste de Mann-Whitney.

Em seguida, as concentrações plasmáticas das duas citocinas pró-inflamatórias foram relacionadas com as variáveis obtidas pelas medidas ultrassonográficas especificadas na **Tabela 3**. A esquistossomose grave afeta o baço, o fígado, o sistema porta e suas tributárias e a vesícula biliar. Essas alterações patológicas podem ser mensuradas pela ultra-sonografia (US), mostrando-se especialmente evidentes em formas avançadas da doença (Hatz et al. 1992). A concentração plasmática de MIF não foi estatisticamente associada ao tamanho longitudinal do baço. Também não foi constatada nenhuma associação entre os níveis de MIF em relação ao comprimento longitudinal dos lobos esquerdo e direito do fígado (**Figura 10**). O aumento da concentração plasmática de sTNF-R1 também não foi relacionado ao aumento do baço e do

fígado (**Figura 11**). Essa ausência de associação entre a concentração de citocinas pró-inflamatórias e organometria dos indivíduos examinados foi verificada pelas análises com as medidas contínuas, analisadas por regressão linear, e também quando os dados foram analisados com medidas categorizadas como na tabela 3, e analisadas pelo teste T.

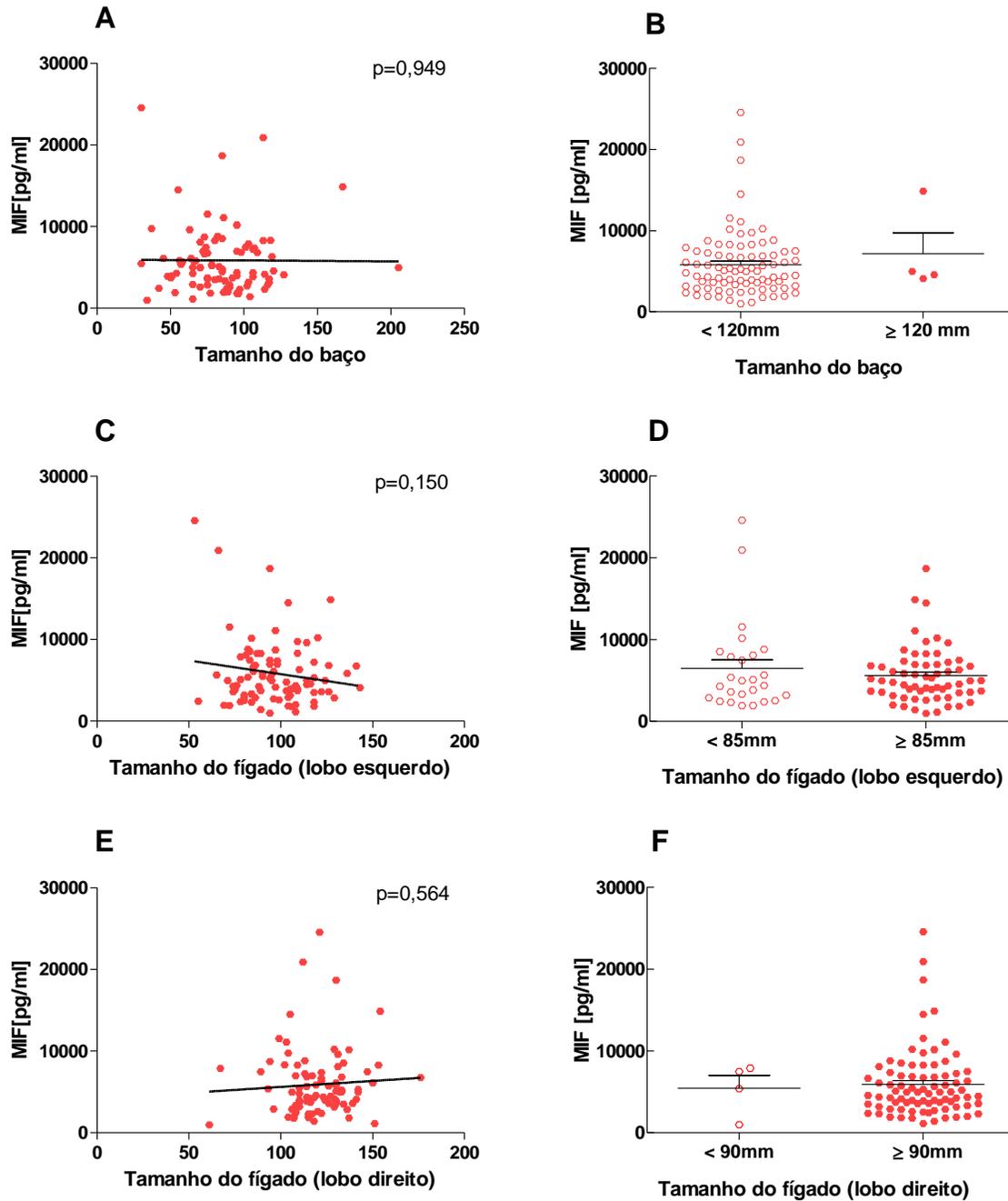


Figura 10. Associação dos níveis plasmáticos de MIF e organometria de fígado e baço em pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Tamanho longitudinal do baço, como medida contínua (A) ou categorizada (B); Tamanho longitudinal do lobo esquerdo do fígado, como medida contínua (C) ou categorizada (D); Tamanho longitudinal do lobo direito do fígado, como medida contínua (E) ou categorizada (F). Os dados foram categorizados seguindo o protocolo de Niamey 1996 revisto por Richter et al. (2000 e 2001). Os dados foram analisados pelo teste de regressão linear e pelo teste de Mann-Whitney.

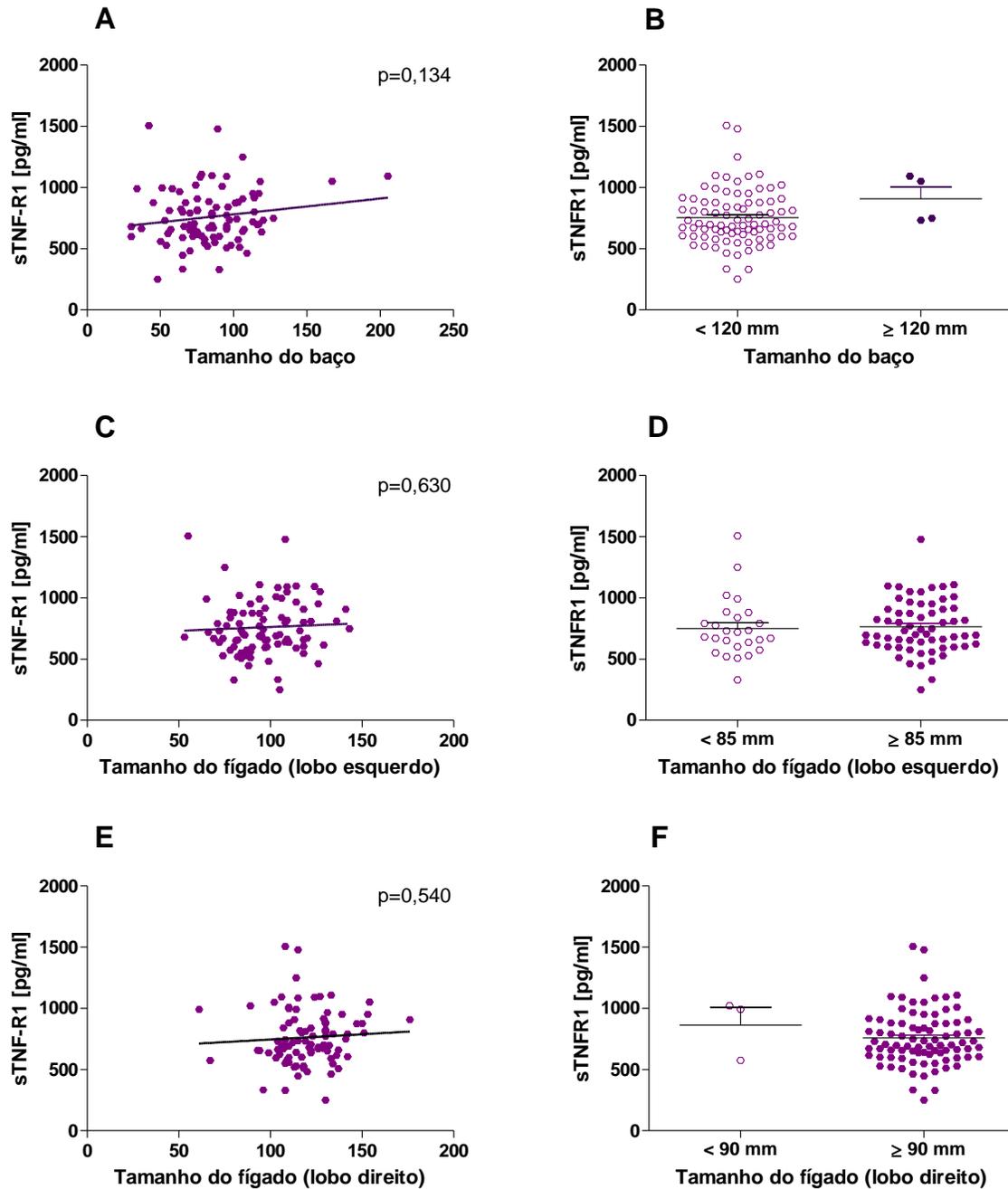


Figura 11. Associação dos níveis plasmáticos de sTNF-R1 e organometria de fígado e baço em pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Tamanho longitudinal do baço, como medida contínua (A) ou categorizada (B); Tamanho longitudinal do lobo esquerdo do fígado, como medida contínua (C) ou categorizada (D); Tamanho longitudinal do lobo direito do fígado, como medida contínua (E) ou categorizada (F). Os dados foram categorizados seguindo o protocolo de Niamey 1996 revisto por Richter et al. (2000 e 2001) e analisados pelo teste de regressão linear e pelo teste de Mann-Whitney.

O espessamento periportal é um indício de fibrose hepática. Esse espessamento acomete principalmente a veia porta no hilo hepático, estendendo-se também para os ramos intra-hepáticos do sistema porta e para a região perivesicular (Machado et al. 2002). A concentração plasmática de MIF aumenta levemente em pacientes com aumento do diâmetro da veia porta, entretanto, esta associação não foi estatisticamente significativa em relação a variável contínua ou categorizada (em pacientes com diâmetro de veia porta maior ou igual a 11 mm e pacientes com diâmetro menor que 11 mm) (**Figura 12A e 12B**). O espessamento periportal no hilo hepático não foi associado à concentração plasmática de MIF (**Figura 12C e 12D**). Entretanto, houve aumento significativo dos níveis de MIF nos pacientes que apresentaram espessura da parede veia porta na bifurcação igual ou superior 5 mm em relação aos pacientes que apresentaram medidas normais (**Figura 12E**). Quando foi realizada a análise com as medidas não categorizadas da espessura de veia porta na bifurcação, a regressão linear também revelou associação positiva entre a concentração plasmática de MIF e a medida da espessura da parede da veia porta na bifurcação. Ou seja, quanto maiores os níveis de MIF no plasma dos pacientes, maiores as medidas da espessura da veia porta em sua ramificação obtidas pelo US, conforme ilustrado na (**Figura 12F**).

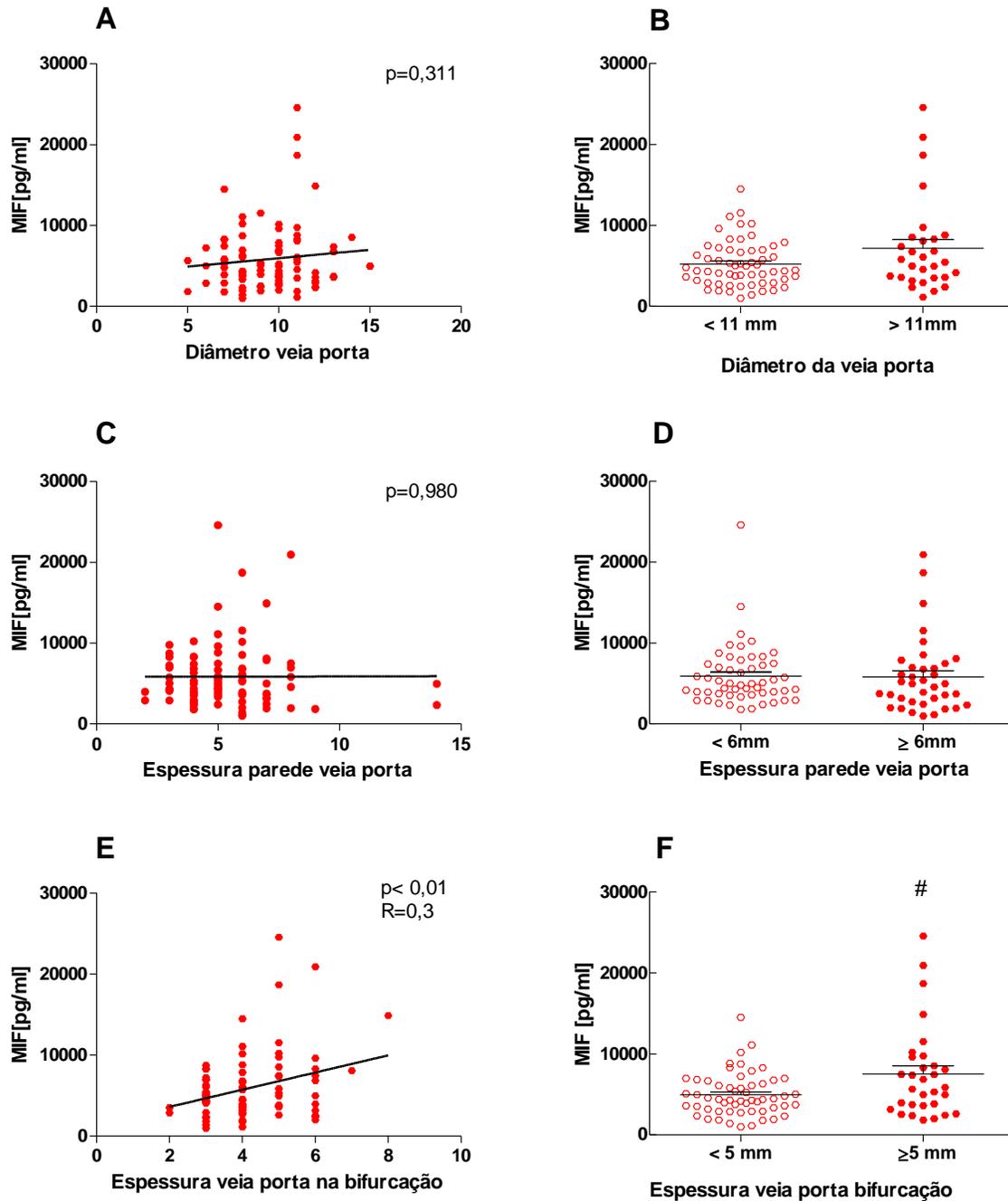


Figura 12. Associação da concentração plasmática de MIF e as medidas de espessamento fibroso periportal em pacientes infectados com *S. mansoni* de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Diâmetro da veia porta como medida contínua (A) ou categorizada (B); Espessura da parede da veia porta no hilo hepático como medida contínua (C) ou categorizada (D); Espessura da parede da veia porta na bifurcação do vaso principal como medida contínua (E) ou categorizada (F). Os dados foram analisados pelo teste de regressão linear na sua forma contínua e pelo teste de Mann-Whitney quando foram categorizadas seguindo o protocolo de Niamey 1996 revisto por Richter et al. (2000 e 2001). # representa $p < 0,05$.

Com relação à quantificação dos níveis do receptor solúvel de TNF e sua associação com a medidas relacionadas a fibrose hepática, os dados mostram ausência de associação entre a concentração de sTNFR1 e o do diâmetro da veia porta (**Figura 13A e B**) ou sua espessura no hilo hepático (**Figura 13C e D**). Entretanto, na população de estudo, a fibrose em ramos secundários da veia porta foi detectada nos pacientes com maiores níveis de sTNF-R1 no plasma, conforme a **Figura 13E**. Esse aumento é verificado quando as variáveis são analisadas na sua forma contínua e também quando são categorizadas (**Figura 13F**).

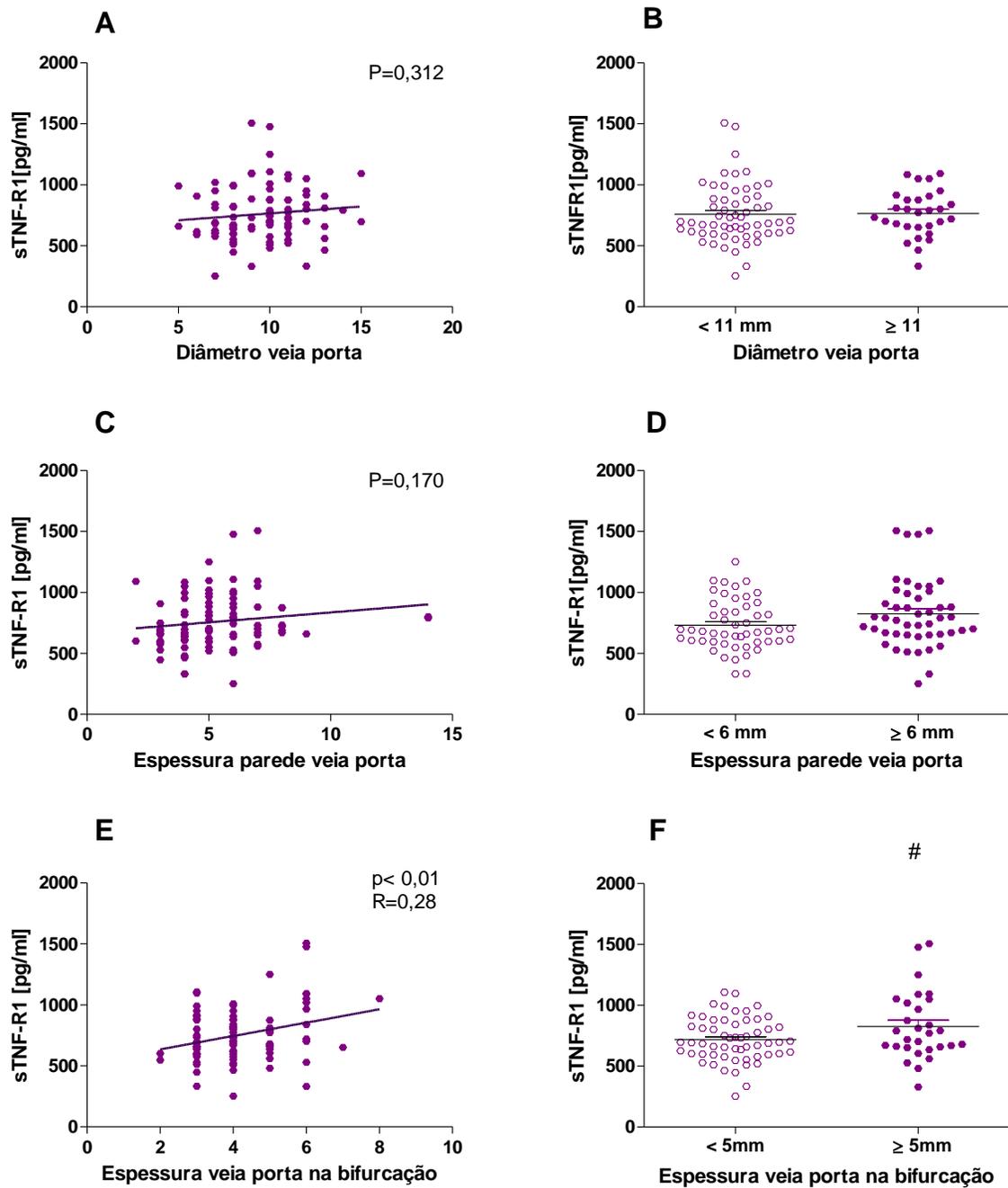


Figura 13. Associação da concentração plasmática de sTNF-R1 e as medidas de espessamento fibroso periportal em pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Diâmetro da veia porta, como medida contínua (A) ou categorizada (B); Espessura da parede da veia porta no hilo hepático, como medida contínua (C) ou categorizada (D); Espessura da parede da veia porta na bifurcação do vaso principal, como medida contínua (E) ou categorizada (F). Os dados foram analisados pelo teste de regressão linear na sua forma contínua e pelo teste de Mann-Whitney quando foram categorizadas seguindo o protocolo de Niamey 1996 revisto por Richter et al. (2000 e 2001). # representa p<0,05.

O espessamento perivesicular é outro marcador importante do processo de fibrose hepático. Considera-se que esse comprometimento vesicular possa corresponder a uma extensão da fibrose periportal, na medida em que o espessamento da região do colo vesicular, sem espessamento das outras partes da vesícula biliar, geralmente é observado (Ali et al. 1990). Na população de estudo, não observamos relação estatística significativa entre a concentração plasmática de MIF e espessamento da parede da vesícula obtido pelo exame de US (**Figura 14A e 14B**). Em contrapartida, foi detectado uma associação positiva entre espessamento perivesicular e a concentração de sTNF-R1 no plasma dos pacientes infectados por *S. mansoni* (**Figura 14C e 14D**). E esse aumento é verificado quando as variáveis são analisadas em sua forma contínua e também quando são categorizadas.

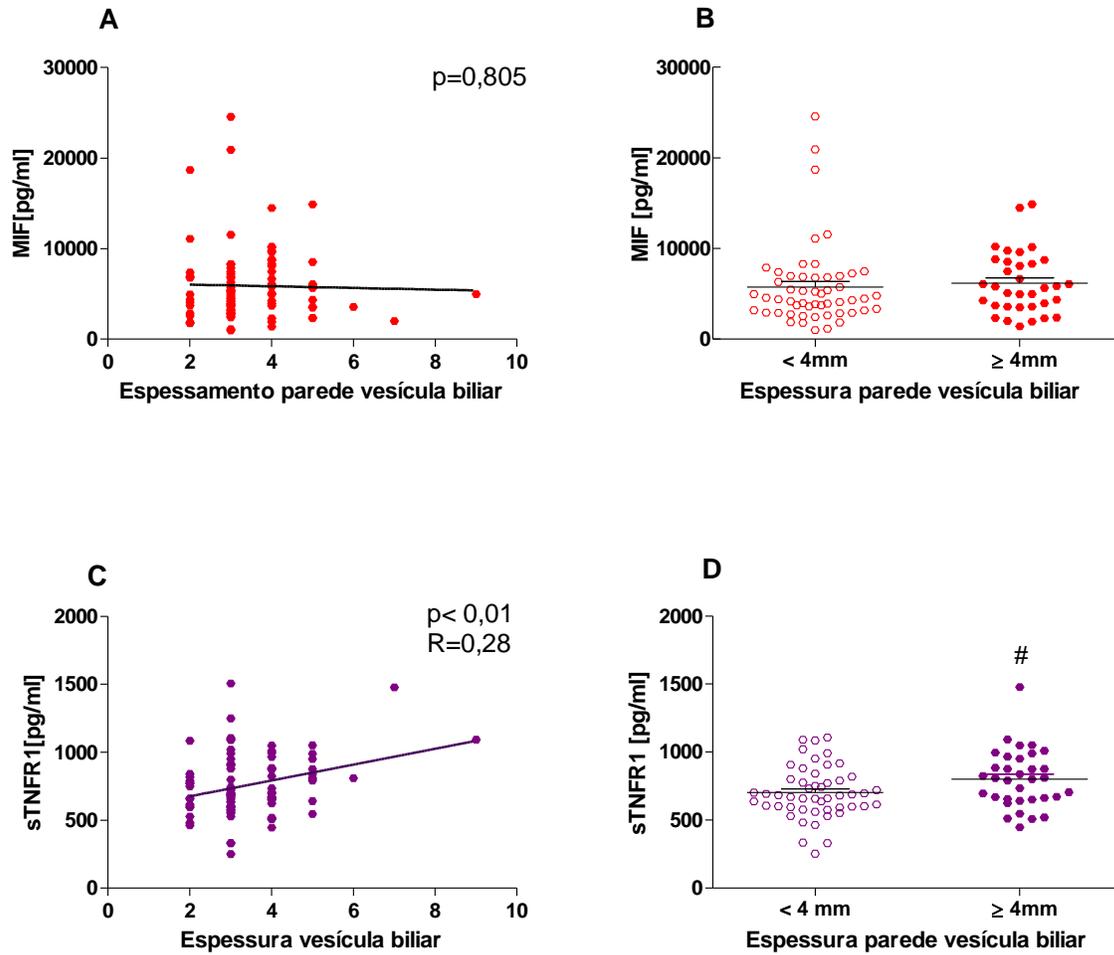


Figura 14. Associação entre a concentração plasmática de MIF ou de sTNF-R1 e as medidas de espessamento perivesicular em pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Espessura da parede da vesícula biliar apresentados como medida contínua (**A** e **C**) ou caracterizados (**B** e **D**). Os dados foram analisados pelo teste de regressão linear na sua forma contínua pelo teste de Mann-Whitney quando foram categorizadas seguindo o protocolo de Niamey 1996 revistos por Richter et al. (2000 e 2001). # representa $p < 0,05$.

Foram construídos modelos multivariados de análise na presença de todas as variáveis presentes no banco de dados que na análise linear simples mostraram $p < 0,25$ para a regressão múltipla. Os valores de p encontram-se na tabela do **ANEXO D**. Para a construção dos modelos, as variáveis clínicas que estavam associadas na análise univariada ou selecionadas para o modelo final com $p < 0,25$, mas que apresentaram baixa frequência foram excluídas das análises finais.

Verificou-se que o aumento dos níveis de MIF permanece relacionado ao aumento da espessura da veia porta na bifurcação conforme representado na **Tabela 5**. Para cada milímetro aumentado na espessura da parede na sua bifurcação, observa-se um aumento da concentração plasmática de MIF em aproximadamente 970 pg/ml.

Tabela 5. Modelo de análise Multivariada para MIF, população Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG.

Variáveis	Níveis de MIF			
	Coefficiente	IC 95%	Erro padrão	Valor de p
Espessura veia porta na bifurcação	972.3067	268.8384 a 1675.775	353.6865	0.007

Durante a análise univariada, verificou-se que o aumento dos níveis de sTNF-R1 no plasma dos pacientes de Córrego do Choro foi associado ao sexo, à carga parasitária, ao aumento da espessura da parede da vesícula biliar e da veia porta na bifurcação. Quando analisados em modelo multivariado, verificou-se que o aumento dos níveis do receptor solúvel sTNF-R1 permanece relacionado ao espessamento fibroso periportal e perivesicular e inversamente associado ao processo de reinfecção (**Tabela 6**). Ou seja, os indivíduos reinfectedos apresentam

uma diminuição dos níveis de sTNF-R1 no plasma de aproximadamente 101 pg/ml. Já o aumento dos níveis em aproximadamente 47,5 pg/ml e de 56,4pg/ml foi observado nos indivíduos com fibrose periportal e perivascular.

Tabela 6. Modelo de análise Multivariada para sTNF-R1 na população Córrego do Choro, Padre Paraiso-MG.

Variáveis	Níveis de sTNF-R1			
	Coefficiente	IC 95%	Erro padrão	Valor de p
Tratamento	-101.093	-192.9012 a -9.284856	46.14203	0.031
Espessura veia porta na bifurcação	47.5177	10.19367 a 84.84173	18.75875	0,013
Espessura da parede da Vesícula Biliar	56.3915	18.16012 a 94.62289	19.21478	0.004

4.4.6. Níveis das quimiocinas CCL3, CCL7 e CCL24 na população de Córrego do Choro

Na população infectada examinada neste estudo, a concentração plasmática média de CCL3, CCL7 e CCL24 foram de $116,4 \pm 20,76$ pg/ml, $69,39 \pm 5,98$ pg/ml e 2149 ± 158 pg/ml respectivamente, quantificada pela técnica de ELISA e representada na **Figura 15**. Não foi detectado aumento significativo dos níveis das quimiocinas CCL3 e CCL7 nos pacientes infectados por *S. mansoni* em relação ao grupo de indivíduos controle que não apresentavam a infecção. No entanto, a concentração da quimiocina CCL24, foi estatisticamente superior nos indivíduos infectados por *S. mansoni* em relação aos indivíduos não infectados.

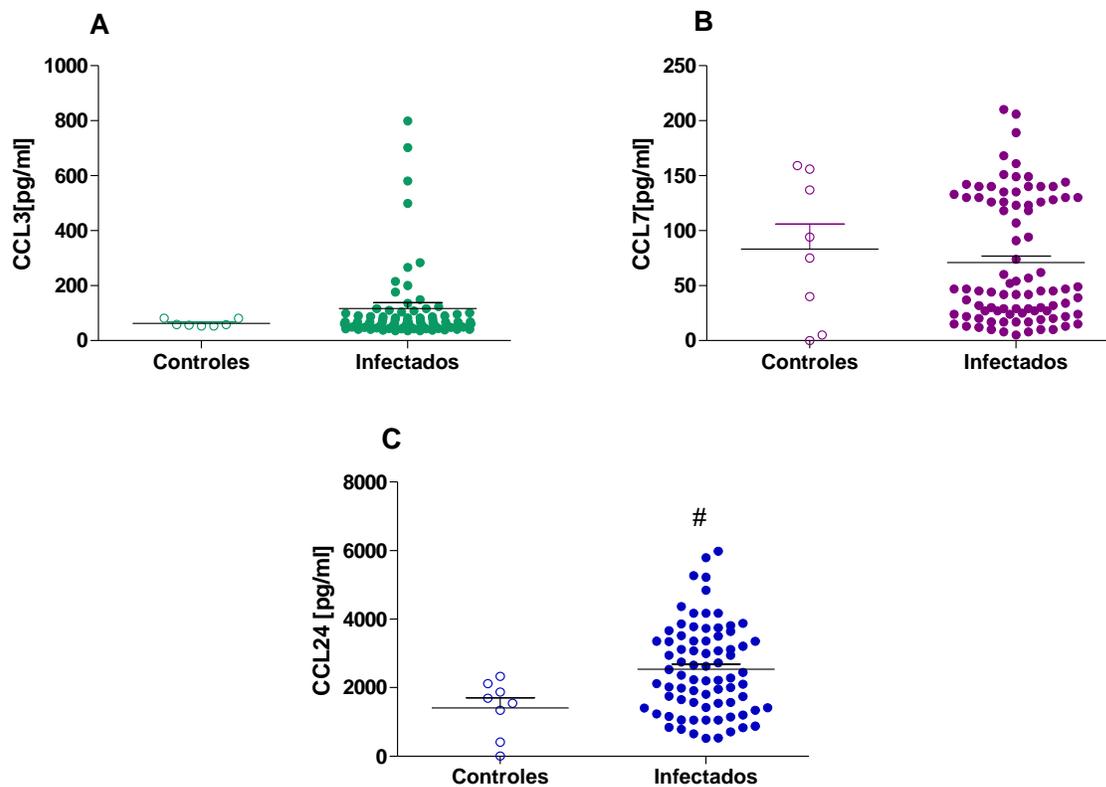


Figura 15. Concentração plasmática de CCL3, CCL7 e CCL24 em pacientes infectados por *S mansoni* e em voluntários não infectados. (A) Níveis de CCL3, (B) CCL7 e (C) CCL24 estimados pela técnica de ELISA em amostras de plasma de indivíduos não infectados e indivíduos infectados por *Schistosoma mansoni* residentes no Município de Padre Paraíso, MG. As análises foram realizadas pelo do teste de Mann-Whitney, # representa $p < 0,05$.

Não foi verificada nenhuma relação estatística significativa entre os níveis de CCL3 e CCL24 em relação ao sexo, idade, contato com água ou tratamento quimioterápico prévio para a esquistossomose (dados não mostrados). A concentração plasmática de CCL7 também não foi associada à idade, sexo ou tratamento prévio, contudo a concentração desta quimiocina foi diferente entre os homens e mulheres, sendo a sua concentração plasmática estatisticamente superior nos homens.

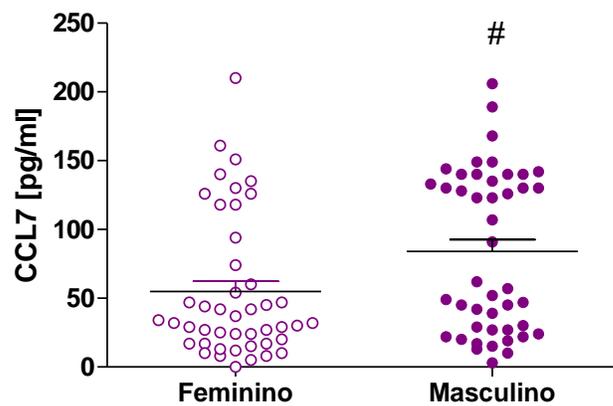


Figura 16. Concentração da quimiocinas CCL7 no plasma de pacientes infectados com *S. mansoni* em relação ao sexo em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. As concentrações plasmáticas do receptor foram quantificadas pela técnica de ELISA em pacientes infectados em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney, em que # representa $p < 0,05$.

4.4.7. Níveis das quimiocinas CCL3, CCL7 e CCL24 na população de córrego do Choro e a carga parasitária

Entre os indivíduos infectados examinados no presente estudo também não foi constatada relação estatística significativa entre concentração plasmática das quimiocinas CCL3, CCL7 e CCL24 e a carga parasitária, estimada pela contagem de ovos eliminados nas fezes, conforme representado na **Figura 17**.

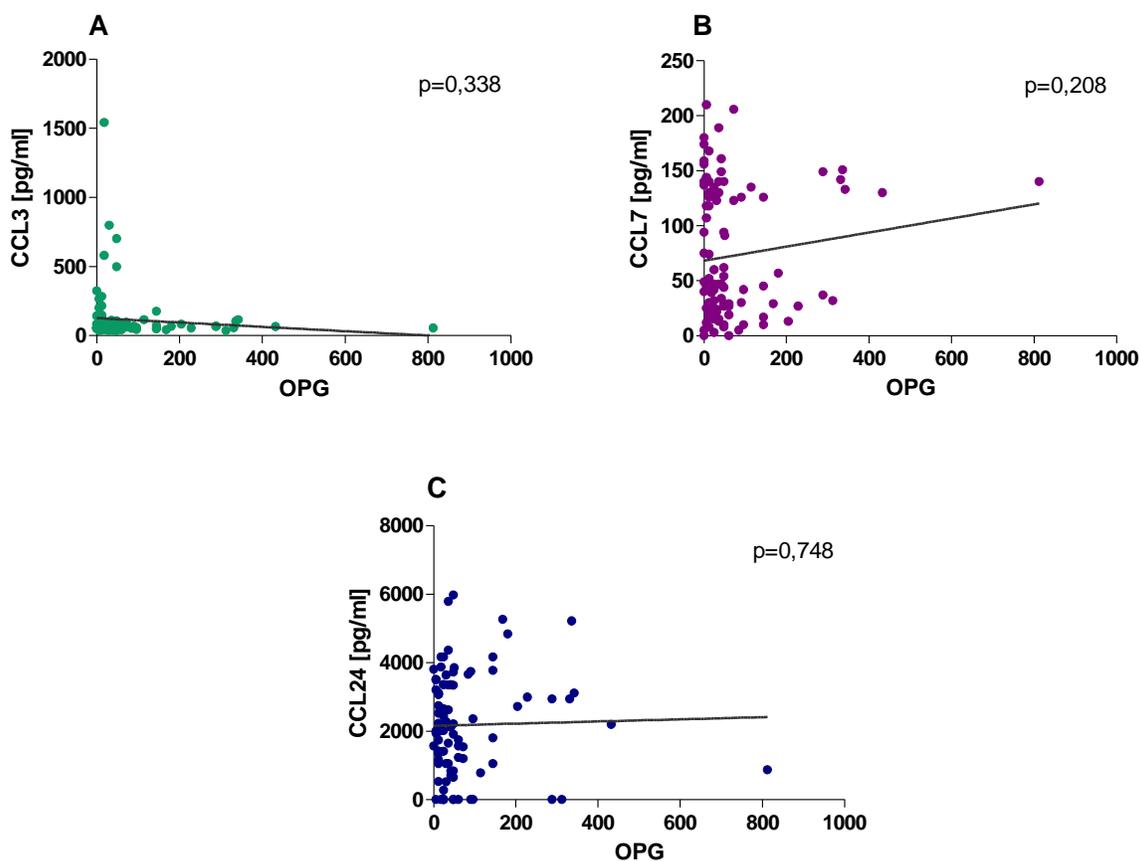


Figura 17. Relação entre a concentração plasmática de CCL3, CCL7 ou CCL24 e carga parasitária nos pacientes de Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Correlação entre a carga parasitária estimada pelo número de ovos eliminados nas fezes e convertidos em OPG dos pacientes selecionados e o nível plasmático de quimiocinas quantificados pela técnica de ELISA (A) CCL3, (B) CCL7 e (C) CCL24. Os valores de p obtidos pelo teste de regressão linear foram descritos em cada gráfico.

4.4.8. Parâmetros de Gravidade

Nenhuma associação significativa foi encontrada entre a concentração plasmática das quimiocinas CCL3 e CCL24 e os parâmetros obtidos pela avaliação clínica. No entanto, maiores níveis plasmáticos de CCL7 foram quantificados nos pacientes que apresentaram durante o exame clínico, maiores medidas do lado esquerdo do fígado durante a palpação (ANEXO D). Em seguida, as concentrações plasmáticas de CCL3, CCL7 e CCL24 foram relacionadas com as variáveis obtidas pelas medidas ultrassonográficas associadas à gravidade da esquistossomose demonstradas na **Tabela 3**. Os níveis de CCL3 (**Figura 18**), CCL7 (**Figura 19**) e CCL24 (**Figura 20**) não apresentaram relação com as variáveis organométricas relacionadas de tamanho longitudinal do baço e com tamanhos longitudinais do lobo esquerdo e direito fígado avaliados como medidas contínuas ou categorizadas conforme Richter et al. (2000 e 2001).

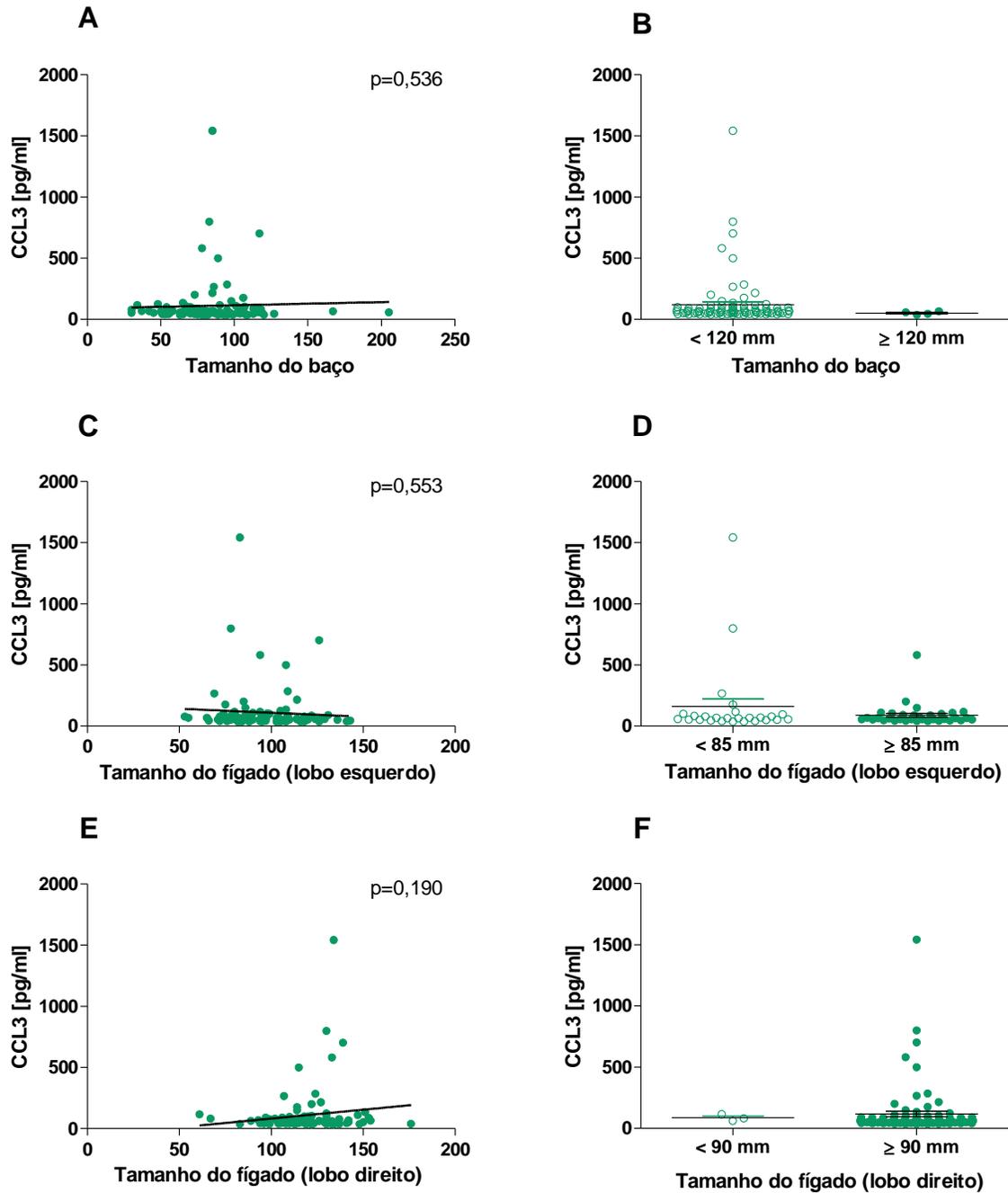


Figura 18. Associação dos níveis plasmáticos de CCL3 e organometria de fígado e baço em pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Tamanho longitudinal do baço, como medida contínua (A) ou categorizada (B); Tamanho longitudinal do lobo esquerdo do fígado, como medida contínua (C) ou categorizada (D); Tamanho longitudinal do lobo direito do fígado, como medida contínua (E) ou categorizada (F). Os dados foram apresentados em sua forma contínua ou categorizados seguindo o protocolo de Niamey 1996 revisto por Richter et al. (2000 e 2001) e analisados pelo teste de regressão linear e Mann-Whitney.

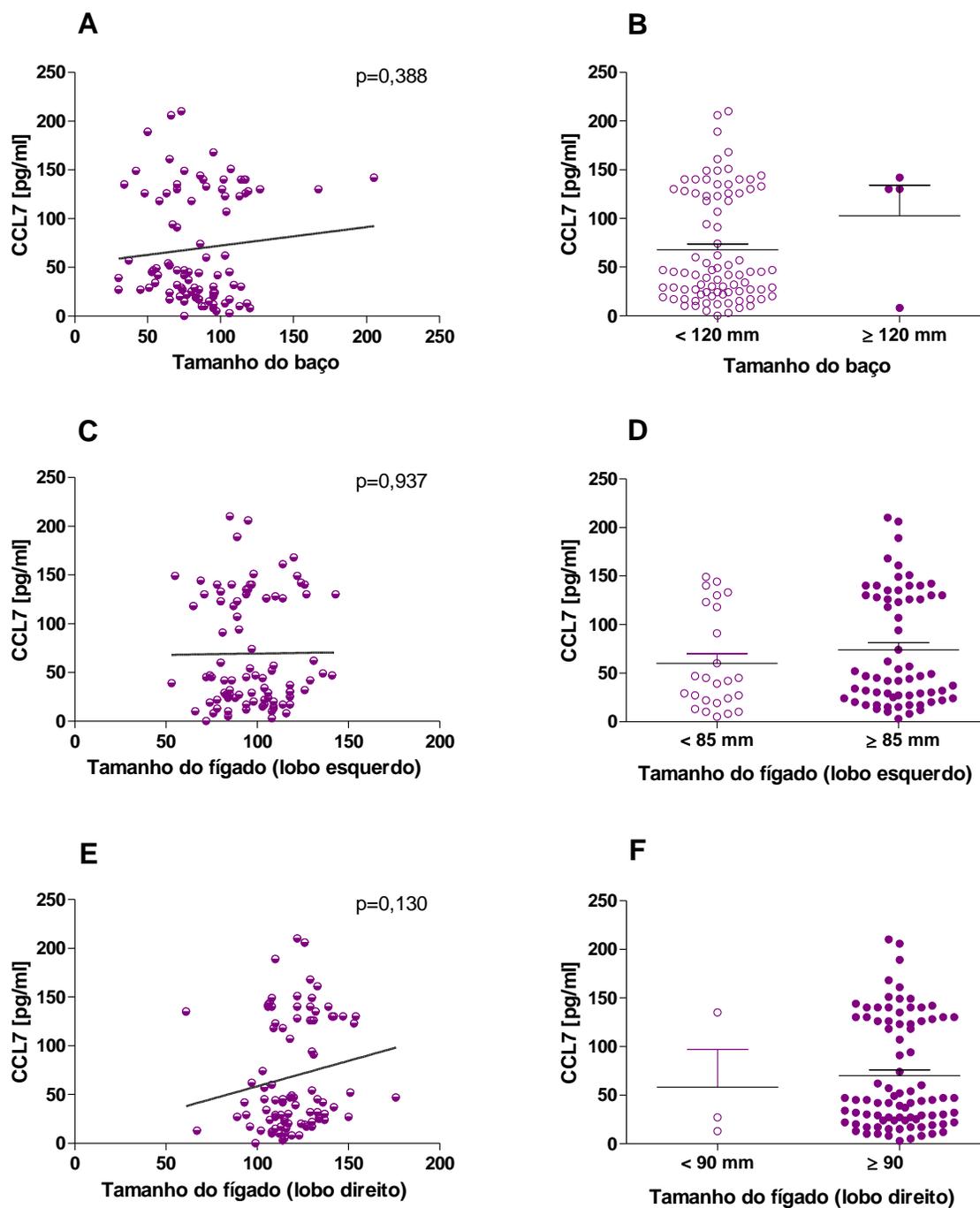


Figura 19. Associação dos níveis plasmáticos de CCL7 e organometria de fígado e baço em pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Tamanho longitudinal do baço, como medida contínua (A) ou categorizada (B); Tamanho longitudinal do lobo esquerdo do fígado, como medida contínua (C) ou categorizada (D); Tamanho longitudinal do lobo direito do fígado, como medida contínua (E) ou categorizada (F). Os dados foram apresentados em sua forma contínua ou categorizados seguindo o protocolo de Niamey 1996 revisto por Richter et al. (2000 e 2001) e analisados pelo teste de regressão linear e Mann-Whitney.

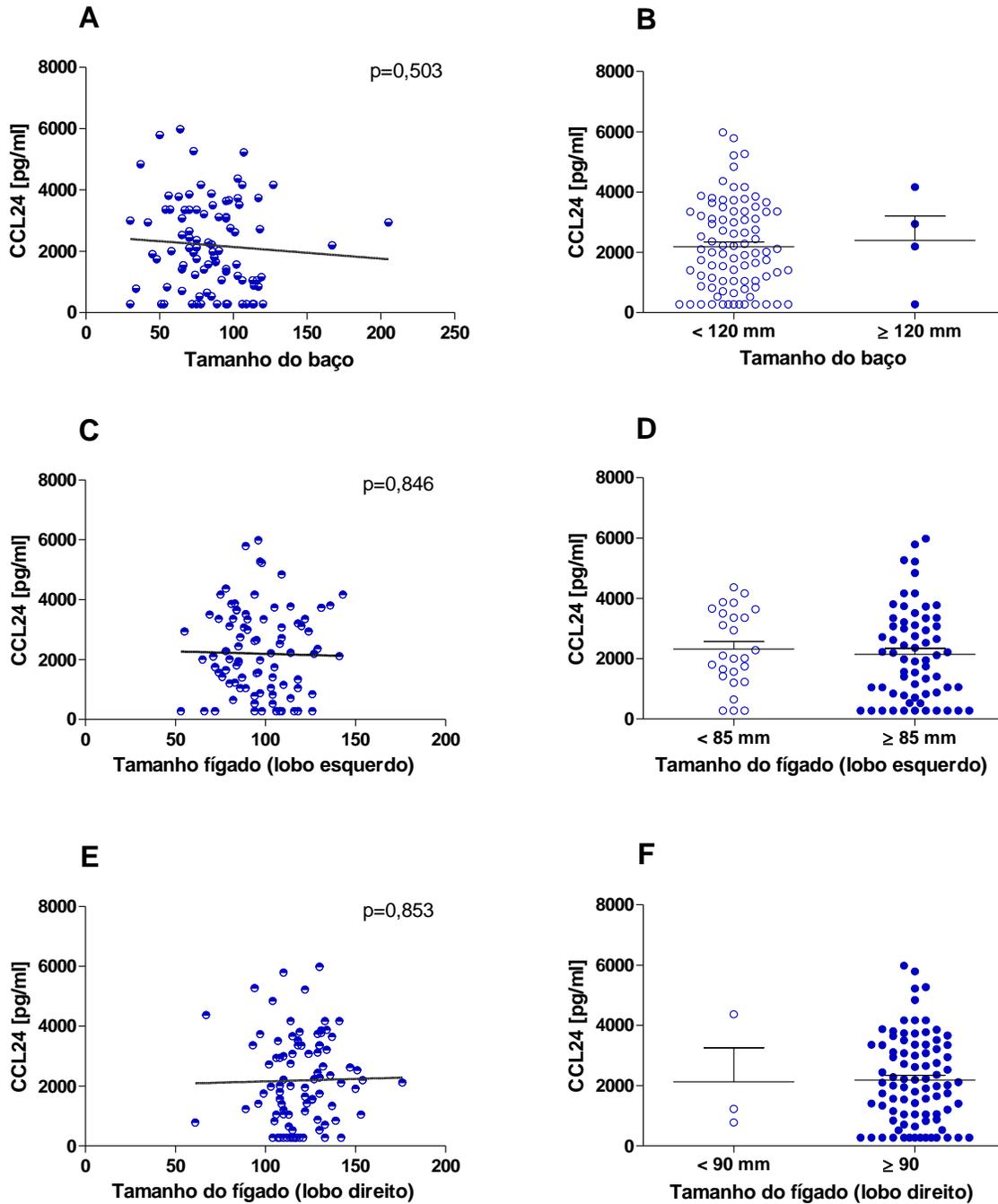


Figura 20. Associação dos níveis plasmáticos de CCL24 e organometria de fígado e baço em pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Tamanho longitudinal do baço, como medida contínua (A) ou categorizada (B); Tamanho longitudinal do lobo esquerdo do fígado, como medida contínua (C) ou categorizada (D); Tamanho longitudinal do lobo direito do fígado, como medida contínua (E) ou categorizada (F). Os dados foram apresentados em sua forma contínua ou categorizados seguindo o protocolo de Niamey 1996, revistos por Richter et al. (2000 e 2001) e analisados pelo teste de regressão linear e Mann-Whitney.

A fibrose periportal é determinante na morbidade da esquistossomose. Não foi constatada associação entre a concentração das quimiocinas CCL3 e CCL7 no plasma dos indivíduos infectados e as medidas, contínua ou categorizada, de diâmetro e espessura da parede da veia porta no hilo e na sua bifurcação, obtidas pela avaliação ultrassonográfica (**Figuras 21 e 22**). Entretanto, a concentração plasmática de CCL24 foi significativamente maior nos indivíduos que apresentaram as maiores medidas de diâmetro portal (**Figura 23A e 23B**). Apesar não haver associação entre os níveis de CCL24 e fibrose portal no hilo (**Figura 23C e 23D**), o aumento dos níveis de CCL24 foi positivamente relacionado ao espessamento da parede da veia porta na bifurcação quando a variável é apresentada na sua forma contínua e analisada pelo teste de regressão linear. E quando os dados são analisados pelo teste t, ou seja, categorizados segundo Richter et al. (2001), observa-se uma diferença significativa, os pacientes com espessamento portal apresentam maiores níveis de CCL24 (**Figura 23D e 23E**).

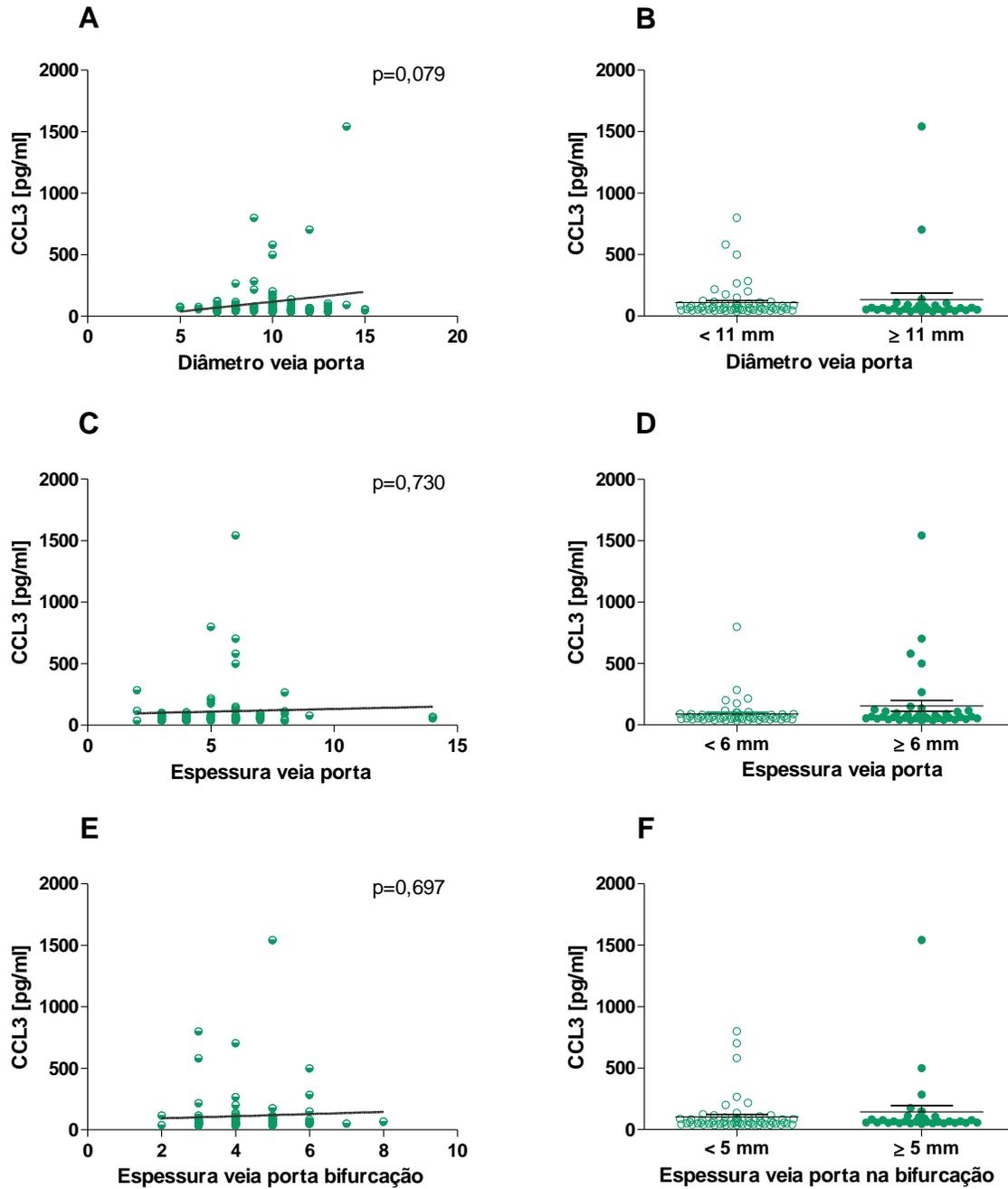


Figura 21. Associação da concentração plasmática de CCL3 e as medidas de espessamento fibroso periportal em pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Diâmetro da veia porta como medida contínua (A) ou categorizada (B); Espessura da parede da veia porta no hilo hepático como medida contínua (C) ou categorizada (D); Espessura da parede da veia porta na bifurcação do vaso principal como medida contínua (E) ou categorizada(F). Os dados foram analisados pelo teste de regressão linear na sua forma contínua e pelo teste de Mann-Whitney quando foram categorizadas seguindo o protocolo de Niamey 1996 revisto por Richter et al. (2000 e 2001).

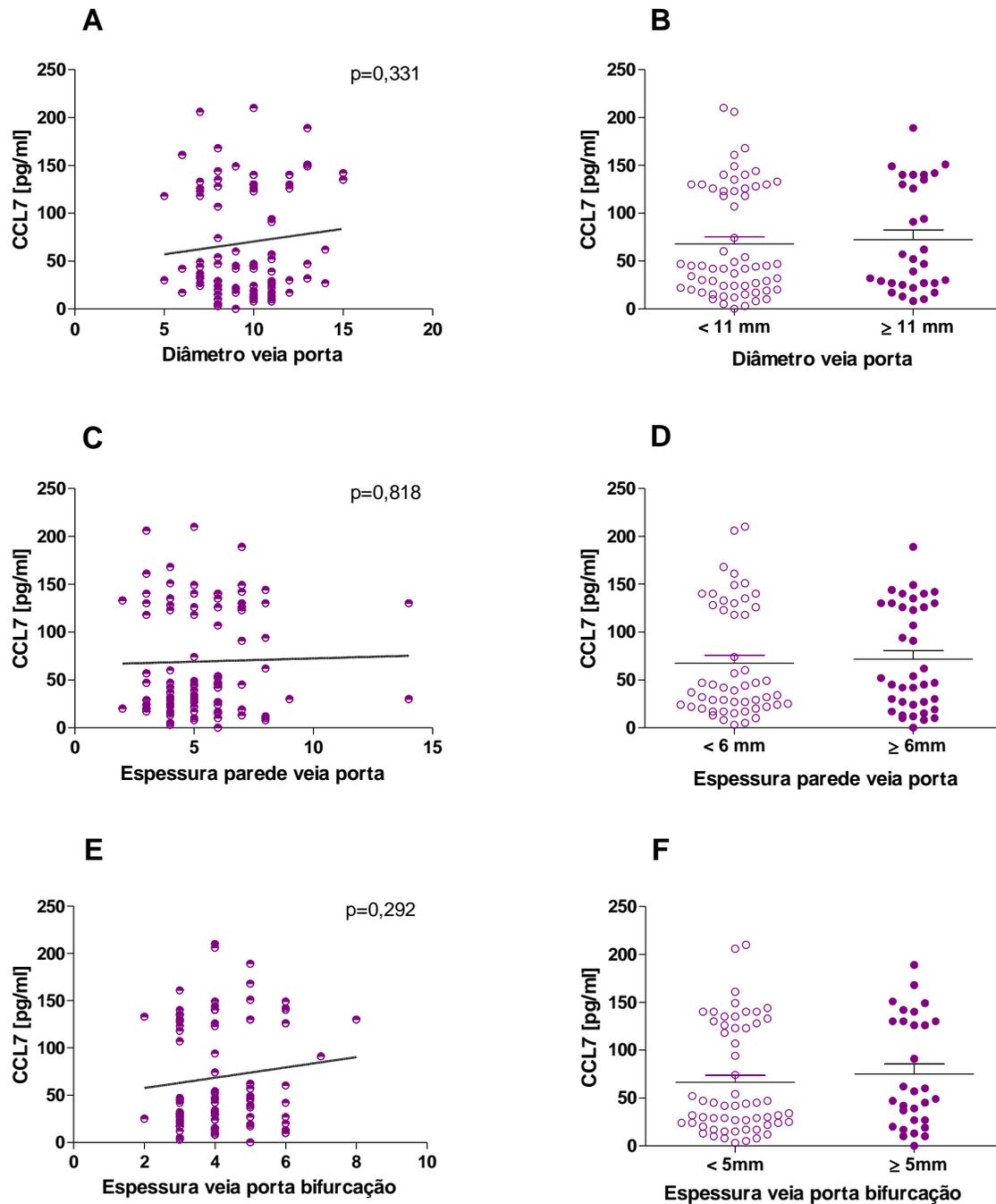


Figura 22. Associação da concentração plasmática de CCL7 e as medidas de espessamento fibroso periportal em pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Diâmetro da veia porta como medida contínua (A) ou categorizada (B); Espessura da parede da veia porta no hilo hepático como medida contínua (C) ou categorizada (D); Espessura da parede da veia porta na bifurcação do vaso principal como medida contínua (E) ou categorizada (F). Os dados foram analisados pelo teste de regressão linear na sua forma contínua e pelo teste de Mann-Whitney quando foram categorizadas seguindo o protocolo de Niamey 1996 revisto por Richter et al. (2000 e 2001). # representa $p < 0,05$.

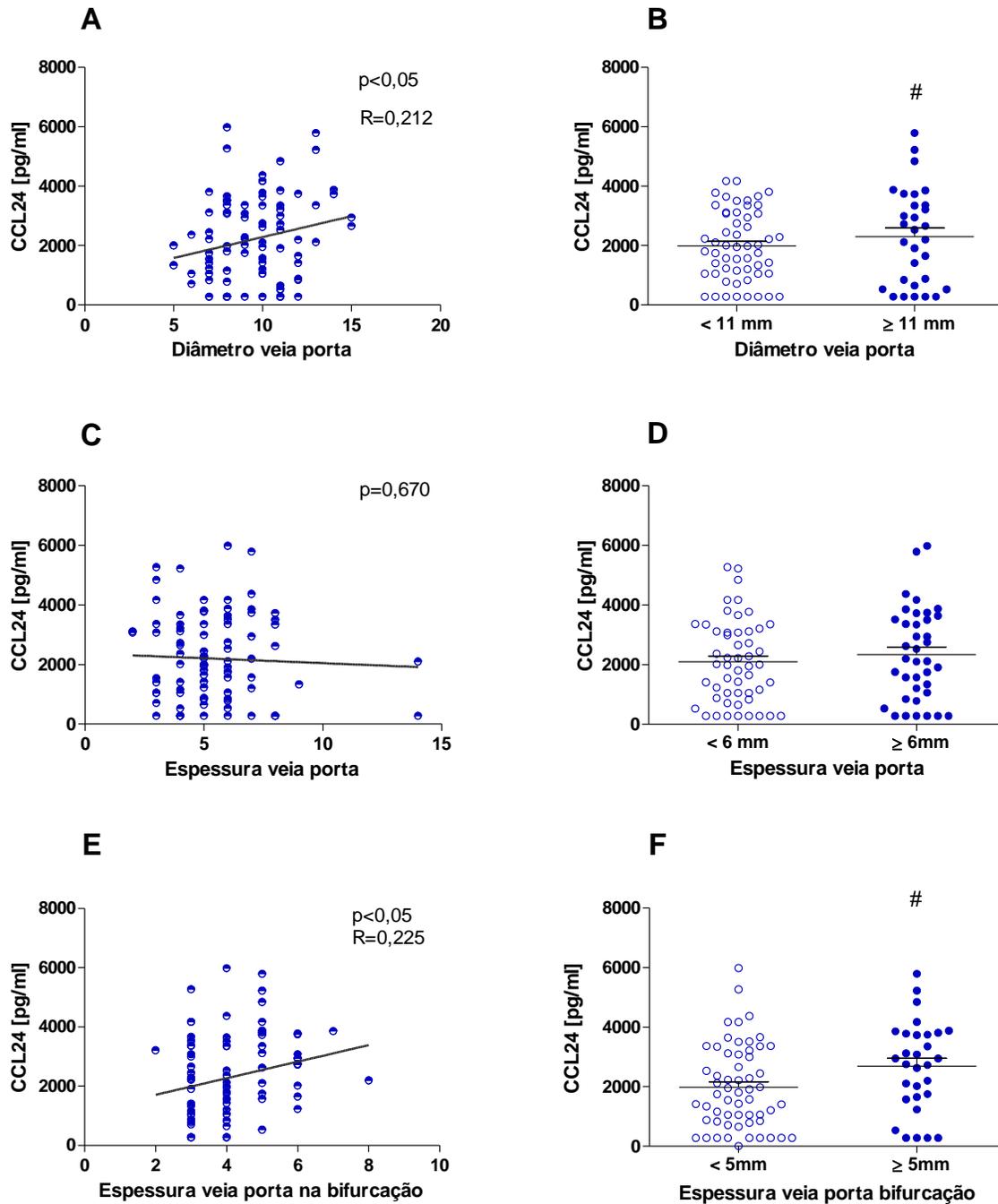


Figura 23. Associação da concentração plasmática de CCL24 e as medidas de espessamento fibroso periportal em pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Diâmetro da veia porta como medida contínua (A) ou categorizada (B); Espessura da parede da veia porta no hilo hepático como medida contínua (C) ou categorizada (D); Espessura da parede da veia porta na bifurcação do vaso principal como medida contínua (E) ou categorizada (F). Os dados foram analisados pelo teste de regressão linear e pelo teste de Mann-Whitney quando foram categorizadas seguindo o protocolo de Naimy 1996 revisto por Richter et al. (2000 e 2001). # representa $p < 0,05$.

Não houve associação entre os níveis plasmáticos de CCL7 e aumento da espessura da parede da vesícula biliar. O aumento da concentração plasmática de CCL3 apresentou associação positiva com medidas de espessamento perivesicular obtidas pelo exame de ultrassom quando analisamos a variável não categorizada, utilizando o teste estatístico de regressão linear (**Figura 24A**). Quando utilizamos os dados categorizados não encontramos diferença na concentração de CCL3 entre os pacientes com espessamento fibroso da parede da vesícula biliar em relação aos indivíduos que não apresentaram fibrose (**Figura 24B**). No caso de CCL24, foi verificado que o aumento da concentração plasmática desta citocina está positivamente relacionado à fibrose perivesicular como medida contínua (**Figura 24E**). Esta associação permanece significativa quando a medida da espessura perivesicular foi categorizada segundo critérios do protocolo de Niamey (Richter et al. 2001) e a análise realizada pelo teste T (**Figura 24F**).

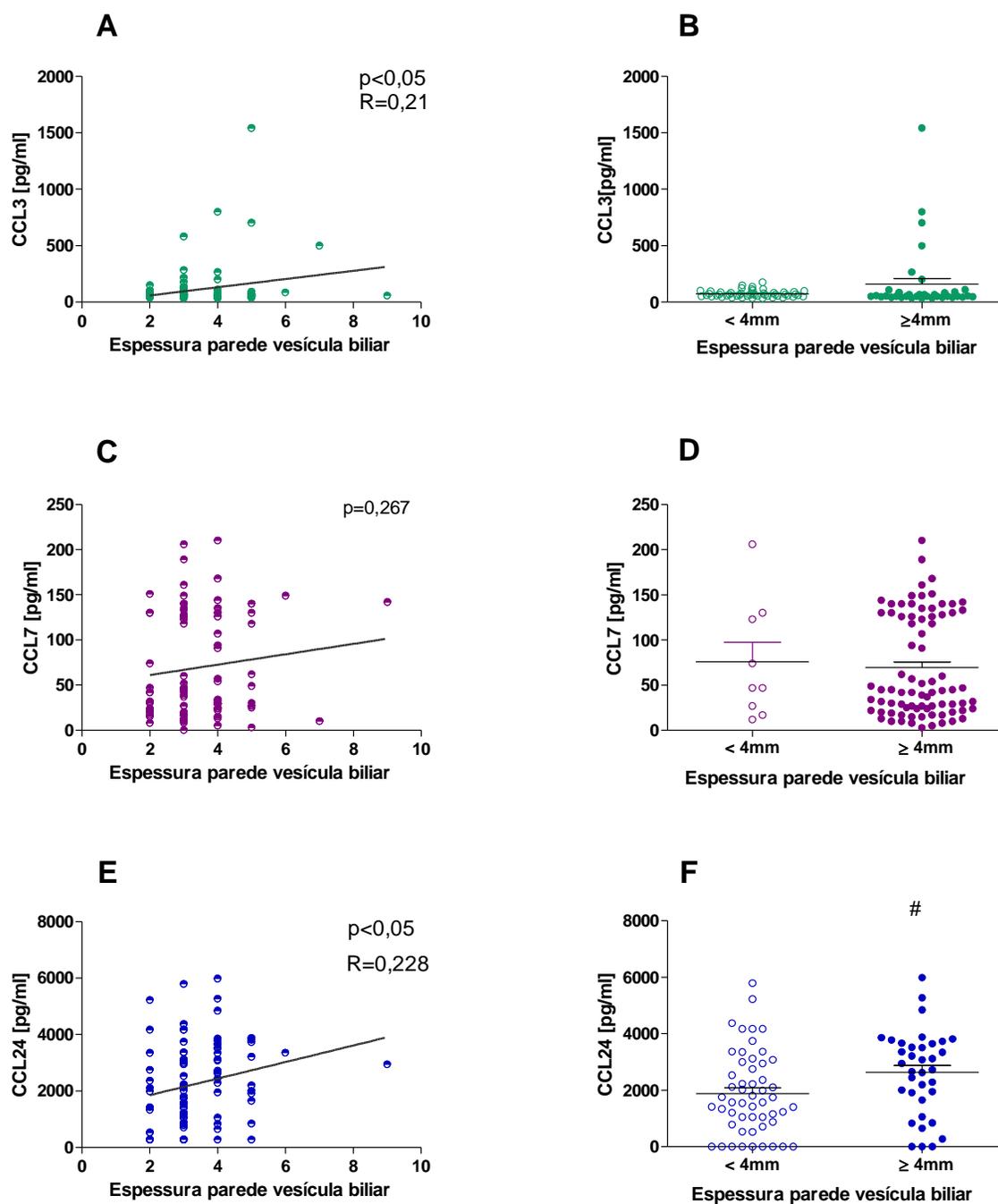


Figura 24. Associação entre a concentração plasmática de CCL3, CCL7 ou CCL24 e as medidas de espessamento perivesicular em pacientes infectados com *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG. Espessura da parede da vesícula biliar apresentados como medida contínua (A, C, E) ou caracterizados (B, D, F). Os dados foram analisados pelo teste de regressão linear na sua forma contínua pelo teste de Mann-Whitney quando foram categorizadas seguindo o protocolo de Niamey 1996 revisto por Richter et al. (2000 e 2001). # representa $p < 0,05$.

As **Tabelas 6 e 7** mostram o modelo ajustado final de regressão múltipla que descreve os efeitos dos parâmetros clínicos, demográficos e ultrassonográficos em relação à produção de CCL3, CCL7 e CCL24. Estas análises mostraram que a produção de CCL3, na população estudada, está positivamente associada ao espessamento fibroso da vesícula biliar. Para cada milímetro de aumento na espessura da parede da vesícula biliar há um aumento dos níveis plasmáticos de 36,6 pg/ml conforme a **Tabela 7**. Já a produção de CCL24 está positivamente associada ao espessamento periportal e perivesicular conforme demonstrado na **Tabela 8**. Para cada aumento na medida de espessamento fibroso vesicular houve um aumento de aproximadamente 707 pg/ml na concentração plasmática de CCL24. Após a construção do modelo de regressão múltiplo para CCL7, constatou-se que esta quimiocina, na área de estudo não foi associada a nenhum parâmetro obtido durante a coleta de dados.

Tabela 7. Modelo de análise Multivariada para CCL3 na população Córrego do Choro, Padre Paraíso-MG.

Variáveis	Níveis de CCL3			
	Coefficiente	IC 95%	Erro padrão	Valor de p
Espessura parede vesícula biliar	36.6327	1.320116 a 1.94529	17.76637	0.042

Tabela 8. Modelo de análise Multivariada para CCL24 na população Córrego do Choro, Padre Paraiso-MG.

Variáveis	Níveis de CCL24			
	Coeficiente	IC 95%	Erro padrão	Valor de p
Espessura veia porta na bifurcação	639.0472	-11.84764 a 1289.942	327.3115	0.043
Espessura da parede da vesícula biliar	707.4473	76.52892 a 1338.366	317.2661	0,028

4.5. DISCUSSÃO

Este estudo seccional avaliou uma possível associação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas com fatores demográficos e clínicos da esquistossomose em indivíduos naturalmente infectados por *S. mansoni* provenientes da comunidade rural de Córrego do Choro, no Município de Padre Paraíso, situado na região do Médio Jequitinhonha, Nordeste do Estado de Minas Gerais. Modelos multivariados de regressão linear foram usados para analisar a relação entre a concentração de quimiocinas e citocinas e as co-variáveis relacionadas à morbidade da esquistossomose.

Os indivíduos da área selecionada apresentaram uma distribuição homogênea quanto à idade e sexo, e baixa carga parasitária (mediana de 36 ovos/g fezes). Na população avaliada não houve associação entre carga parasitária e idade ou faixa etária. Este dado é contrário a muitos trabalhos publicados em que foi possível constatar uma relação inversa entre idade e carga parasitária (Mohamedi-Ali et al. 1999; Kabatereine et al. 1999; Polman et al. 1992). Entretanto, é importante salientar que os estudos que encontram uma relação entre idade e carga parasitária são realizados em área de alta endemicidade, onde grande número dos indivíduos infectados apresenta alta carga parasitária. Esta não é mais a situação de transmissão de esquistossomose na maioria das áreas endêmicas no Brasil. Além disto, em nosso estudo os indivíduos menores de 14 anos, que geralmente apresentam maior eliminação de ovos nas fezes, não foram incluídos nas análises para evitar alterações imunológicas associadas à idade e não à infecção (Speziali et al. 2004). A exclusão das crianças pode ter dificultado a verificação da associação entre idade e carga parasitária na população em estudo, já que há relatos demonstrando que os indivíduos mais jovens apresentam maior carga parasitária (Buttewoth et al. 1994). Outra importante característica verificada foi a ausência de associação entre carga parasitária e parâmetros de morbidade da esquistossomose. A maioria dos trabalhos publicados demonstra que a carga

parasitária é um fator determinante no desenvolvimento das formas graves da esquistossomose crônica (Bina & Prata 2003; Abath et al. 2006; Vennervald & Dunne 2004). No entanto, essa associação é geralmente encontrada em áreas com alta intensidade de infecção (Bina & Prata 2003). Abath et al. (2006) e Andrade (2008) relataram que o desenvolvimento de formas graves da esquistossomose em áreas com baixa intensidade de infecção, demonstrando que a carga parasitária não é o único fator determinante no desenvolvimento de formas graves da doença. Situação semelhante foi observada nos indivíduos examinados neste estudo, nos quais a mediana de ovos eliminados nas fezes foi de 36/grama de fezes; entretanto, mais de 30% dos indivíduos apresentaram sinais de fibrose hepática detectáveis pela ultrassonografia. Áreas endêmicas como a selecionada para este estudo oferecem uma ótima oportunidade para avaliar o papel da resposta imunológica no desenvolvimento da doença independentemente do efeito da carga parasitária.

A melhoria geral da infraestrutura e o acesso ao tratamento quimioterápico tem contribuído com a mudança do quadro da esquistossomose no Brasil. Atualmente, na maioria das áreas endêmicas, a população apresenta baixa carga parasitária, dificultando o diagnóstico específico e é frequentemente sujeita a reinfecções, o que constitui um importante fator para evolução da morbidade da esquistossomose (Gomes et al. 2013; Grenfell et al. 2013). Por isso, os quadros clínicos graves clássicos vêm se tornando menos frequente (Lambertucci et al. 2000; Grenfell et al. 2013; Scholte et al. 2014) e a caracterização dos pacientes que apresentam algum acometimento hepatoesplênico baseada exclusivamente no exame clínico não é recomendado, pois é uma avaliação subjetiva e as alterações possíveis de analisar ao exame clínico não são consideradas específicas para a esquistossomose. Por outro lado, a avaliação ultrassonográfica permite identificar lesões teciduais decorrentes da esquistossomose crônica e suas repercussões na circulação de maneira não invasiva; além disto, as alterações podem ser identificadas e

mensuradas mesmo em indivíduos que não apresentam a forma clínica grave clássica da doença (Lambertucci et al. 2000). A procura de marcadores indiretos que reflitam alterações e atuem como biomarcadores de desenvolvimento de esquistossomose grave ainda persistem. Dentre os indivíduos que participaram do estudo, encontramos ao menos 30% destes indivíduos com desenvolvimento de algum grau de fibrose como espessamento periportal e perivesicular sem necessariamente apresentarem a forma clínica hepatoesplênica.

A morbidade da esquistossomose crônica tem sido relacionada com o processo inflamatório induzido pela deposição de ovos do parasito nos tecidos do hospedeiro, especialmente no fígado e intestino (Boros 1989; Chuah et al. 2014). O recrutamento e ativação de leucócitos da circulação para o sítio inflamatório requer a síntese e a liberação local de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Almadi et al. 2011). As citocinas e quimiocinas exercem papel fundamental no desenvolvimento de doenças hepáticas crônicas e no processo de reparação tecidual, que podem conduzir a resolução ou a inflamação crônica, fibrose tecidual e desenvolvimento de manifestações clínicas da doença hepática (Zimmermann et al. 2011). Embora a inflamação seja observada na maioria das condições associadas com lesões crônicas, o papel funcional de citocinas e quimiocinas específicas e seus receptores cognatos diferem entre as distintas doenças hepáticas crônicas (Almadi et al. 2011; Marra & Tacke 2014). A correlação entre as diferentes formas clínicas da esquistossomose humana e o estabelecimento de distintos padrões de produção de citocinas e quimiocinas ainda não estão completamente definidos ou se apresentam de forma contraditória (Abath et al. 2006; Burke et al. 2009).

Nossos dados mostram que a concentração plasmática de citocinas pró-inflamatórias, tanto TNF- α como MIF, e das quimiocinas CCL3, CCL7 e CCL24, não foi relacionada a aumento do baço e do fígado nos indivíduos infectados avaliados neste estudo. Todavia, foram

detectadas relações importantes entre a concentração destas citocinas e quimiocinas com o espessamento fibroso periportal. Entre os 97 indivíduos infectados examinados neste estudo, somente 4 apresentavam quadro clássico de hepatoesplenomegalia, com aumento de baço, diminuição do lobo direito do fígado e espessamento periportal, mas cerca de 30% apresentaram sinais de fibrose periportal. Estudos epidemiológicos revelam que pacientes em fases iniciais da esquistossomose hepatoesplênica são caracterizados por demonstrar a fibrose periportal sem esplenomegalia (Cerri et al. 1992) ou apresentam alterações hepatoesplênicas ainda discretas (Machado et al. 2002), semelhantes ao quadro detectado nos pacientes avaliados neste estudo.

O estabelecimento de marcadores que possam ser importantes no prognóstico dos pacientes com potencial de desenvolvimento de doença grave é importante no contexto atual da esquistossomose no Brasil, no qual se observa áreas de baixa intensidade de transmissão (Gonçalves et al. 2006; Grenfell et al. 2013) em que a carga parasitária parece não ser o principal fator no desenvolvimento de doença crônica grave. A maioria dos trabalhos com o objetivo de caracterizar o perfil de resposta imunológica em pessoas de áreas endêmicas de esquistossomose se baseia na estimulação de células recuperadas da circulação *in vitro* com antígenos de *S. mansoni*, já que a maioria das citocinas apresenta meia vida curta e são consumidas rapidamente dificultando a sua detecção no soro dos indivíduos. A validação de mediadores imunológicos que possam ser facilmente detectados na circulação pode facilitar na caracterização dos pacientes e na adequação do seu tratamento com intuito de reduzir a morbidade. As citocinas pró-inflamatórias são moléculas prontamente liberadas na circulação e seus níveis podem se manter detectáveis por um tempo maior. As quimiocinas são outros elementos importantes e que podem ser mais facilmente detectadas em comparação com as citocinas, pois apresentam meia-vida mais longa.

Aumento da produção de MIF tem sido associado à indução e regulação de processos inflamatórios associados a doenças crônicas (Lue et al. 2002; Calandra et al. 2003). A observação de que a expressão de MIF persiste em doenças estabelecidas tem sustentado a hipótese de que esta citocina seja importante durante o processo inflamatório (Donnelly & Bucala 1997). Suas funções estão associadas principalmente a ativação e regulação de macrófagos, que também é uma importante fonte de MIF *in vivo*, além de participar da ativação de linfócitos T e B (Calandra et al. 1994; Bacher et al. 1996; Kleemann et al. 2000), que são elementos celulares de fundamental importância para formação e modulação do granuloma esquistossomótico. Conforme demonstrado por Weinstock et al. (1983) e Magalhães et al. (2004), MIF é produzida durante a formação do granuloma e participa no recrutamento de eosinófilos durante a fase aguda da infecção experimental por *S. mansoni* em camundongos. Além disso, trabalho prévio do nosso laboratório que avaliou camundongos geneticamente deficientes na produção de MIF durante a infecção por *S. mansoni* (Rodrigues et al. 2009) revelou que a citocina não afeta a carga parasitária, mas é importante na polarização da resposta TH-2, na infiltração de eosinófilos e macrófagos no granuloma e na deposição de colágeno no tecido hepático. Não há relatos anteriores sobre a participação de MIF na esquistossomose em humanos. No presente estudo, a produção de MIF foi aumentada nos indivíduos infectados por *Schistosoma mansoni* e a concentração plasmática desta citocina não foi associada à carga parasitária ou à ocorrência de reinfecção, estimada através do relato clínico de tratamento anterior para esquistossomose. Entretanto, foi verificada uma associação positiva entre a concentração plasmática de MIF e o aumento do espessamento fibroso periportal. A participação de MIF em processos fibróticos teciduais também tem sido demonstrada em modelo de asma experimental, no qual a administração de um antagonista de MIF acarretou em uma menor deposição tecidual de

colágeno (Chen et al. 2010). Também há relatos da produção aumentada de MIF em modelos experimentais de fibrose hepática induzidos pelo tratamento com Concanavalina-A (Nakajima et al. 2006). Na população humana, níveis elevados de MIF também foram associados à fibrose em pacientes com fibrose cística (Adamalli et al. 2012). Em contraste, no modelo de fibrose hepática induzido pelo tratamento com CCl₄ (tetracloreto de carbono), MIF inibiu o processo de fibrose tecidual hepática crônica (Heinrichs et al. 2011). O tratamento com CCl₄ induz fenômenos necroinflamatórios no fígado, que evoluem com alterações fibróticas, inicialmente focais e posteriormente difusas, resultando em aumento da deposição de elementos do tecido conjuntivo e da pressão na veia porta. Esse modelo experimental reproduz a fibrose hepática que ocorre em pacientes cirróticos que parece ser mediado principalmente por IFN- γ e TNF- α , indicando que o ambiente de resposta predominante pode interferir no papel de MIF no desenvolvimento da fibrose. Estudos revelam aumento da produção de MIF em processos inflamatórios com predomínio da resposta Th2, indicando que MIF pode ser um amplificador da resposta inflamatória, independente do perfil Th1 ou Th2 (Bacher et al., 1996).

A associação de MIF com fibrose obtida nos pacientes com esquistossomose avaliados neste estudo confirmam os resultados obtidos em modelo experimental em que camundongos deficientes na produção de MIF tiveram redução significativa de hidroxiprolina no tecido hepático, sugerindo menor deposição de colágeno (Rodrigues, 2009). No caso da infecção experimental por *Schistosoma mansoni* a produção de MIF estimula a inflamação amplificando a resposta do tipo 2, com aumento de IL-13, que é determinante no processo de deposição de colágeno. Outros estudos em modelos experimentais de fibrose indicam que MIF pode atuar em células estreladas hepáticas (HSC), pois estas células expressam CD74, um dos receptores de MIF (Heinrichs et al. 2011), e a expressão de MIF foi aumentada no processo de ativação de

HSCs *in vitro*, sugerindo o envolvimento de MIF no processo de fibrose de fibrose hepática (Zhu et al. 2013). Estudos evidenciam que MIF, direta ou indiretamente, promove a expressão ou produção de moléculas pró-inflamatórias, incluindo a citocina TNF- α (Calandra et al. 1994; Donnely et al. 1997).

TNF- α é uma citocina que pode estar envolvida na formação do granuloma e na evolução de processos fibróticos teciduais; entretanto, seu papel na morbidade da esquistossomose ainda é controverso. Hoffmann e colaboradores (1998) demonstraram em modelos experimentais que esta citocina desempenha um papel protetor, pois induz recrutamento celular durante a formação do granuloma ao redor do ovo (Amiri et al. 1992; Lukacs et al. 1994; Cheever et al. 1999; Bogliolo 2000), enquanto outros autores atribuem a TNF- α efeitos pró-inflamatório e pró-fibrótico (Hoffmann et al. 1998; Mwatha et al. 1998; Henri et al. 2002; Booth et al 2004). Hasseb et al. (2001) demonstraram que durante a esquistossomose experimental a concentração sérica de receptor sTNF-R1 está diretamente relacionada com a concentração de TNF- α . No presente estudo, verificou-se o aumento significativo dos níveis TNF- α , indiretamente estimado pelo aumento na concentração plasmática do receptor solúvel sTNF-R1, em indivíduos infectados por *S. mansoni* em relação aos indivíduos controle que não apresentaram a infecção. Os indivíduos infectados do sexo masculino apresentaram concentrações plasmáticas de sTNFR1 mais elevada e ocorreu uma associação positiva entre a concentração de sTNF-R1 e carga parasitária, estimada pelo número de ovos eliminados nas fezes. A associação entre a produção de TNF- α e a carga parasitária foi relatada previamente (Shahat et al. 2007). Trabalhos também mostraram concentração elevada de TNF- α em homens, que também apresentaram maior risco de desenvolverem fibrose periportal (Silva-Teixeira et al. 2004; Booth et al 2004). Estes autores sugerem que o aumento de TNF- α em homens possa ser em decorrência da ocupação

profissional que nessas regiões possa favorecer o contato com o parasito e, conseqüentemente, maior carga parasitária. Entretanto, é importante salientar que na população em estudo a análise multivariada revelou que a associação entre sTNF-R1 e carga parasitária não permanece, sugerindo efeito direto de TNF- α na fibrose. Este resultado pode refletir as características desta área de transmissão, onde a carga parasitária é baixa e não foi associada com morbidade, ao mesmo tempo isto permite uma análise do papel de TNF- α dissociado da carga parasitária. Na população avaliada neste estudo também foi verificada uma associação positiva da concentração plasmática de sTNFR-1 e o espessamento fibroso perivesicular e periportal, indicando a possível participação desta citocina pró-inflamatória na evolução da morbidade da esquistossomose. Outros estudos também relatam associação positiva da produção de TNF- α , no soro ou em células do sangue periférico estimuladas *in vitro*, e desenvolvimento de fibrose periportal em pacientes com esquistossomose que foram avaliados por ultrassonografia em áreas endêmicas do Brasil e da África (De Souza et al. 2012 ou 2002; Silva-Teixeira et al. 2004; Booth et al 2004). Recentemente Fernandes et al. (2014), trabalhando em área endêmica brasileira onde a população infectada apresenta baixa carga parasitária, demonstraram que monócitos do sangue periférico de pacientes caracterizados por US com fibrose moderada ou grave expressaram altos níveis de TNF- α , mas o grau de fibrose não foi positivamente relacionado à carga parasitária. Outro trabalho em duas áreas do Quênia (Mwatha et al. 1998) e no Brasil (Zwingenberger et al. 1990) também demonstraram uma associação do aumento dos níveis de TNF- α e a forma hepatoesplênica da esquistossomose. Nestes estudos a morbidade da esquistossomose foi avaliada apenas por exame clínico e o estudo foi realizado em área de alta prevalência de malária, infecção que também induz aumento de TNF- α e hepatoesplenomegalia (Clark et al 2003; De Jesus et al 2004), e por isso sua interpretação deve ser cautelosa.

Outros estudos publicados demonstram uma ausência de associação entre a produção de TNF- α e os quadros graves da esquistossomose crônica (De Jesus et al. 2004 ou 2002; Magalhães et al. 2004; Oliveira et al. 2006; De Souza et al.2012). A intensidade da infecção e grau de fibrose oscila consideravelmente entre os diferentes estudos, e isto pode explicar porque uma associação positiva tem sido encontrada em algumas análises (Mohamed-Ali et al 1990; Alves-Oliveira et al. 2006), mas não em outras (Booth et al. 2004 e de Jesus et al 2004). No caso dos estudos da África, áreas com elevadas prevalências e com uma população com elevada carga parasitária são geralmente relatadas nos trabalhos. No Brasil, encontramos estudos em diferentes situações de transmissão, com diferentes taxas de prevalência e diferentes níveis de eliminação de ovos. Alguns autores (Magalhães et al. 2004; De Jesus et al., 2004) sugerem que o estado clínico dos pacientes avaliados podem justificar as diferenças obtidas na relação de TNF- α e morbidade; segundo os autores, a ausência de associação entre TNF- α e morbidade da esquistossomose pode ser justificada pelo fato dos pacientes analisados se encontrarem em um estágio "pré-hepatoesplênico", uma forma clínica inicial da esquistossomose crônica, enquanto vários trabalhos avaliaram pacientes com doença crônica avançada (Mwatha et al 1998; Booth et al 2004; Henri et al 2002). Deve-se também levar em consideração o protocolo de escolha e como ele foi usado para a classificação dos pacientes. Por exemplo, o protocolo de Cairo, considera como pacientes com esquistossomose grave aqueles que apresentam grau II e III de fibrose, enquanto que os pacientes com grau I não são considerados durante as análises. No entanto, a avaliação da fibrose como realizada no presente estudo, independente do grau, pode ser essencial para o entendimento da associação da resposta imune na evolução da esquistossomose. Até mesmo porque o desenvolvimento de formas graves da doença ocorre em somente uma pequena parcela da população infectada (Bica et al. 2000). Desta forma o nosso

trabalho não usou a classificação dos pacientes em graus I, II e III, mas utilizou as medidas de espessamento periportal e perivesicular como medidas contínuas, independente do estágio da doença. Nossos dados mostram associação positiva dos níveis de sTNF-R1 com fibrose, independente do grau de gravidade da esquistossomose crônica, indicando uma relação importante entre produção de TNF- α e fibrose induzida pela infecção por *S. mansoni*. Os possíveis mecanismos de atuação de TNF- α na fibrose ainda não estão claros; entretanto, modelos experimentais demonstraram que TNF- α estimula a síntese de colágeno e a deposição de matriz extracelular durante a formação do granuloma (Amiri et al. 1992; Joseph & Boros 1993). Essa citocina é uma importante indutora de proteinases, as MMPs (matrix de metaloproteinases), que estão envolvidas no metabolismo de colágeno encontrado na matriz extracelular. Ainda não está claro como a produção de TNF- α , MMPs e seus inibidores (TIMPs inibidores teciduais de metaloproteinases) correlacionam com a evolução desenvolvimento de fibrose hepática na esquistossomose humana (Booth et al. 2004; Ramadan et al. 2013). Uma possível explicação dos efeitos de TNF- α na evolução de fibrose tecidual pode ser relacionada ao balanço local da resposta Th1 e Th2 (Hernandes-Pando 1994). Segundo este autor, em uma infecção crônica com perfil misto de resposta, a liberação de TNF- α estimula a lesão tecidual, pois neste ambiente os macrófagos tem a sua função “modulada”. Assim a produção desta citocina não é eficaz na eliminação do agente causador da inflamação, causando lesões crônicas ao tecido podendo levar ao processo de fibrose. Porém o seu papel funcional no desenvolvimento da fibrose periportal ainda não foi esclarecido (Booth et al. 2004). De forma interessante, encontramos uma diminuição dos níveis do receptor solúvel de TNF- α no plasma de indivíduos que relataram tratamento anterior para a esquistossomose. Alguns estudos pós-tratamento tem demonstrado que a resposta imune de indivíduos de área endêmica é alterada e que estas

mudanças podem estar envolvidas com a resistência à infecção (Hagan et al. 1991; Dunne et al. 1992). Um significativo decréscimo no desenvolvimento de formas clínicas graves tem sido observado após tratamento em populações de áreas endêmicas (Correa-Oliveira 2000). Na área de estudo, verificamos associação do aumento dos níveis de sTNF-RI com fibrose, e desta forma a reinfecção, por diminuir a concentração do receptor no plasma, pode prevenir o desenvolvimento de quadros mais graves da patologia crônica da esquistossomose.

Não encontramos nenhuma associação entre a produção MIF e TNF- α na população selecionada para as análises. Relatos na literatura têm demonstrado que o aumento dos níveis de MIF também estimula a produção de TNF- α por macrófagos após estímulo por LPS (Calandra et al. 1994; Calandra et al. 2000) e em modelo de infecção aguda por *Pseudomonas aeruginosa* (Bozza et al. 1999). Nestes modelos, porém, este *feedback* pró-inflamatório, a princípio, ocorre em ambientes com predominância de perfil imunológico do tipo 1. Já no caso de infecção por *S. mansoni*, que tem predominância de resposta do tipo 2 na sua fase crônica, o aumento dos níveis de MIF parece não ser determinante na produção de TNF- α . Em outro modelo de infecção por helminto, Prieto-Lafuente et al (2009), demonstraram que a produção de MIF em conjunto com IL-4 induziu a expressão do receptor de IL-4 em macrófagos, sugerindo a participação dessa citocina no desenvolvimento e na regulação da resposta do tipo 2 e na diferenciação em M2.

O papel de quimiocinas durante a formação do granuloma tem sido descrito em trabalhos que focam na formação de granulomas pulmonares (Chuah et al. 2014; Chensue et al. 2013). Entretanto, o papel de quimiocinas no desenvolvimento da fibrose periportal em decorrência da esquistossomose crônica em população naturalmente infectada ainda é pouco entendido (Burke et al. 2009). Trabalhos em modelo experimental tem demonstrado a participação de CCL7 durante a formação do granuloma pulmonar; neste modelo CCL7 produzida principalmente por

células endoteliais atua no recrutamento de eosinófilos que expressam principalmente CCR3 (Shang et al. 2002). Há relatos que demonstraram que CCL7 pode ser mais importante que CCL11 no recrutamento de eosinófilos durante a formação de granulomas (Ruth et al. 1998). Através da análise de *microarray* genômico em amostras de fígado de animais infectados por *S. japonicum*, os autores demonstraram um aumento de expressão de genes que codificam CCL7 em fases tardias da infecção experimental, e adicionalmente demonstraram a imunolocalização de CCL7 na zona fibrótica dos granulomas com distribuição similar a de HSCs (Burke et al. 2010), sugerindo a participação CCL7 durante a resposta fibrótica no modelo de infecção por *S. japonicum*. Em nossas análises, a concentração plasmática de CCL7 nos indivíduos infectados por *S. mansoni* não foi estatisticamente diferente dos indivíduos não infectados e não foi detectada nenhuma relação entre a concentração de CCL7 e carga parasitária ou qualquer parâmetro de morbidade.

Outra citocina envolvida na quimiotaxia de eosinófilos é a CCL24, cujo aumento tem sido associado com a resposta do tipo2 (Zimmermann et al. 2003). Em população naturalmente infectada, Silveira-Lemos et al. (2010) encontraram aumento dos níveis de CCL24 em indivíduos infectados por *S. mansoni*, durante a fase aguda da infecção. No entanto, ainda são poucos os relatos de trabalhos que demonstrem a participação de CCL24 na hepatopatologia induzida por *S. mansoni*. Na população examinada no trabalho atual foi possível verificar aumento da concentração plasmática de CCL24 nos indivíduos infectados em comparação aos não infectados, assim como já documentado por Souza-Pereira et al (2006). Além disso, constatamos uma associação positiva entre aumento dos níveis de CCL24 e desenvolvimento de fibrose periportal e perivesicular, indicando que o aumento dos níveis séricos desta quimiocina pode estar positivamente associado ao desenvolvimento da fibrose. Souza-Pereira et al. (2006)

demonstraram o aumento dos níveis de CCL24 em pacientes com mielorradiculopatia e em pacientes classificados clinicamente e por ultrassom como hepatoesplênicos. A participação de CCL24 em outros processos fibróticos foi anteriormente descrita, sendo verificada associação desta quimiocina com a produção de colágeno ou ácido hialurônico por fibroblastos na derme (Kim et al. 2014).

Zimmermann et al. (2003) demonstraram que há um mecanismo de integração entre a produção de IL-13 e de quimiocinas CC. A produção das citocinas IL-4 e IL-13 pode induzir a produção de quimiocinas da família MCP (proteína quimiotática de monócitos) e as eotaxinas (CCL11 e CCL24) que são ligantes de CCR3. Por sua vez, ligantes de CCR3 promovem a migração dos linfócitos Th2 que produzem IL-13. Esta cooperação entre IL-13 e quimiocinas pode ser relevante na fisiopatologia de doenças com predominância de resposta do tipo 2 como na esquistossomose crônica. Souza-Pereira et al. (2006) relataram o aumento dos níveis plasmáticos de CCL11, CCL24 e de IL-13 no líquido cérebro-espinhal nos pacientes com mielorradiculopatia e também nos pacientes classificados como portadores da esquistossomose hepatoesplênica, evidência consistente com a existência de um eixo IL-13/quimiocinas durante a esquistossomose. A descoberta também é consistente com a visão de que as células Th2 são importantes na resposta contra *S. mansoni* (Ross et al. 2002; Pearce 2005) e que podem ser determinantes na evolução da doença crônica.

Em modelos experimentais, camundongos deficientes na produção de CCL3 apresentaram redução no tamanho dos granulomas hepáticos, atividade de peroxidase de eosinófilos reduzida e menor deposição de colágeno (Souza et al. 2005). Além disso, a redução de tamanho de cerca de 40% do granuloma pulmonar foi relatada em modelo de formação de granuloma pulmonar e emprego de anticorpos neutralizantes contra o CCL3 (Lukacs et al. 1993),

e em camundongos deficientes na expressão do receptor CCR1, um dos receptores de CCL3 (Gao et al. 1997). Fato que indica que a quimiocinas CCL3 possa ser importante no desenvolvimento da patologia crônica da esquistossomose. Analisando a concentração de CCL3 no plasma dos pacientes que participaram do presente estudo, observamos que a concentração plasmática de CCL3 nos pacientes infectados não foi diferente do nível encontrado nos indivíduos não infectados, bem como não houve associação entre concentração de CCL3 e a carga parasitária, estimada pela contagem de ovos eliminados nas fezes. Entretanto, na população avaliada, os níveis plasmáticos de CCL3 foram positivamente associados à fibrose perivesicular em decorrência da esquistossomose crônica. Ou seja, mesmo em pacientes com baixa carga parasitária e com quadros clínicos considerados não graves, foi verificada uma relação positiva entre CCL3 e fibrose, reforçando os dados de que o aumento dos níveis de CCL3 podem estar relacionados com a gravidade da esquistossomose. Souza-Pereira et al. (2006), também documentaram que a concentração plasmática de CCL3 nos indivíduos classificados como crônicos intestinais foram semelhantes aos indivíduos controle, entretanto, no mesmo estudo, observou-se um aumento significativo de CCL3 no soro de indivíduos classificados como hepatoesplênicos. De forma contrária, De Souza e colaboradores (2012) encontraram uma relação positiva entre carga parasitária e aumento dos níveis de CCL3 em pacientes cronicamente infectados em área de alta transmissão para a infecção por *S. mansoni*. Este trabalho, porém não apontou associação entre os níveis de CCL3 e fibrose portal. Entretanto, os autores salientam que os pacientes que participaram do estudo poderiam se encontrar em um estágio pré-fibrótico, já que há associação estatística significativa entre a carga parasitária e os níveis de CCL3, tendo em vista que a carga parasitária é considerada um dos fatores determinantes no desenvolvimento da fibrose. Associação da concentração de CCL3 com

fibrose tem sido relatada em trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Falcão et al. 2002; Souza et al. 2005 e 2008) em áreas com alta intensidade de infecção. Os dados obtidos no presente estudo corroboram com os trabalhos anteriores que relacionam a produção desta quimiocina com a morbidade da esquistossomose, contudo, agora observamos relação com a patologia sem interferência da carga parasitária, sendo por isso um indício importante da participação de CCL3 nos quadros de fibrose durante a esquistossomose crônica. Trabalhos experimentais tentam mostrar os mecanismos de atuação de CCL3 como quimiocina pró-fibrótica. Ishida et al. (2007) mostram que em modelo de fibrose pulmonar a produção de CCL3 é importante no recrutamento de fibroblastos e macrófagos e na indução da produção de TGF- β . Camundongos deficientes na produção de CCL3 e de CCR5 apresentaram menor deposição de colágeno, menor infiltração de fibroblastos e macrófagos no tecido lesionado, e produção de TGF- β , principalmente por macrófagos, diminuindo a fibrose pulmonar experimental induzida por bleomicina (BLM). Adicionalmente seria interessante mencionar que há trabalhos demonstrando a importância da participação de CCL3 na expressão de citocinas de perfil Th2, incluindo IL-13 (Oliveira et al. 2000; Souza et al. 2005) importante no processo de fibrose tecidual.

Embora alguns estudos mostrem a utilização de alguns marcadores externos de fibrose, como pró-colágeno I, ácido hialurônico, TGF- β , ou excreção de hidroxiprolina urinária, ainda não existam marcadores confiáveis de fibrose hepática (Andrade 2004). Os dados indicam que níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas da resposta do tipo-2 podem ser indicadores de gravidade da esquistossomose crônica humana, podendo ser considerados potenciais indicadores de fibrose hepática na esquistossomose crônica em população de área endêmica para a esquistossomose.

4.6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES (CAPÍTULO I)

- Os pacientes infectados por *S. mansoni* em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG, apresentam uma baixa intensidade de infecção com mediana de 36 ovos eliminados por grama de fezes;
- Nesta população de estudo, não houve associação entre a intensidade da infecção e idade, sexo e histórico de tratamentos prévios para a esquistossomose;
- A carga parasitária também não foi associada aos parâmetros obtidos de morbidade da esquistossomose;
- A infecção conduz a aumentos significativos dos níveis plasmáticos de MIF, sTNF-R1 e CCL24 em pacientes infectados por *S. mansoni* em relação aos indivíduos controle;
- O aumento dos níveis de sTNF-R1 e de CCL7 e foi maior em indivíduos do sexo masculino foram associados a alterações clínicas obtidas pela avaliação médica;
- Maiores concentrações de sTNF-R1 e de CCL7 foram associados a alterações clínicas obtidas pela avaliação médica;
- O aumento da concentração plasmática da citocinas pró-inflamatória MIF e do receptor solúvel de TNF na população de estudo, estão associadas à fibrose periportal e perivesicular;

- O aumento dos níveis plasmáticos de CCL3 e CCL24 foi positivamente associado ao espessamento fibroso portal e perivesicular em indivíduos selecionados para o estudo residentes em Córrego do Choro, Padre Paraíso, MG.
- Os dados indicam que o aumento das concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas da resposta do tipo-2 podem ser indicadores de fibrose hepática na esquistossomose crônica em população naturalmente infectada.

5. CAPÍTULO II

Influência de CCL3 e do receptor CCR5 durante a formação do granuloma hepático induzido pela deposição de ovos de *S. mansoni*.

5.1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma helmintose crônica e debilitante que afeta mais de 200 milhões de pessoas no mundo, dos quais aproximadamente 20 milhões desenvolvem formas graves da doença (Crompton 1999; Chitsulo et al. 2000). A evolução da esquistossomose crônica tem sido associada à extensão e intensidade da resposta imunológica do hospedeiro aos antígenos secretados dos ovos do parasito. A deposição dos ovos de *S. mansoni* e sua retenção nos vasos sanguíneos de pequeno calibre no fígado e intestino estimula a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias por células residentes, que induzem a migração de células inflamatórias circulantes, as quais estimulam a diferenciação e ativação de miofibroblastos e macrófagos M2, intensificando a produção de matriz extracelular e deposição de colágeno, culminando na formação do granuloma. (Andrade 2009; Almadi et al. 2011; Hams et al. 2013; Lundy & Lukacs 2013). A formação e modulação do granuloma é um processo dinâmico, que resulta no confinamento de produtos tóxicos produzidos pelo parasito, mas também tem sido associado com a maioria dos sintomas clínicos, pois os granulomas podem ocasionar lesões obstrutivas vasculares, fibrose periportal e, conseqüentemente, aumento na pressão intra-portal (Boros & Warren 1970; Cheever et al., 2000; Andrade, 2009; Wynn and Barron 2011). Desta forma, o melhor entendimento de fatores imunológicos envolvidos na indução e modulação do granuloma esquistossomótico pode permitir o desenvolvimento de estratégias mais eficientes de controle de morbidade, bem como estabelecer marcadores biológicos de evolução clínica da esquistossomose. Trabalhos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa têm demonstrado que a quimiocina CCL3 e seus receptores tem papel fundamental na formação do granuloma, sendo que níveis elevados desta quimiocina estão associados com esquistossomose grave, tanto em

modelo experimental como na infecção humana (Falcão et al. 2002; Souza et al., 2005; capítulo 1 deste trabalho).

A quimiocina CCL3 (Macrophage Inflammatory Protein-1/MIP-1 α), é funcionalmente classificada no grupo das quimiocinas inflamatórias (Moser et al., 2004; Zlotinik et al. 2012) e participa de processos inflamatórios agudos e crônicos em tecidos inflamados. CCL3 é produzida pela maioria das células hematopoiéticas maduras como linfócitos, macrófagos, basófilos, neutrófilos, eosinófilos, células dendríticas (DCs), células NK (natural killer) (Menten et al. 2002). No fígado, CCL3 pode ser produzida por células residentes, como células de Kupffer e Células Estreladas Hepáticas (HSCs) após estímulo inflamatório (Czaja 2014; Marra & Tacke 2014). Sua produção é importante para atração de tipos celulares que expressam os receptores CCR1 ou CCR5. CCR1 é expresso principalmente por células T, monócitos, eosinófilos, basófilos, células NK, DCs. O receptor CCR5 é expresso principalmente em células T e macrófagos (Charo 2006; Murphy et al. 2000; Chensue et al. 2013). No caso da infecção por *S. mansoni*, Lukacs et al. (1993) verificaram que o granuloma induzido por ovos do parasito embolizados no pulmão apresentaram redução significativa de volume quando os animais foram tratados com anticorpos neutralizantes contra o CCL3. Estudos prévios do nosso grupo e pesquisa também demonstraram a participação de CCL3 e do receptor CCR5 na patogênese da esquistossomose mansoni experimental. Neste estudo foi verificado que camundongos geneticamente deficientes na produção de CCL3 apresentaram redução no tamanho dos granulomas hepáticos e menor deposição de colágeno em comparação com animais não deficientes (Souza et al. 2005). Camundongos deficientes na expressão do receptor CCR1, um dos receptores de CCL3, também apresentam granulomas esquistossomótico menor em relação aos animais não deficientes (Gao et al. 1997), indicando que a ativação CCL3/CCR1 participa do

efeito deletério da produção CCL3 na esquistossomose. Entretanto, é importante relembrar que CCL3 se liga a outros receptores além de CCR1, incluindo CCR5. Em contraste com os dados obtidos em camundongos deficientes em CCL3 ou no receptor CCR1, camundongos geneticamente deficientes no receptor CCR5 desenvolveram patologia hepática grave quando experimentalmente infectados por *S. mansoni*. Nestes animais os granulomas hepáticos foram maiores, com maior celularidade e deposição de colágeno, que resultou em uma maior taxa de mortalidade durante a fase crônica da infecção experimental (Souza et al. 2011). Estes resultados sugerem que a atuação de CCL3 na formação do granuloma hepático depende do balanço entre a ação pró-inflamatória, exercida especialmente pela ativação do receptor CCR1, e ação modulatória, via ativação de CCR5 (Souza et al. 2008). Desta forma, a avaliação comparativa dos elementos celulares que compõem granulomas hepáticos e do seu perfil de ativação durante a infecção experimental de *S. mansoni* em camundongos deficientes em CCL3 e no receptor CCR5 permitirá um melhor entendimento dos mecanismos de modulação do granuloma esquistossomótico e constitui o principal objetivo desta etapa do trabalho.

5.2 OBJETIVOS

5.2.1. Objetivo geral:

Investigar a participação da produção de CCL3 e da ativação do receptor CCR5 na determinação do recrutamento e ativação celular durante a formação do granuloma hepático induzido pela deposição de ovos de *S. mansoni* em camundongos durante as fases aguda e crônica da infecção.

5.2.2. Objetivos específicos segunda etapa (capítulo II)

(1) Avaliar a carga parasitária através da quantificação do número de vermes *Schistosoma mansoni* recuperados da circulação, o número de ovos eliminados nas fezes e os ovos retidos no intestino e no fígado em camundongos C57BL/6 não deficientes e em camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes na produção de CCL3 de CCR5;

(2) Analisar as alterações patológicas induzidas pela infecção por *S. mansoni* em camundongos C57BL/6 não deficientes e em camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes na produção de CCL3 de CCR5;

(3) Quantificar a produção de quimiocinas (CXCL1, CCL3 e CCL11) no tecido hepático e nos granulomas hepáticos isolados de camundongos C57BL/6 não deficientes e em camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes na produção de CCL3 de CCR5;

(4) Quantificar a produção de citocinas (TNF- α , MIF, IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-5, IL-13, IL-10, TGF- β) no tecido hepático e nos granulomas hepáticos isolados de camundongos C57BL/6 não deficientes e em camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes na produção de CCL3 de CCR5;

(5) Caracterizar a infiltração celular no granuloma hepático em camundongos C57BL/6 não deficientes e em camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes na produção de CCL3 de CCR5;

(6) Caracterizar fenotipicamente as células isoladas do granuloma hepático em camundongos C57BL/6 não deficientes e geneticamente deficientes na produção de CCL3 de CCR5;

(7) Verificar o perfil de ativação de células CD11b⁺ isolados do granuloma hepático de camundongos C57BL/6 não deficientes e geneticamente deficientes na produção de CCL3 de CCR5;

5.3. METODOLOGIA

5.3.1. Animais experimentais e infecção

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos C57/BL6 não deficientes (WT) provenientes do CEBIO-ICB-UFMG, camundongos C57/BL6 geneticamente deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), originalmente descrito por Cook et al. (1995) provenientes do Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ, MG, e camundongos geneticamente deficientes na produção do receptor CCR5 (CCR5^{-/-}) (Zhou et al., 1998) cedidos pelo Dr. Mauro Martins Teixeira. Os animais são mantidos no biotério do laboratório de esquistossomose do Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG, mantidos em gaiolas apropriadas e alimentados com ração granulada para camundongos (Nuvilab, fabricado por Cargill Nutrição Animal Ltda, São Paulo, Brasil) e água potável *ad libitum*. Os procedimentos experimentais receberam aprovação do Comitê de Ética Animal (CETEA-UFMG) sob protocolo de 158/08.

Schistosoma mansoni da linhagem LE (Valadares et al. 1981) foi utilizado para infecção dos camundongos. Essa linhagem de *S. mansoni* tem sido mantida em infecções experimentais de *Biomphalaria glabrata* e hamsters (*Mesocricetus auratus*), no laboratório de Esquistossomose (GIDE/ICB/UFMG), segundo técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968). Para infecção dos camundongos foram utilizadas cercárias obtidas de *B. glabrata* infectados e expostos por 4h à iluminação artificial em água desclorada. As cercárias obtidas foram avaliadas quanto à viabilidade, concentradas e contadas com o auxílio de lupa, sendo inoculadas, por via subcutânea, 25 cercárias por animal.

5.3.2. Delineamento Experimental

Rotineiramente antes do início do experimento, todos os animais utilizados foram submetidos ao tratamento oral com 4 mg/Kg de Ivermectina (Laboratório Chemitec Agro – Veterinária, São Paulo, Brasil) por sete dias consecutivos (Klement et al. 1996) e com 75 mg/Kg em dose única de Cestox® (MERCK). Após 10º dia do final do tratamento os camundongos foram aleatoriamente separados nos diferentes grupos experimentais e infectados por *S. mansoni*, conforme descrito anteriormente.

Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) e camundongos C57BL/6 CCL3^{-/-} ou C57BL/6 CCR5^{-/-}, com idade de 7 a 9 semanas, foram infectados por *S. mansoni* e acompanhados por 12-14 semanas, sendo anotados em cada grupo experimental os eventuais casos de óbito. Ao final deste período, os animais foram anestesiados via intraperitoneal com uma mistura de ketamina (88 mg/Kg - Dopalen – Sespo Indústria e comércio Ltda, Jacareí, Brasil) e Xylazina (16 mg/Kg - Kensol – Laboratórios köing S.A. – Avellaneda, -Argentina) para a coleta de sangue pelo plexo braquial e eutanasiado por deslocamento cervical para as avaliações parasitológica e imunopatológica. Especificamente, parte dos animais (6-8 camundongos/grupo experimental) foi utilizada para quantificação carga parasitária, através da contagem de vermes recuperados do sistema circulatório, de ovos do parasito retidos nos tecidos e dos ovos eliminados nas fezes (**Figura 25**), segundo metodologia descrita abaixo.

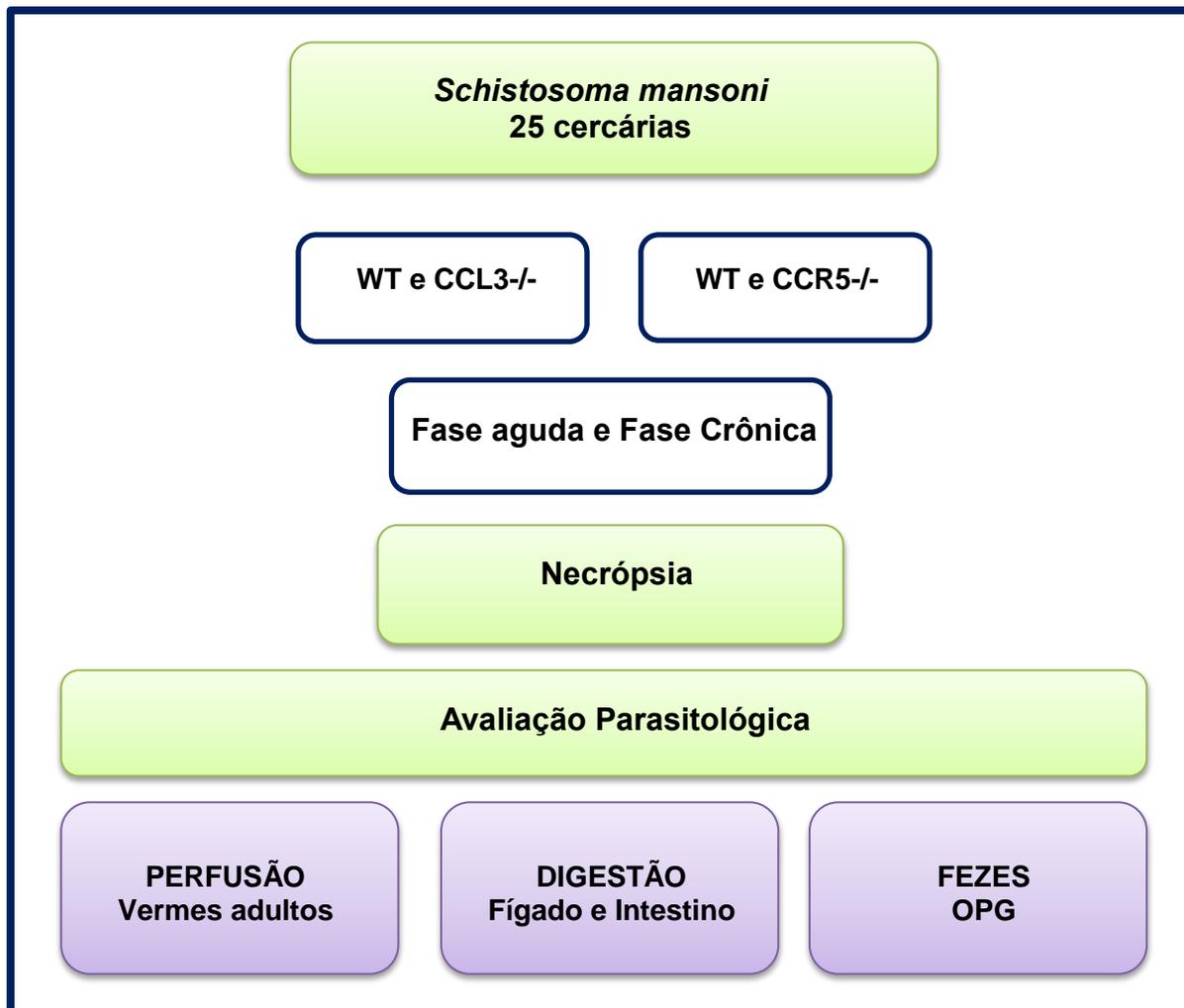


Figura 25. Delineamento Experimental I.

Outra parcela dos animais infectados (6-8 animais/grupo) foi utilizada para análise de parâmetros imunológicos, pois a perfusão e digestão de órgãos inviabilizam sua utilização para outros fins. Para confirmar a uniformidade das amostras quanto à infecção, a coleta de fezes foi realizada em todos os animais destinados à avaliação imunológica. Conforme ilustrado na **Figura 26**, o fígado de cada animal foi recolhido e separado em lobo esquerdo, que foi utilizado para quantificação da concentração de citocinas nos granulomas isolados e da atividade de

peroxidase de eosinófilo (EPO) e mieloperoxidase (MPO), lobo direito, usado para a determinação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG), e o restante do órgão armazenado para a dosagem de hidroxiprolina tecidual. Um grupo de animais foi separado para a dosagem de citocinas e quimiocinas teciduais. E para detalhar as possíveis diferenças na composição e ativação celular em granulomas hepáticos, fígados inteiros de animais infectados foram processados para separação de granulomas e recuperação de células.

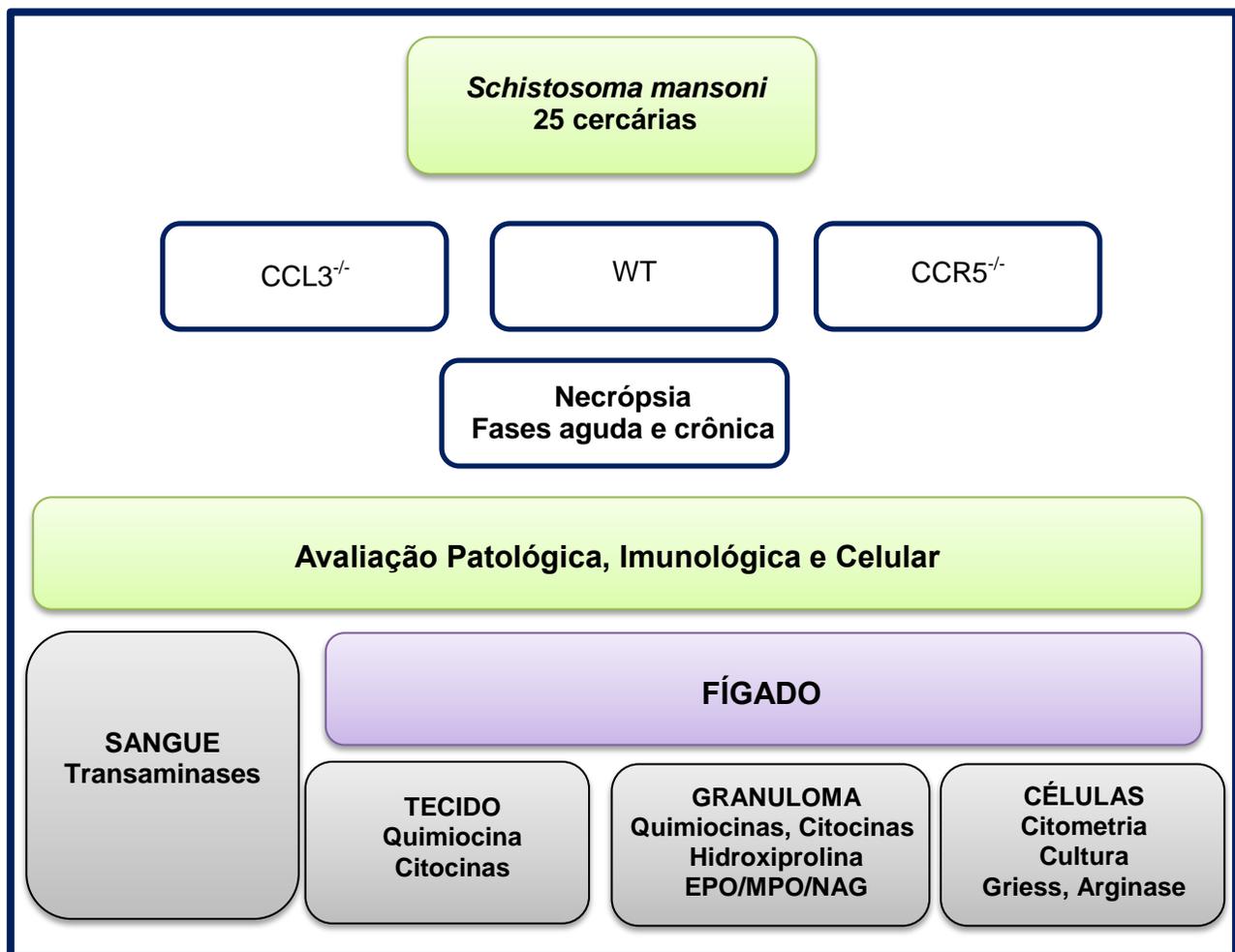


Figura 26. Delineamento Experimental II.

5.3.3. Avaliação da Infecção

5.3.3.1. Quantificação de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes

Após 12 semanas de infecção por *S. mansoni*, os animais dos diferentes grupos experimentais foram colocados em caixas individuais para a coleta de fezes. As fezes foram recolhidas, pesadas, homogeneizadas em volume conhecido de solução de formol-salina a 10%. Para a contagem, as amostras foram homogeneizadas e duas alíquotas de 100 µl da suspensão de fezes foram colocadas em lâminas de vidro e avaliadas ao microscópio óptico. Todos os ovos presentes nas alíquotas foram contados e utilizados para estimar o número de ovos eliminados por grama de fezes de cada animal infectado, dos diferentes grupos experimentais.

5.3.3.2. Recuperação e contagem de vermes do sistema porta

Camundongos infectados dos diferentes grupos experimentais foram necropsiados, após anestesia e eutanásia, e as vísceras foram expostas para a visualização do sistema porta. Após ligadura do reto, a veia porta foi seccionada na região de fusão de seus aferentes mesentéricos. Uma agulha (18Gx1/2 BD) acoplada a uma bomba de perfusão (Automatic Pippeting Brewer Machine, modelo 60453, B.D.) foi introduzida na aorta torácica. Utilizou-se solução fisiológica heparinizada (NaCl 0,85% e 0,8 U/mL de Heparina) para perfusão da circulação sanguínea do animal, sendo que o líquido contendo os vermes que extravasa pela veia porta rompida de cada animal foi recolhido em um béquer individual. A perfusão foi repetida com a agulha introduzida no seio hepático. O material recolhido de cada animal foi decantado por 30 minutos, o sobrenadante foi então descartado, e o procedimento repetido várias vezes até que o sobrenadante se apresentasse completamente límpido. Os vermes presentes em cada frasco foram

contados e diferenciados em machos, fêmeas e casais com o auxílio de uma lupa (Pellegrino & Siqueira 1956; Valadares et al. 1981).

5.3.3.3. Quantificação dos ovos retidos em tecidos do hospedeiro

Após perfusão, o fígado e o intestino dos animais infectados foram digeridos em solução de KOH 5% durante aproximadamente 4h, ou até que não mais se observasse a presença de fragmentos de tecido. Em seguida, a suspensão de tecido digerido contendo ovos do parasito, obtida de cada órgão e de cada animal, foi transferida para tubos de polipropileno de 15 ml e centrifugada a 200 g por 2 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi ressuspendido em solução salina (NaCl 0,85%) e o procedimento de lavagem repetido cinco vezes. Ao final das lavagens o material contendo ovos que estavam retidos no tecido foi ressuspendido em salina e armazenado a 4°C para contagens (Cheever et al. 1968). Para a contagem, cada amostra foi homogeneizada e duas alíquotas de 100 µl da suspensão total de tecido digerido foram colocadas em uma lâmina de vidro e observadas por completo ao microscópio óptico. Todos os ovos na alíquota foram contados, tirou-se a média das duas contagens e o número foi extrapolado para o conteúdo total do órgão.

5.3.4. Avaliação da patologia

5.3.4.1. Avaliação das alterações clínicas

Os animais foram pesados semanalmente e após a necrópsia o baço, intestino e fígado de animais não infectados e de animais infectados foram pesados. A relação peso órgão/ peso animal foi determinada e os valores obtidos comparados entre os grupos.

5.3.4.2. Determinação do teor tecidual de Hidroxiprolina

Granulomas do fígado de camundongos foram removidos para a determinação de hidroxiprolina como medida indireta da deposição de colágeno, como descrito em Reddy & Enwemeka (1996). O material foi homogeneizado em salina (0,9% NaCl) e liofilizado. O ensaio foi conduzido com o material liofilizado, que foi submetido a hidrólise alcalina em 300 µl de salina (0,2% NaCl) contendo 75 µl de solução 10 M de hidróxido e sódio, e a mistura foi autoclavada a 120°C por 20 minutos. A uma alíquota de 50 µl do material hidrolisado foram adicionados 450 µl do reagente oxidante de cloramina T (tampão acetato/citrato pH 6,5 contendo 0,056 M cloramina T e 10% de *n*-propanol) e a mistura foi incubada por 20 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção da curva padrão, onde o material hidrolisado foi substituído por concentrações conhecidas de hidroxiprolina (diluição seriada a partir de 500mg/ml). A reação colorimétrica foi iniciada pela adição do reagente de Ehrlich (*p*-dimetilaminobenzaldeído 1M diluído em *n*-propanol/ácido perclórico 2:1 v/v). As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 1500 x g a 4°C. Uma alíquota de 200 µl do sobrenadante foi transferida para placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) e foi realizada a leitura da absorvância no comprimento de onda de 550 nm em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland).

5.3.4.3. Obtenção do soro

Após a anestesia, o sangue foi retirado através do plexo braquial. O sangue recolhido permaneceu em temperatura ambiente até coagular e posteriormente foi mantido a 4 °C, por cerca de 12 h, para retração do coágulo. Após a formação e retração do coágulo, o sangue foi centrifugado (1500 x g a 4 °C por 10 minutos) o soro recolhido, aliqotado e mantido a – 20 °C.

Com o soro coletado dos animais experimentais foram realizados ensaios para avaliar a presença dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT).

5.3.4.4. Determinação de atividade das transaminases séricas

Para avaliação de lesão hepática, a concentração de aspartato aminotransferase (AST) também chamada de transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e de alanina aminotransferase (ALT), ou alanina transaminase, também conhecida como transaminase glutâmico pirúvica (TGP) foram quantificados em amostras do soro de cada animal experimental utilizando-se o teste colorimétrico da Bioclin (K034 e K035) e seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente preparou-se a curva de calibração com quantidades conhecidas da cada proteína. Para a determinação da atividade enzimática nas amostras, 50 µl do substrato específico para AST (tampão Fosfato, 0,1 mmol/L pH 7,4, ácido L aspártico, 0,153 mol/L, ácido alfa cetoglutárico 2 mmol/L e azida sódica 7,7 mmol/L) para ALT 50 µl do substrato de ALT (tampão Fosfato, 0,1 mmol/L pH 7,4, L-alanina 0,2 mol/L, ácido alfa cetoglutárico 2 mmol/L e azida sódica 7,7 mmol/L) foram adicionados a tubos diferentes de polipropileno de 2,0 ml e incubados a 37 °C por 3 minutos. Em seguida, 20 µl da amostra de soro de cada animal experimental foram acrescentados a cada substrato, a mistura foi homogeneizada e incubada a 37°C por 30 minutos. Após este período, foi adicionado 50µl do reagente de cor contendo 1,0 mM 2,4-dinitrofenilhidrazina e 1,0 M ácido clorídrico, misturado e incubado à temperatura ambiente por 20 minutos e a reação foi neutralizada com adição de 500 µl de solução 0,4N Hidróxido de sódio, sendo que a solução permaneceu em repouso por 5 minutos. A curva de calibração e as amostras (200 µl) foram transferidas para placas de 96 poços (Plate Flat Bottom –

SARSTEDT, Inc. USA) e realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda de 505 nm, em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland).

5.3.5. Avaliação da resposta imunológica

5.3.5.1. Produção de antígenos solúveis de ovos de *Schistosoma mansoni*

Para obtenção de antígenos solúveis (SEA) do parasito utilizados para estimulação celular, ovos de *S. mansoni* foram obtidos a partir do fígado dos camundongos após 45-50 dias da infecção por *S. mansoni*, rotineiramente utilizados no laboratório de Esquistossomose, conforme metodologia inicialmente descrita por Pellegrino e Katz (1968) e por Fallon & Dunne (1999) e adaptada pelo nosso grupo de pesquisa. Sucintamente, fígados de animais infectados foram coletados e homogeneizados em salina gelada e concentrada (2 % de NaCl) por 2 minutos em liquidificador na menor velocidade. A seguir, o homogenato foi passado através de uma peneira com pano filó (os debrís retidos foram eliminados) e deixado em cálice de 2L em banho de gelo ou na geladeira por 35 minutos para que os ovos se depositem no fundo. Passado esse período o sobrenadante foi aspirado, tomando o cuidado de deixar no fundo do cálice o sedimento contendo os ovos do parasito, e em seguida, reestabeleceu-se o volume acrescentando mais solução salina concentrada. Esse procedimento foi realizado varias vezes até a obtenção de um sobrenadante limpo. Após as lavagens o sedimento com ovos foi recolhido e filtrado em peneiras de análise granulométrica de modo sequencial: inicialmente o sedimento foi filtrado em peneira de malha de 106 μm -Mesh 150, que retém agregado de muco e sujeiras maiores, seguido por filtração em peneira de malha de 38 μm -Mesh 400, que retém os ovos de *Schistosoma mansoni*. Os ovos retidos foram recuperados e transferidos para tubos *Falcon* de 15 ml e o material recuperado foi centrifugado (200 x g por 5 min a 4°C). A cada centrifugação o

sobrenadante foi desprezado e os sedimentos reunidos gradativamente. Durante todo o processo, os tubos foram mantidos em banho de gelo e, ao final, após certificar-se da limpeza do material adicionou-se 1 mL de PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂ HPO₄.7H₂O 4,3mM, KH₂PO₄ 1,4mM) aos ovos recuperados transferidos para um tubo de vidro acoplado a um homogeneizador tipo Virtiz®. Os ovos foram triturados por cerca de 40 min em banho de gelo. A destruição completa dos ovos foi confirmada após um exame ao microscópio óptico. O homogenato foi então transferido para tubos de 1,5 ml, centrifugados a 3 000 x g por 1 h e o sobrenadante foi recolhido, filtrado em membrana esterilizante de 0,22 µm e as proteínas solúveis foram quantificadas através da técnica de Lowry et al. (1951), aliqüotadas e armazenadas a -20 °C.

5.3.5.2. Obtenção do homogenato do parênquima hepático e do granuloma hepático

Para estimar a concentração de citocinas e a infiltração celular no fígado, 100 mg do lobo esquerdo do fígado de cada animal foram processados em um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) na presença de 1mL de Tampão de Extração de Citocinas (0,5 % Tween 20; 0,5% BSA; 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsufonila; 0,1mM de cloreto benzetônico; 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina). O homogenato resultante foi centrifugado por 10 min a 3000 g a 4°C e o sobrenadante foi recolhido, aliqüotado e imediatamente congelado a -70°C para dosagem de citocinas.

A concentração de citocinas e infiltração celular também foram avaliadas diretamente em granuloma isolados do fígado; para tanto, o lobo esquerdo do fígado dos animais infectados foi individualmente homogeneizado em PBS estéril utilizando-se o liquidificador na menor

velocidade por 20 segundos (Ragheb & boros 1989; Blum et al. 1992), para confirmar a separação e integridade dos granulomas uma amostra do homogenato foi avaliada em microscópio óptico. Os granulomas isolados foram lavados em PBS por 3 vezes consecutivas e concentrados após centrifugação. Estes granulomas foram processados como descrito anteriormente em um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) na presença de 1mL de Tampão de Extração de Citocinas (0,5 % Tween 20; 0,5% BSA; 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsufonila; 0,1mM de cloreto benzetônico; 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina) e o homogenato foi centrifugado (3000g por 10 min a 4°C), o sobrenadante foi recolhido e armazenado a - 70°C para quantificação de citocinas.

5.3.5.3. Quantificação de Citocinas e Quimiocinas

Os níveis das quimiocinas CCL3, CCL11, CXCL1 os níveis de citocinas pró-inflamatórias: TNF- α e MIF, citocinas de perfil Th1: IFN- γ , Th17, IL-17, citocinas predominantes na resposta do tipo2: IL-4, IL-5, IL-13 e as citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β obtidas no fígado e nos de granulomas isolados de camundongos infectados dos diferentes grupos experimentais foram estimados no homogenato obtido pela maceração de amostras e quantificado pela técnica de ELISA utilizando kits comercialmente disponíveis conforme detalhado por Negrão-Corrêa et al. (2004).

5.3.5.4. Determinação da atividade de Peroxidase de Eosinófilos (EPO)

Este ensaio é conduzido como descrito por Strah et al. (1985) e detalhado em Silveira et al. (2002), como uma forma indireta de medir a eosinofilia induzida pelo parasito. Do sedimento obtido pela homogeneização das amostras de realizou-se a lise de eritrócitos pela adição de 1,5 ml de salina 0,2% seguida de 1,5 ml de salina 1,6% contendo 5% de glicose . O homogenato obtido foi dividido em 2 aliquotas de igual volume (uma alíquota para EPO e outra para o ensaio de MPO - que será descrito no próximo item). As amostras destinadas a quantificação de EPO foram centrifugadas a 3000 x g a 4°C e o sobrenadante foi desprezado e adicionado 950 µl de PBS contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB - Sigma). As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas a 3000 x g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático, que foi feito da seguinte maneira: 75 µl de cada amostra ou somente diluente (branco) foram adicionados a placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – Sarstedt, Inc. USA) juntamente com 75 µl da solução do substrato (tampão tris-HCL pH 8,0 contendo 1,5 mM o-fenilenodiamina-OPD e 6,6 mM de H₂O₂). Após o desenvolvimento de cor a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 4N. A absorbância foi lida a 492 nm em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland).

5.3.5.5. Quantificação da Mieloperoxidase (MPO)

A quantificação de mieloperoxidase foi utilizada como medida indireta da infiltração e/ou ativação de neutrófilos no granuloma. O ensaio foi conduzido conforme descrito por Bailey (1988) e detalhado por Barcelos et al. (2005). As amostras destinadas ao ensaio de MPO foram

centrifugadas (3000 x g a 4°C por 10 min) o sobrenadante desprezado e adicionados 200 µl de tampão fosfato (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA, pH 4,7). A solução foi homogeneizada e centrifugada (3000 g por 10 minutos a 4°C). Após o descarte do sobrenadante, adicionou-se tampão (0,05 M NaPO₄ pH 5,4 acrescido de 0,5 % HTAB), seguido de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Após tal procedimento, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 x g e a 4°C. Para o ensaio, 25 µL do sobrenadante diluídos no segundo tampão de extração na proporção 1:1, ou somente 25 µL do segundo tampão de extração (branco) foram acrescentados à placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) contendo 25 µL de substrato (3,3' - 5,5' - tetramethylbenzine – TMB diluído em dimetilsulfóxido – DMSO na concentração final de 1,6 mM). Após incubação à 37 °C por 5 min. foram adicionados 100 µL do segundo tampão de extração contendo 0,5mM de de H₂O₂ seguida de nova incubação à 37 °C por 5 min. A reação foi interrompida pela adição de H₂SO₄ 1M e quantificada através da absorbância em leitor de microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) a 450 nm.

5.3.5.6. Determinação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG)

A atividade da enzima N-acetilglicosaminidase reflete o número de macrófagos que migram para um dado órgão (Green et al, 1980) e é amplamente utilizada para estimar a infiltração de macrófagos em amostras de tecidos, e nesse trabalho foi utilizado também para estimar a infiltração destas células nos granulomas isolados. Este ensaio foi conduzido, como descrito por Barcelos et al (2005), sendo que nessas condições a reatividade cruzada com enzimas de neutrófilos é mínima. De forma sucinta, os granulomas isolados do lobo bilobado do

fígado processados em um homogeneizador de tecidos em 1,9 ml de tampão de extração (NaCl 0,1 M, Na₃PO₄ 0,02 M e Na₂EDTA 0,015M pH 4,7). O material foi centrifugado a 3000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi então descartado e eventuais eritrócitos foram lisados pela adição de solução hipotônica 1,5 ml de NaCl 0,2% e após 30 segundos, a osmolaridade foi restabelecida pela adição de 1,5 ml de NaCl 1,6% + glicose 5%. As amostras foram mais uma vez centrifugadas (3000 x g a 4°C por 10 min) e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspenso em 2,0 ml de solução 0,1% de Triton x-100 em NaCl 0,9% e a suspensão resultante foi centrifugada a 4° C por 10 min 3000 xg. O sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio enzimático, sendo adicionado volume de 100 µl a uma placa de 96 poços (Plate Flat Bottom – Sarstedt, Inc. USA) seguida da adição do substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-glicosamina) diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 4,5) na concentração de 0,767 g/ml e a placa foi incubada a 37° C por 10 minutos. O produto final foi gerado pela adição de 100 µl de tampão glicina (Glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M e NaOH 0,8 M pH 10,6) e a leitura foi realizada em leitor de ELISA (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) em comprimento de onda igual a 400 nm.

5.3.5.7. Obtenção de células do granuloma

Para a caracterização fenotípica das diferentes populações celulares presentes no granuloma, o fígado dos animais infectados de diferentes grupos experimentais foram processados para obtenção e recuperação das células infiltradas após padronização baseada em diferentes protocolos publicados (Boros et al. 1983; Ragheb et al. 1989; Blum et al. 1992; Fallon, 1999; Hesse et al. 2001 e 2004; Smith et al. 2007; Ramalingan et al. 2007; Thompson et al. 2008). Resumidamente, os granulomas isolados foram colocados em meio completo de RPMI

(RPMI 1640, Sigma, St. LouisMO, USA) contendo 15 mM de HEPES e 24 mM NaHCO₃, suplementado com 5% de soro fetal bovino e 60 mg/L de gentamicina, 100 U/ml penicilina e 100µ/ml Streptomicina (Smith et al. 2007). Granulomas obtidos do fígado foram digeridos meio completo RPMI contendo 1500 U/ml com colagenase tipo IV (SIGMA) por 35 minutos a 37⁰C. Após este período, a suspensão foi homogeneizada repetidas vezes através de seringas de 5 ml com movimentos de sucção e expulsão com o objetivo de desmembrar os granulomas que ainda permaneceram intactos. Em seguida, o homogenato foi filtrado em peneira poros de 40 µm com auxílio de um êmbolo de seringa e a suspensão celular obtida foi recolhida e concentrada após 3 ciclos de lavagens em RPMI 5% SFB a 300 x g por 10 minutos a 4°C. Os leucócitos foram recuperados após passagem em coluna de densidade de Percoll (Sigma) em solução de 40% e 70% e centrifugação a 900g por 30 minutos a 25°C. A suspensão celular recuperada na interface foi cuidadosamente recolhida, submetida a 3 ciclos de lavagem em RPMI contendo SFB a 10% e as células contadas em câmara de Neubauer.

5.3.5.8. Avaliação do perfil das células purificadas do granuloma hepático

As células obtidas do granuloma hepático foram utilizadas para a avaliação da expressão de antígenos de superfície e produção de citocinas intracelular por citometria de fluxo conforme detalhado na metodologia previamente descrita por Smith et al. (2007) e Ramalingan et al. (2007). As células isoladas do granuloma hepático foram cultivadas (1x10⁵ células/poço) na presença de 1mg/ml de Brefeldina A e 10 µg/ml SEA por 4 horas. Após este período, as células foram incubadas com anticorpos conjugados à fluorocromos específicos para determinantes antigênicos expressos na membrana plasmática de linfócitos, eosinófilos e macrófagos: F4/80 PercP (eBioscience), CD3 APC-CY7, CD4 PE , CD25 PercP, CCR3 Alexa 647, CD11b Pacif

Blue, (BD Pharmigen). A produção de citocinas IL-4 e IL-10 (anti-IL-10 FITC e anti-IL-4 PE e anti-Foxp3 PE- BD Pharmigen) por diferentes tipos celulares também foi avaliada após permeabilização celular (PBS 1x, 0.5% de BSA, 2mM de Azida, 0.5% Saponina) por 10 min em temperatura ambiente. Todos os anticorpos utilizados foram previamente titulados antes da sua utilização e empregados em concentrações específicas. No primeiro mix utilizou-se os marcadores anti-CD3 APC-Cy7, anti-CD4 PE Cy7, anti- CD193 Alexa647, anti-F4/80 PerCP, anti-CD11b Pacific Blue, anti-IL-10 FITC e anti-IL-4 PE. No segundo mix objetivou-se avaliar a porcentagem de linfócitos CD4⁺ ativados, bem como a porcentagem de linfócitos T regulatórios presentes, utilizando-se para isto os marcadores anti-CD4-PE Cy7, anti-FoxP3-PE e anti-CD25-PerCP, anti-IL-10 FITC. Após a marcação, as células foram lavadas e fixadas com solução 1:1 formaldeído 4% e PBS 1X e analisadas, após leitura em citômetro de fluxo BD FACSCanto II (Becton Dickinson, CA) usando o software CellQuest Flow Jo (V.7.6.3).

5.3.5.9. Separação de células CD11b⁺ do granuloma hepático e verificação do perfil de ativação

Em camundongos, CD11b é fortemente expresso em macrófagos/monócitos e em menor intensidade em granulócitos, células NK e DCs (Lagasse et al. 1996). Células CD11b⁺ foram isoladas da suspensão celular obtida do granuloma hepático de um *pool* de dois camundongos infectados através de separação magnética usando anticorpo monoclonal anti-CD11b (Smith et al. 2004), empregando kit comercialmente disponível e seguindo as instruções do fabricante Miltenyl Biotec. Primeiramente, as células CD11b⁺ foram magneticamente marcadas com Microbeads anti-CD11b. Em seguida, a suspensão celular foi passada através da coluna MACS[®], que é colocada no campo magnético de um separador MACS. As células magneticamente

marcadas foram retidas na coluna, enquanto as demais passaram pela coluna e foram separadas. Em seguida, a coluna contendo as células foi retirada do campo magnético e as células CD11b⁺ foram recuperadas como a fração de células positivamente selecionadas. As células isoladas por colunas magnéticas foram quantificados e distribuídos em placas de 96 poços para cultura de células Costar (Corning, NY) na concentração de 5×10^5 células por poço. As células foram cultivadas em duplicatas de 200 μ L em meio RPMI contendo 10% de SFB e 10 μ g/mL de antígeno do parasito (SEA). As placas foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO₂ por 48 h. Após este período, o sobrenadante foi recolhido e utilizado para a quantificação de citocinas (IL-4, IL-10, MIF, TGF- β) e das quimiocinas (CCL3, CCL11 e CXCL1), enquanto que as células foram utilizadas para a quantificação de atividade enzimática de ARG1.

O sobrenadante de cultura de células CD11b⁺ dos granulomas hepáticos dos diferentes grupos experimentais também foi utilizado para estimar a produção de óxido nítrico, produto típico da estimulação de macrófago durante uma resposta imune do tipo 1 (Pesce et al. 2009) através da dosagem de nitrito empregando-se o reagente de Griess. De forma simplificada, o sobrenadante incubado na proporção de 1:1 com o reagente de Greiss (sulfanilamida 0.1 % naphthylethylene diamine dihydrochloride 2 % H₃PO₄) foi deixado em repouso em temperatura ambiente por 10 minutos. A absorbância medida no comprimento de onda de 550 nm foi realizada usando leitor de microplacas Spectra Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A concentração do nitrito foi determinada empregando curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂).

5.3.5.10. Atividade de Arginase

A atividade de ARG1 está relacionada à síntese de colágeno e proliferação celular (Barron & Wynn 2011). As células CD11b⁺ isoladas foram utilizados para a quantificação da atividade da enzima ARG1 (Arginase) conforme descrito anteriormente (Corraliza et al. 1994; Thompson et al. 2007). As células CD11b⁺ isolados de granulomas hepáticos de camundongos de diferentes grupos experimentais foram plaqueadas e estimuladas, como descrito acima. Após a retirada do sobrenadante de cultura, as células aderidas foram lizadas com tampão fosfato contendo 0,1% de Triton X-100 por 30 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação foram adicionados adicionadas 100µl de MnCl₂ (10mM) e 100µl de Tris-HCl (50mM e pH 7,5) em cada poço e a placa foi aquecida a 55°C por 10 minutos. A uma alíquota de 25µl do lizado obtido na etapa anterior foram adicionados 25µl de solução 0,5 M L-Arginina e a mistura foi incubada por 1 h a 37 °C. A reação foi interrompida após adição de 200µl da mistura ácida contendo H₂SO₄, H₃PO₄, e H₂O (1:3:7). Em seguida acrescentou-se 15µl de α-isonitrosopropiophenonea (IPSF) 9% seguido de aquecimento a 100°C por 45 minutos e incubação no escuro por 10 minutos. Amostra de 100µl da suspensão final obtida de cada tratamento foi transferida para microplaca de 96 poços e a formação de ureia foi colorimetricamente estimada através da leitura de absorbância medida no comprimento de onda de 540 nm usando leitor de microplacas Spectra Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A concentração de uréia nas amostras foi obtida através da comparação da absorbância da curva padrão construída com amostras de concentração conhecida de uréia (diluição seriada a partir de 1mg/ml) diluídas nas mesmas condições do ensaio.

5.3.5.11. Análise Estatística

Foi realizada análise de dispersão de dados para verificar a adequabilidade do uso de um teste paramétrico. Os dados foram analisados no programa Prisma 5.0 por meio do teste T de Student ou da análise de variância (ANOVA one way) seguida pelo teste de Newman-Keuls, que realiza a comparação entre todos os grupos entre si. Os dados quando considerados não paramétricos foram analisados pelo teste de Mann-Whitney ou pelo teste de Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (EPM). O intervalo de confiança foi fixado em 95% e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Avaliação de parâmetros parasitológicos em camundongos WT, CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

Após a 8ª semana da infecção com 25 cercárias de *S. mansoni* por camundongo, foram recuperados em média $7,4 \pm 1,2$ e $6,8 \pm 1,5$ vermes da circulação de camundongos CCL3^{-/-} e WT, respectivamente, valor considerado estatisticamente semelhante na comparação entre os grupos experimentais. Após 12 semanas de infecção também não foi detectada diferença significativa no número de vermes recuperados da circulação sanguínea dos grupos experimentais, sendo recuperados $8,6 \pm 0,96$ vermes em camundongos CCL3^{-/-} e $10,1 \pm 0,6$ em camundongos não selvagens (**Figura 27A**). Também não foram observadas diferenças significativas quanto à eliminação de ovos pelas fezes entre os grupos experimentais, em ambas as fases da infecção (**figura 27B**). Quanto aos ovos retidos nos tecidos, foi verificado um acúmulo significativo de ovos no intestino e no fígado dos animais avaliados na fase crônica em relação à fase aguda. Contudo, a retenção de ovos do parasito nos diferentes tecidos do hospedeiro foi semelhante entre os grupos CCL3^{-/-} e WT, tanto na fase aguda como na fase crônica (**figura 27C e 27 D**).

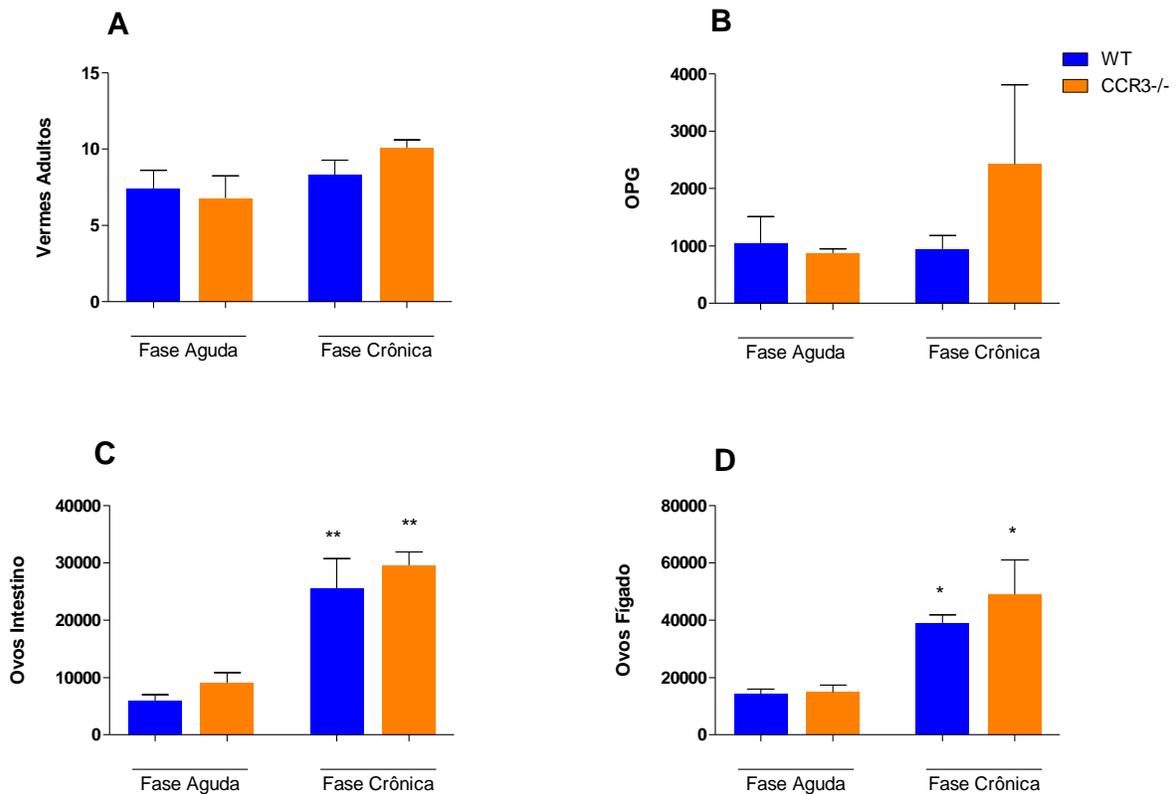


Figura 27. Avaliação da carga parasitária no decorrer da infecção por *S. mansoni* em camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}) e não deficientes (WT). (A) O número total de vermes recuperado após perfusão sanguínea; (B) Numero de ovos do parasito eliminados por grama de fezes (OPG); (C) numero de ovos recuperados do intestino (delgado e grosso) após digestão do órgão em solução de KOH 5% e (D) ovos retidos no fígado quantificados após digestão completa com KOH 5%. As contagens foram realizadas após 8 (fase aguda) e 12 (fase crônica) semanas de infecção experimental com 25 cercarias de *S. mansoni*/camundongo. Os valores representam a média ± EPM de vermes recuperados de camundongos infectados WT (n=10) e CCL3^{-/-} (n=12). * representa valor de p<0,05 na comparação entre a fase aguda e crônica com animais do mesmo grupo.

A carga parasitária também foi comparativamente avaliada em camundongos C57BL/6 geneticamente deficientes na expressão do receptor CCR5 (CCR5^{-/-}) e seus controles não deficientes WT, tanto na fase aguda como na fase crônica (**Figura 28**). Não houve diferenças na recuperação de vermes da circulação de camundongos WT ($5,2 \pm 0,4$ vermes) e camundongos CCR5^{-/-} ($5,6 \pm 0,7$) após 8 semanas da infecção e também na 12^a semana da infecção por *S. mansoni* nos animais WT ($9,3 \pm 0,7$ vermes) e camundongos CCR5^{-/-} ($8,6 \pm 0,8$) (**Figura 28A**). Nas fezes, foram quantificados em média 525 ± 356 ovos/g de fezes nos camundongos WT e 1290 ± 761 ovos/g de fezes em camundongos CCR5^{-/-}, durante a fase aguda e na fase crônica obteve-se em média 463 ± 92 ovos/g de fezes nos camundongos WT e 419 ± 34 ovos/g de fezes em camundongos CCR5^{-/-}, sem diferenças estatísticas entre os grupos (**Figura 28B**). Também não foram detectadas diferenças estatísticas entre os animais WT e CCR5^{-/-} quanto ao número de ovos retidos no intestino e no fígado dos animais em ambas as fases da infecção avaliadas. Entretanto, mais uma vez foi verificado aumento estatístico na recuperação de ovos retidos nos tecidos nos dois grupos (WT e CCR5^{-/-}) durante a fase crônica em comparação com o número de ovos recuperados na fase aguda da infecção experimental (**Figura 28C e 29D**).

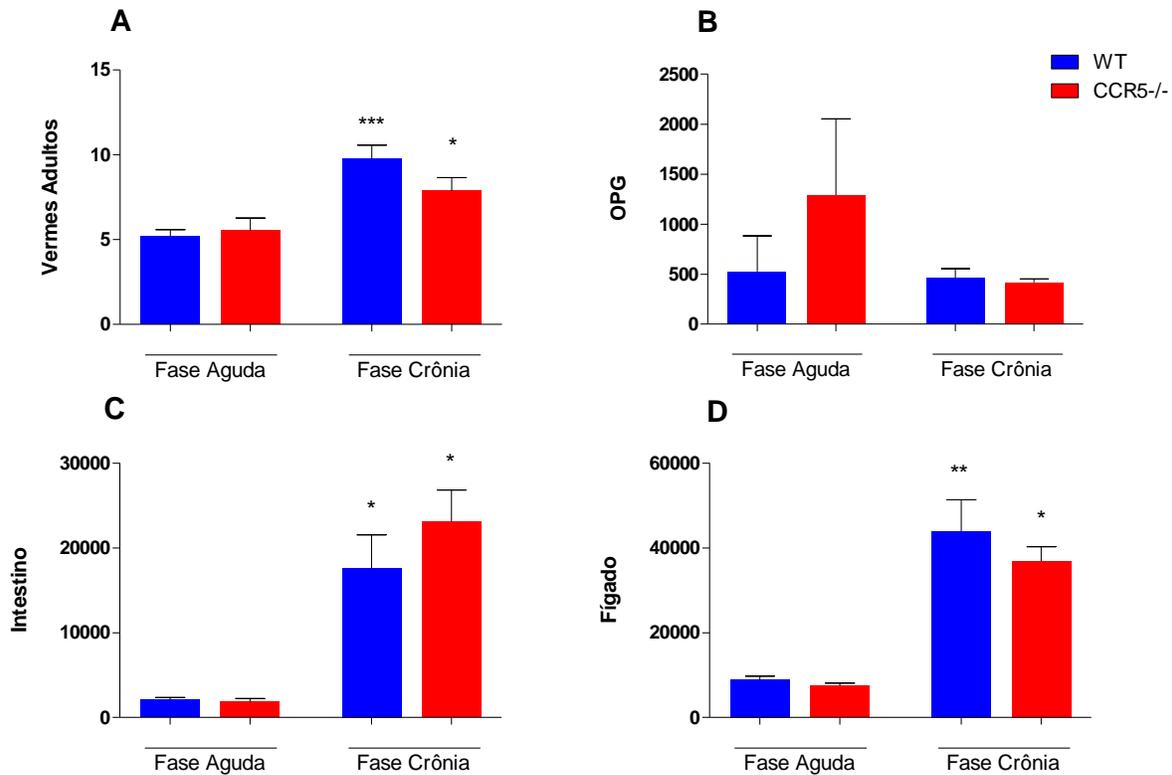


Figura 28. Avaliação da carga parasitária no decorrer da infecção por *S. mansoni* em camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT). (A) Número total de vermes recuperado após perfusão sanguínea; (B) Número de ovos do parasito eliminados por grama de fezes (OPG); (C) Número de ovos recuperados do intestino (delgado e grosso) após digestão do órgão em solução de KOH 5% e (D) Ovos retidos no fígado quantificados após digestão completa com KOH 5%. As contagens foram realizadas após 8 (fase aguda) e 12 semanas (fase crônica) de infecção experimental com 25 cercarias de *S. mansoni*/camundongo. Os valores representam a média ± EPM de vermes recuperados de camundongos infectados e WT (n=11) e CCR5^{-/-} (n=10). *, ** e *** representam p<0,05, p<0,01 e p<0,001, respectivamente, na comparação entre a fase aguda e crônica com animais do mesmo grupo experimental.

5.4.2. Efeito da ausência de CCL3 e CCR5 na patologia induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni*

Para analisar possíveis alterações clínicas induzidas pela infecção por *S. mansoni* em camundongos dos diferentes grupos experimentais, o peso do baço, fígado e intestino de cada animal foi medido e expresso em relação ao peso corporal do animal. Os dados apresentados na **Figura 29** mostram que camundongos cronicamente infectados apresentam aumento do volume do baço, fígado e do intestino em relação ao volume destes órgãos em animais não infectados, representado pela linha tracejada (os valores obtidos entre os diferentes grupos experimentais não infectados não foi diferente do ponto de vista estatístico). Comparando o volume dos órgãos recuperados dos animais cronicamente infectados, observou-se que o aumento de volume do fígado e do intestino em camundongos WT e CCL3^{-/-} foi estatisticamente semelhante, enquanto que o volume do baço de camundongos CCL3^{-/-} cronicamente infectado foi estatisticamente menor que nos animais não deficientes. Em contrapartida, os animais deficientes na produção do receptor CCR5 (CCR5^{-/-}) cronicamente infectados apresentaram aumento perceptível do baço, porém sem diferença estatística, mas o volume do intestino e do fígado foi estatisticamente superior em relação aos animais não deficientes (WT) e também em relação aos animais CCL3^{-/-}.

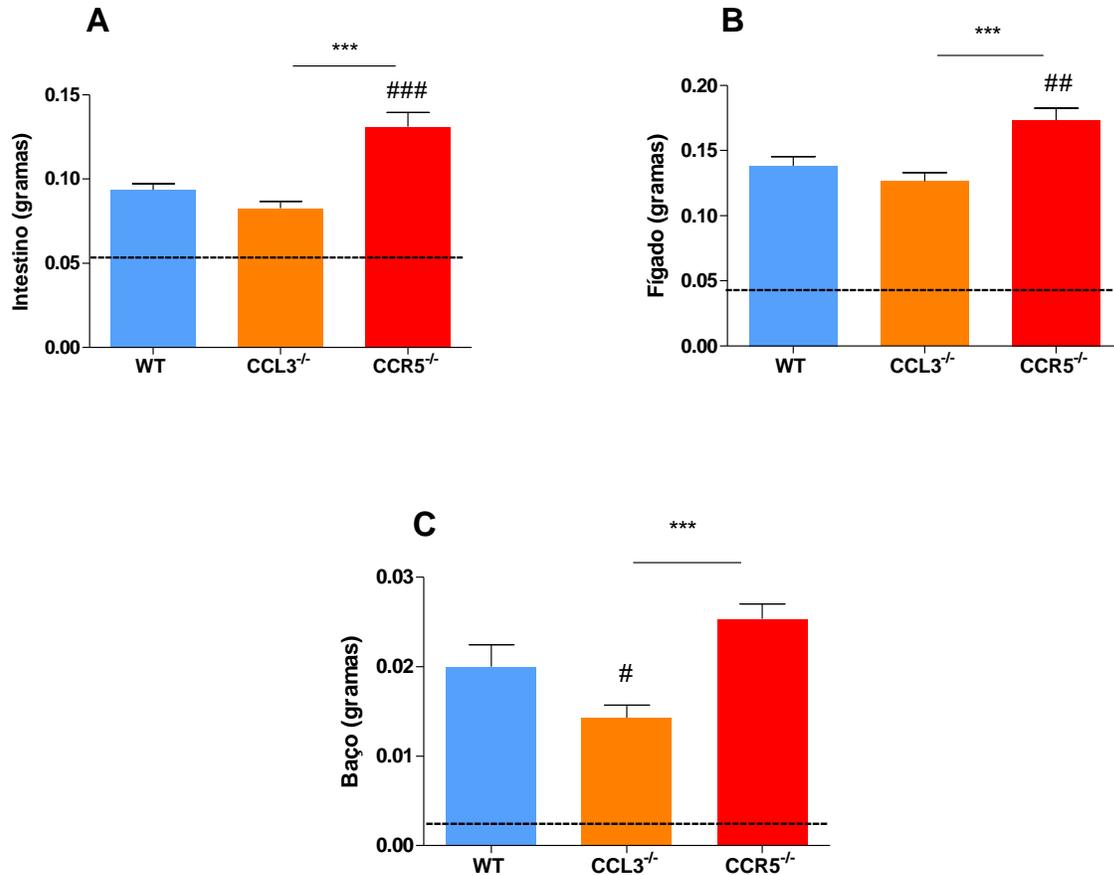


Figura 29. Volume do intestino (A), fígado (B) e baço (C) de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) cronicamente infectados por *S. mansoni*. Os animais foram infectados com 25 cercárias de *S. mansoni* e necropsiados após 12 semanas da infecção. O intestino (A), fígado (B) e baço (C) foram retirados e pesados e foi estabelecida uma relação entre o peso do órgão e o peso corporal de cada animal experimental. Os valores representam a média ± EPM das proporções obtidas nos três grupos experimentais. #, ## e ### representam p<0,05, p<0,01 e p<0,001 na comparação de animais CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} versus WT. *** representa p<0,001 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}. A linha tracejada representa a proporção obtida nos animais não infectados.

A fibrose hepática é a causa primária da morbidade crônica causada pela esquistossomose (Cheever et al. 2000). Para determinar se CCL3 e CCR5 influenciam na fibrogênese, foi determinado o conteúdo de hidroxiprolina em granulomas isolados dos animais infectados como medida da deposição tecidual de colágeno durante a fase crônica. A **Figura 30** mostra que concentração de hidroxiprolina em granulomas de camundongos CCL3^{-/-} cronicamente

infectados foram semelhantes à concentração hidroxiprolina medida em granulomas isolados de animais não deficientes no mesmo período. Entretanto, o teor de hidroxiprolina no granuloma dos animais $CCR5^{-/-}$ foi significativamente maior em relação aos animais WT e $CCL3^{-/-}$.

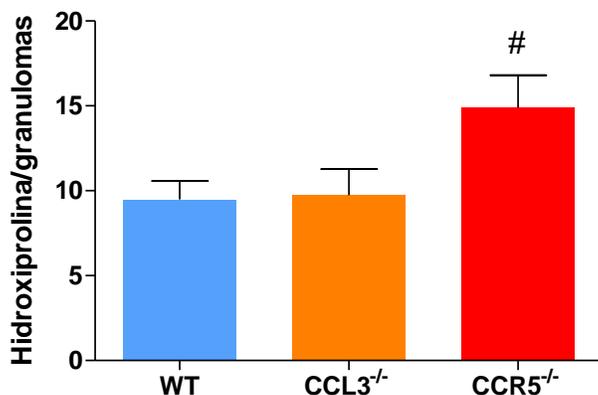


Figura 30. Quantificação de hidroxiprolina nos granulomas isolados camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 ($CCL3^{-/-}$), deficientes na produção de CCR5($CCR5^{-/-}$) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da quantidade de hidroxiprolina estimada em granuloma isolado de camundongos WT, $CCL3^{-/-}$ e $CCR5^{-/-}$ infectados com 25 cercárias/camundongo após a 12ª semana de infecção por *S. mansoni*.

A dosagem do nível de transaminases séricas teve como objetivo a avaliação comparativa do grau de lesão hepática nos diferentes grupos experimentais. A quantificação da atividade de Aspartato Aminotransferase (AST) e da Alanina Aminotransferase (ALT) no soro dos camundongos infectados e seus controles não infectados mostra discreto aumento durante a fase aguda da esquistossomose e este nível foi semelhante entre os grupos WT, $CCL3^{-/-}$ e $CCR5^{-/-}$ (dados não mostrados). Na fase crônica da esquistossomose foi demonstrado o aumento de atividade de AST e de também de ALT nos animais infectados em relação aos animais não

infectados (linha tracejada do gráfico). No caso da atividade de AST, o aumento induzido pela infecção por *S. mansoni* foi estatisticamente semelhante nos camundongos dos diferentes grupos experimentais (**Figura 31A**), enquanto que o aumento sérico da atividade de ALT nos animais $CCR5^{-/-}$ foi maior que em animais WT e em $CCL3^{-/-}$ (**Figura 31B**). Os dados claramente demonstram que a morbidade da esquistossomose crônica foi mais intensa nos camundongos deficientes no receptor de CCR5.

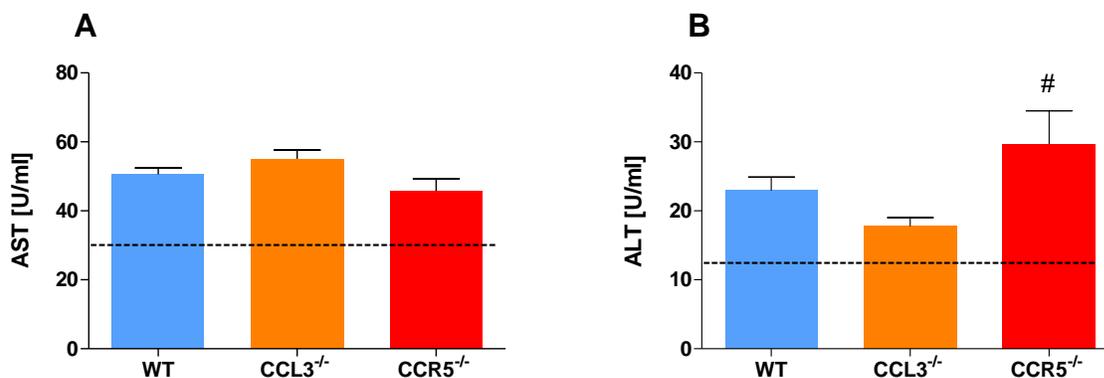


Figura 31. Atividade sérica de Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT) em camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 ($CCL3^{-/-}$), deficientes na produção de CCR5($CCR5^{-/-}$) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*. A linha pontilhada representa o nível obtido nos animais não infectados. Os valores representam média \pm EPM da atividade enzimática sérica em camundongos WT, $CCL3^{-/-}$ e $CCR5^{-/-}$ não infectados, após 12 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. # representa o nível de significância com valor de $p < 0,05$ na comparação entre os níveis das citocinas obtidos entre os grupos $CCR5^{-/-}$ versus WT.

5.4.3. Perfil de resposta imunológica

5.4.3.1. Produção de quimiocinas no tecido e nos granulomas isolados de camundongos WT, CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

Após a confirmação dos parâmetros parasitológicos e dos aspectos de morbidade da esquistossomose, a investigação sobre as diferenças na resposta imunológica foi centralizada no fígado, já que nos estudos preliminares este órgão se mostrou diferentemente afetado entre os grupos experimentais utilizados. A produção local de quimiocinas é fator determinante no processo de inflamação tecidual, afetando o recrutamento e o posicionamento celular durante a formação do granuloma e, por isso, os níveis de algumas quimiocinas foram determinados com o objetivo de verificar influência da produção destes ligantes na composição celular dos granulomas na ausência de CCL3 e de CCR5 em comparação com os animais selvagens WT.

A quantificação da concentração das quimiocinas foi medida em granulomas isolados de camundongos dos diferentes grupos experimentais na fase aguda e crônica da esquistossomose experimental. A concentração de CXCL1 foi semelhante em granulomas isolados dos 3 diferentes grupos experimentais durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni* (**Figura 32A**). Na fase crônica a concentração de CXCL1 foi estatisticamente menor nos granulomas isolados de animais CCL3^{-/-} e maior nos granulomas de CCR5^{-/-} em comparação com os animais não deficientes, WT. Além disto, a concentração de CXCL1 quantificado no granuloma de CCR5^{-/-} foi também significativamente maior quando comparado com os níveis dos animais CCL3^{-/-} (**Figura 32B**).

Conforme esperado, não houve produção de CCL3 no fígado ou granuloma isolados dos camundongos CCL3^{-/-} durante a infecção por *S. mansoni* (**Figura 32 e 33**). Também foi verificado que a concentração de CCL3 nos granulomas de camundongos CCR5^{-/-} durante a fase aguda da infecção foi maior em relação aos granulomas de animais WT, mas sem diferença

estatística (**Figura 32C**). Entretanto, nos granulomas isolados de camundongos cronicamente infectados foi verificado uma redução significativa dos níveis de CCL3 nos granulomas isolados de fígado CCR5^{-/-} em relação aos animais WT (**Figura 32D**).

A concentração de CCL11 em granulomas isolados na fase aguda da infecção foi significativamente aumentada nos animais CCL3^{-/-} em comparação com os animais WT e também em comparação com os animais CCR5^{-/-} (**Figura 32E**). Já nos granulomas de camundongos durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni* observou-se uma redução da concentração de CCL11 (**Figura 32E**), e essa redução foi estatisticamente inferior em CCL3^{-/-} comparado com os níveis obtidos nos granulomas de animais WT.

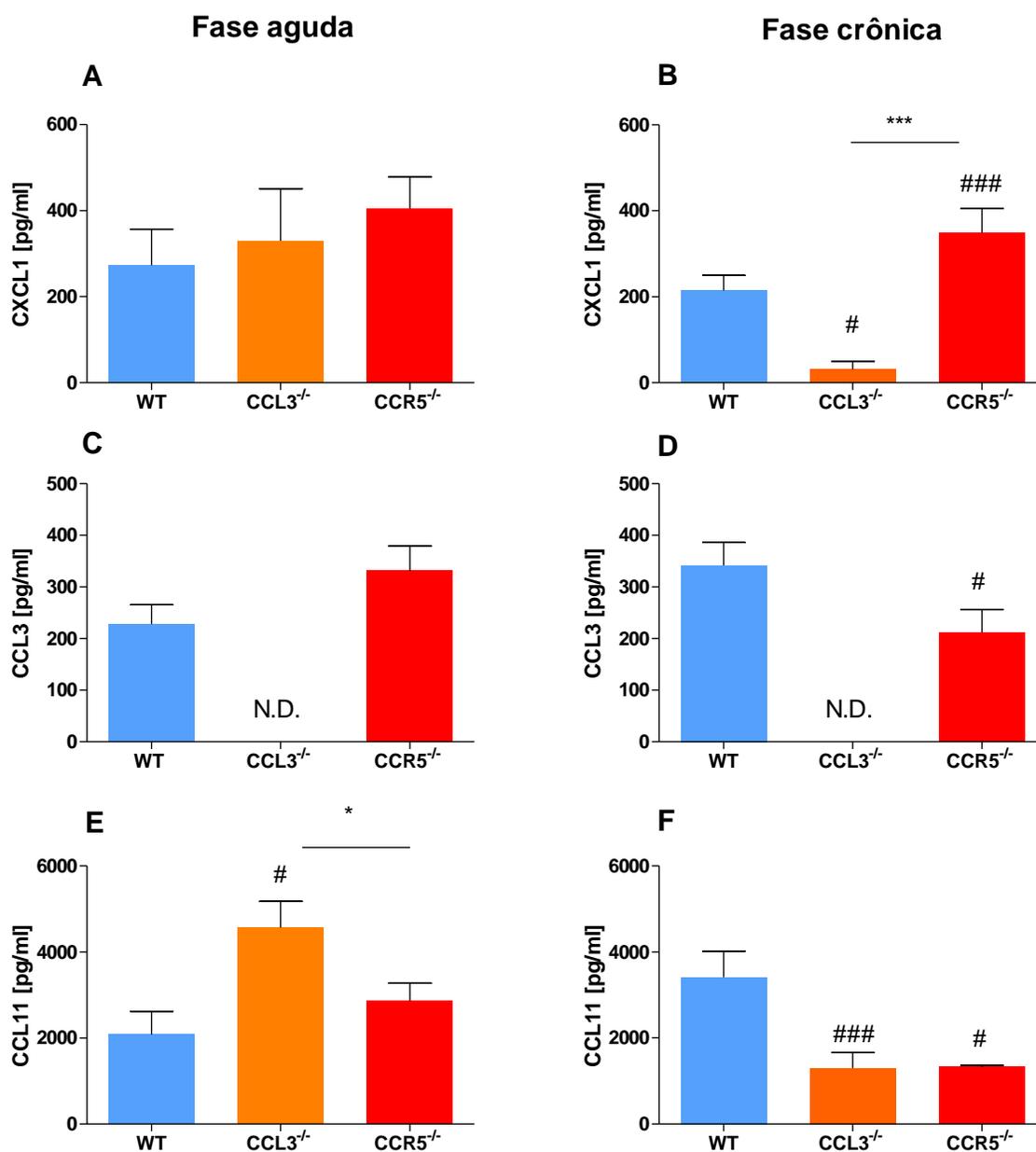


Figura 32. Concentração das quimiocinas CXCL1, CCL3 e CCL11 em granulomas isolados camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) no decorrer da infecção por *S. mansoni*. (A) Concentração de CXCL1 em granulomas isolados na fase aguda da esquistossomose e em (B) na fase crônica; (C) Concentração de CCL3 em granulomas isolados na fase aguda da esquistossomose e em (D) na fase crônica; (E) Concentração de CCL11 em granulomas isolados na fase aguda da esquistossomose e em (F) na fase crônica. Os granulomas foram isolados de animais após 8 (fase aguda) e 12 (fase crônica) semanas de infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. # e ### representam respectivamente p < 0,05 e p < 0,001 na comparação de animais CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} versus WT. * representa p < 0,05 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

Na tentativa de verificar a participação de células teciduais na produção de quimicinas também foi quantificado a concentração de quimiocinas no homogenato hepático dos animais cronicamente infectados por *S. mansoni*. O homogenato hepático de camundongos CCL3^{-/-} infectados apresentaram concentrações significativamente menores das citocinas CXCL1, que atua como no recrutamento de neutrófilos, e de CCL11/eotaxina, que é um importante quimioatraente para eosinófilos, em relação aos camundongos selvagens e aos camundongos WT (Figura 35A e 35C). Por outro lado, no homogenato de fígado de camundongos CCR5^{-/-} a concentração de CCL3 e de CXCL1 foi estatisticamente maior que em WT (**Figura 33A e Figura 33B**). Ao contrário, camundongos CCR5^{-/-} infectados apresentaram níveis de CCL11 semelhantes ao quantificado nos camundongos WT (**Figura 33C**).

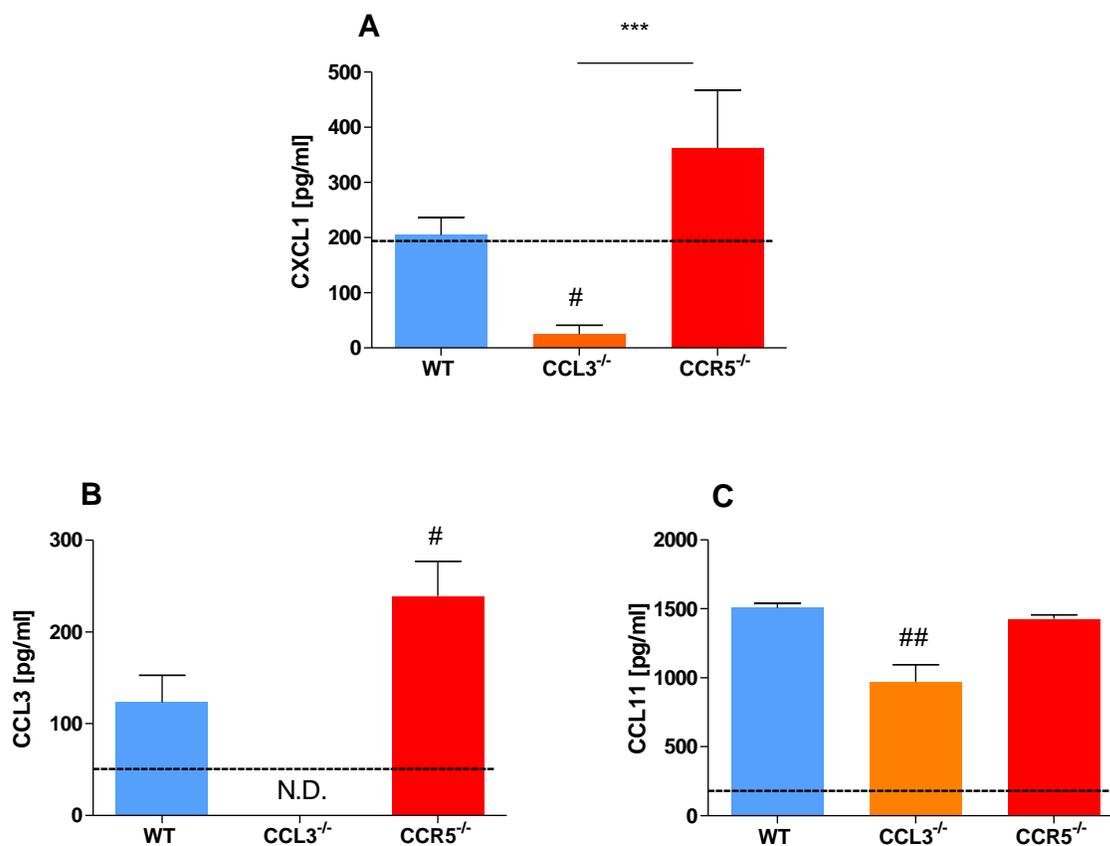


Figura 33. Concentração de quimiocinas no fígado de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Concentração tecidual de (A) CXCL1, (B) CCL3 e (C) CCL11. A linha tracejada representa o nível de citocinas nos animais não infectados. # e ## representam respectivamente p<0,05 e p<0,01 na comparação de animais CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} versus WT. * representa p<0,001 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.**

5.4.3.2. Perfil de citocinas no tecido hepático e granulomas isolados de camundongos WT, CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

Para caracterizar o perfil de ativação das células que compõem o granuloma hepático de camundongos infectados por *S. mansoni* na ausência de CCL3 e CCR5, os granulomas hepáticos dos animais infectados foram isolados, processados e do homogenato obtido foram quantificadas citocinas pró-inflamatórias, de perfis inflamatório Th1, Th2, Th17 e citocinas regulatórias após 8 e 12 semanas de infecção por *S. mansoni*. Durante a fase aguda da infecção, a concentração de TNF- α , MIF, IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-13, IL10 e TGF- β não foram significativamente diferentes entre os grupos experimentais, conforme esquematizado na **Figura 34**.

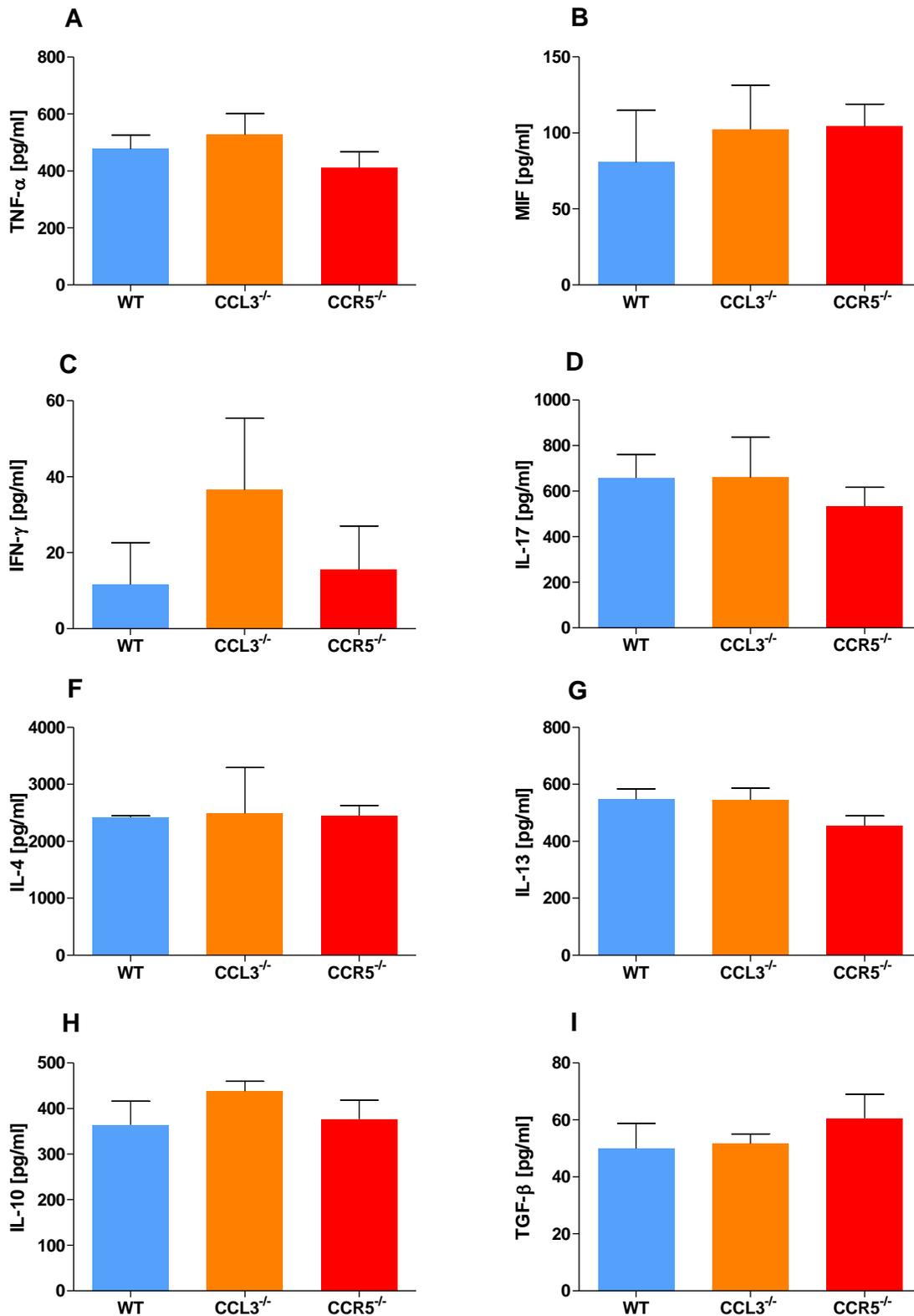


Figura 34. Concentração de citocinas no granuloma de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*. Níveis de IL-17 (A), TNF-α (B), IFN-γ (C), IL-10 (D), IL-4 (E) e IL-13 (F) no homogenato de granuloma hepático isolado de camundongos WT, CCL3^{-/-} e de CCR5^{-/-} após 8 semanas da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da concentração das citocinas estimadas pela técnica de ELISA.

A produção de citocinas pró-inflamatórias nos granulomas hepáticos isolados de camundongos WT, CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni* está representada na **Figura 35**. Foram quantificados níveis significativamente inferiores da citocina pró-inflamatória TNF- α e de IL-17 nos granulomas obtidos de animais CCL3^{-/-} em comparação aos animais WT. Em contrapartida, a concentração destas citocinas no granuloma dos animais deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) foram superiores em comparação com os animais selvagens e em relação aos animais CCL3^{-/-} (**Figura 35A e D**). O perfil de produção de MIF em granulomas hepáticos isolados durante a fase crônica da infecção está representado na (**Figura 35B**). Os camundongos CCL3^{-/-} apresentaram uma relativa diminuição da produção de MIF em relação aos animais WT, porém sem significância estatística. Já os camundongos CCR5^{-/-} apresentaram uma produção significativamente aumentada em relação aos animais selvagens e também em relação aos animais CCL3^{-/-}. Não houve diferença entre os níveis de IFN- γ , citocina típica da resposta imune do tipo-1, entre os grupos experimentalmente infectados (**Figura 35C**).

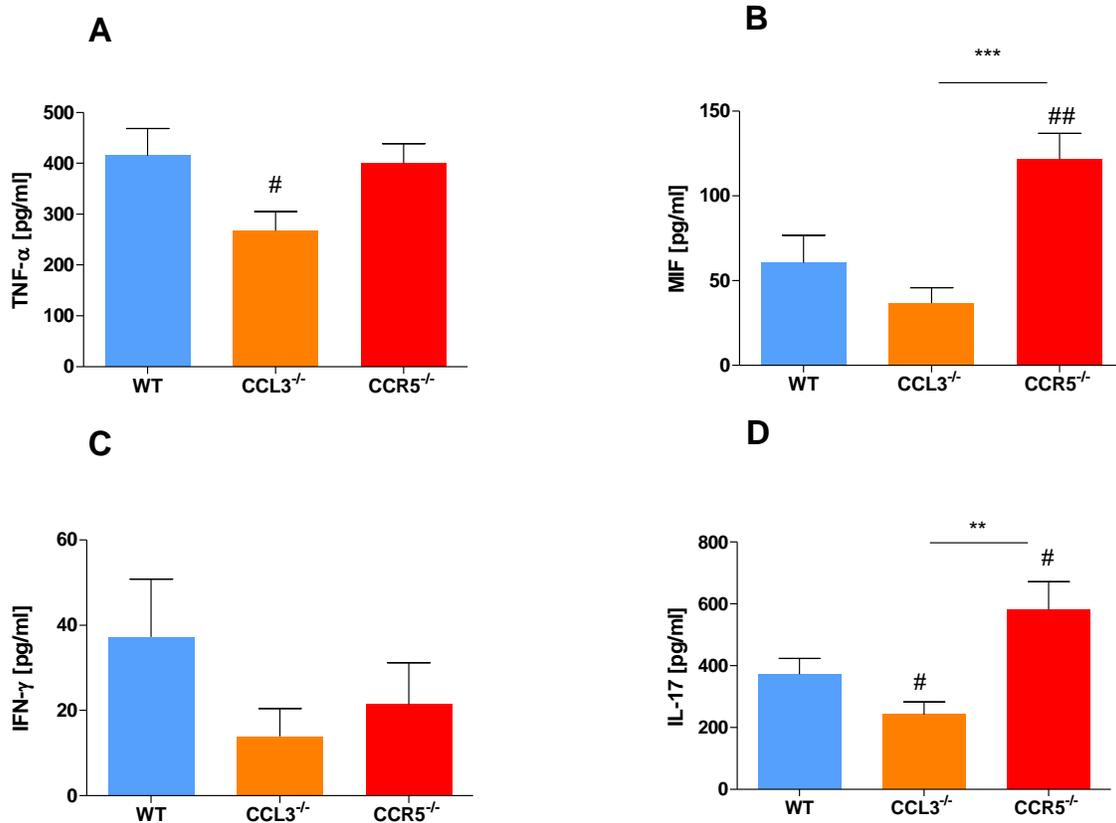


Figura 35. Concentração de citocinas no granuloma de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Níveis de TNF-α (A), MIF (B), IFN-γ (C), IL-17 no homogenato de granuloma hepático de camundongos infectados com 25 cercarias/animal e necropsiados após 12 semanas da infecção *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da concentração das citocinas estimadas pela técnica de ELISA # e ## representam respectivamente p<0,05 e p<0,01 na comparação de CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} versus WT. ** e *** representam respectivamente p<0,01 e p<0,001 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} versus CCR5^{-/-}.

A concentração de citocinas do perfil Th-2 (IL-4, IL-5 e IL-13) nos granulomas isolados de camundongos cronicamente infectados por *S. mansoni* nos três grupos experimentalmente infectados está ilustrada na **Figura 36**. Com relação à produção de IL-4 e IL-5 não foram observadas diferenças estatísticas na concentração destas citocinas no homogenato de granulomas hepáticos de camundongos do grupo WT e CCL3^{-/-}, apesar de uma relativa diminuição dos níveis produzidos neste último grupo. Entretanto, a concentração de IL-13 no homogenato de granuloma de camundongos CCL3^{-/-} foi estatisticamente menor que no granuloma de camundongos WT. Em granulomas isolados de camundongos CCR5^{-/-} cronicamente infectados foi verificado que a concentração de IL-5 foi semelhante entre os animais CCR5^{-/-} e WT (**Figura 36B**). Porém os níveis de IL-4 e IL-13 foram estatisticamente elevados nos granulomas dos animais deficientes na produção de CCR5 em comparação com os animais não deficientes. Conseqüentemente, quando comparamos a produção entre os grupos experimentais CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} observamos uma maior produção de IL-4 e IL-13 nos granulomas hepáticos de animais CCR5^{-/-} em comparação com os níveis quantificados nos granulomas isolados do fígado de animais CCL3^{-/-} (**Figura 36A e 36C**).

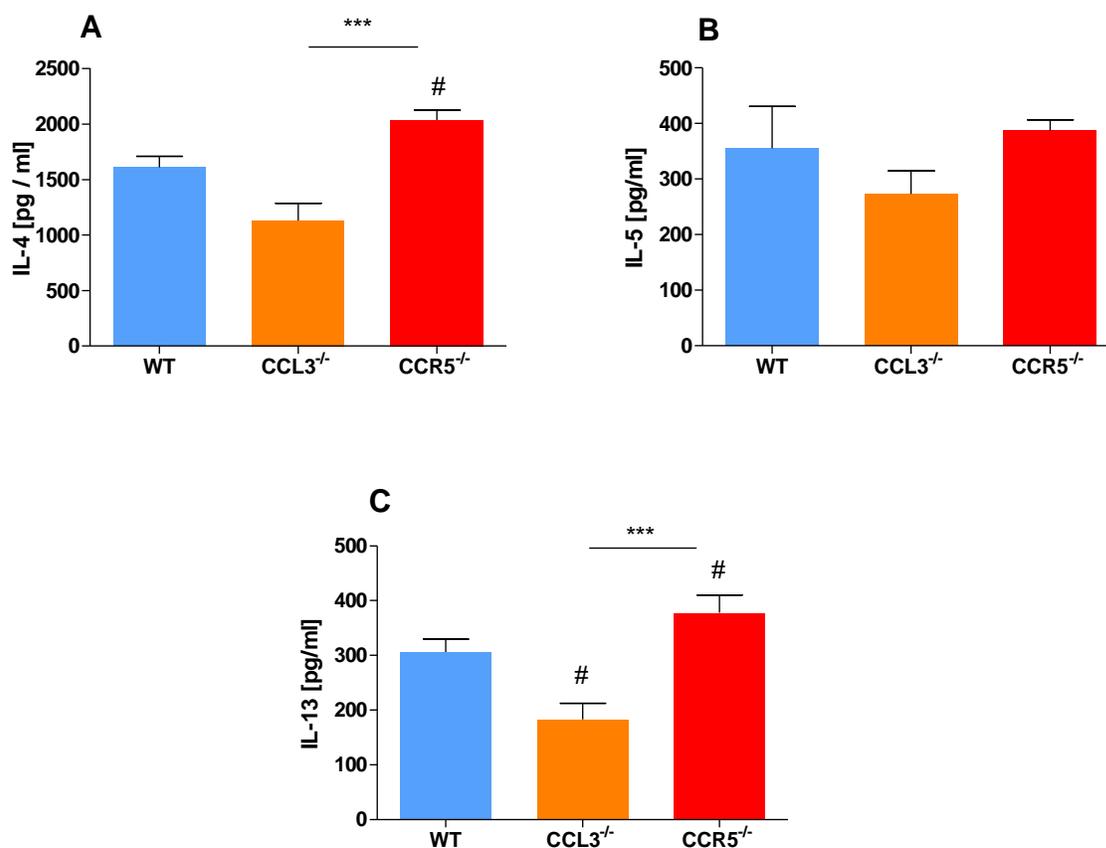


Figura 36. Concentração de citocinas no granuloma de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Níveis de IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C) no homogenato de granuloma hepático de camundongos infectados com 25 cercarias/animal e necropsiados após 12 semanas da infecção *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da concentração das citocinas estimadas pela técnica de ELISA # representa p<0,05 na comparação de camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} versus WT. *** representa p<0,001 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} versus CCR5^{-/-}.

Conforme demonstrado na **Figura 37B**, na fase crônica da infecção por *S. mansoni* a concentração de TGF-β nos granulomas hepáticos de animais CCR5^{-/-} foi estatisticamente maior que nos granulomas isolados de animais não deficientes (WT) e também em relação aos níveis quantificados nos granulomas hepáticos de animais CCL3^{-/-}. Nesta mesma fase, a concentração de IL-10 em granulomas de camundongos WT e CCR5^{-/-} foi estatisticamente semelhante, entretanto a

concentração de IL-10 em granulomas de camundongos $CCL3^{-/-}$ foi menor em relação às concentrações obtidas de animais WT e $CCR5^{-/-}$ (**Figura 37A**).

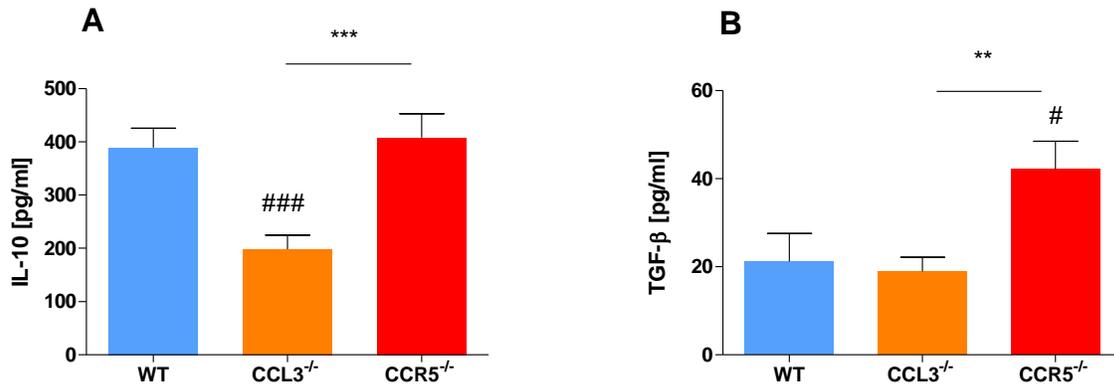


Figura 37. Concentração de citocinas no granuloma de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 ($CCL3^{-/-}$), deficientes na produção de CCR5 ($CCR5^{-/-}$) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Níveis de IL-10 (A) e de TGF- β (B) no homogenato de granuloma hepático de camundongos infectados com 25 cercárias/animal e necropsiados após 12 semanas da infecção *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração das citocinas estimadas pela técnica de ELISA # e ### representam respectivamente $p < 0,05$ e $p < 0,001$ na comparação de animais $CCL3^{-/-}$ e $CCR5^{-/-}$ versus WT. ** e *** representam respectivamente $p < 0,01$ e $p < 0,001$ na comparação entre camundongos $CCL3^{-/-}$ versus $CCR5^{-/-}$.

Para comparar o perfil de ativação detectado em granulomas isolados com o do tecido hepático dos animais infectados, a concentração de citocinas também foi estimada no homogenato de fígado de camundongos na fase crônica da infecção por *S. mansoni*. A concentração de citocinas pró-inflamatórias no fígado de camundongos C57/BL6 WT, $CCL3^{-/-}$ e $CCR5^{-/-}$, na fase crônica da infecção por *S. mansoni* está representada na **Figura 38**. O padrão de estimulação foi semelhante ao observado no granuloma. A concentração de TNF- α e de IL-17 no homogenato hepático de camundongos $CCL3^{-/-}$ foi significativamente reduzida em comparação com os níveis obtidos de animais C57/BL6 WT e de animais $CCR5^{-/-}$, enquanto que a

concentração destas citocinas foram maiores no fígado de camundongos $CCR5^{-/-}$ (Figura 38A e 38D). Não encontramos associações estatísticas significativas entre os grupos WT, $CCL3^{-/-}$ e $CCR5^{-/-}$ em relação à quantificação de IFN- γ e MIF; entretanto, o valor da concentração de IFN- γ foi menor em todos os animais deficientes (Figura 38B e 38C).

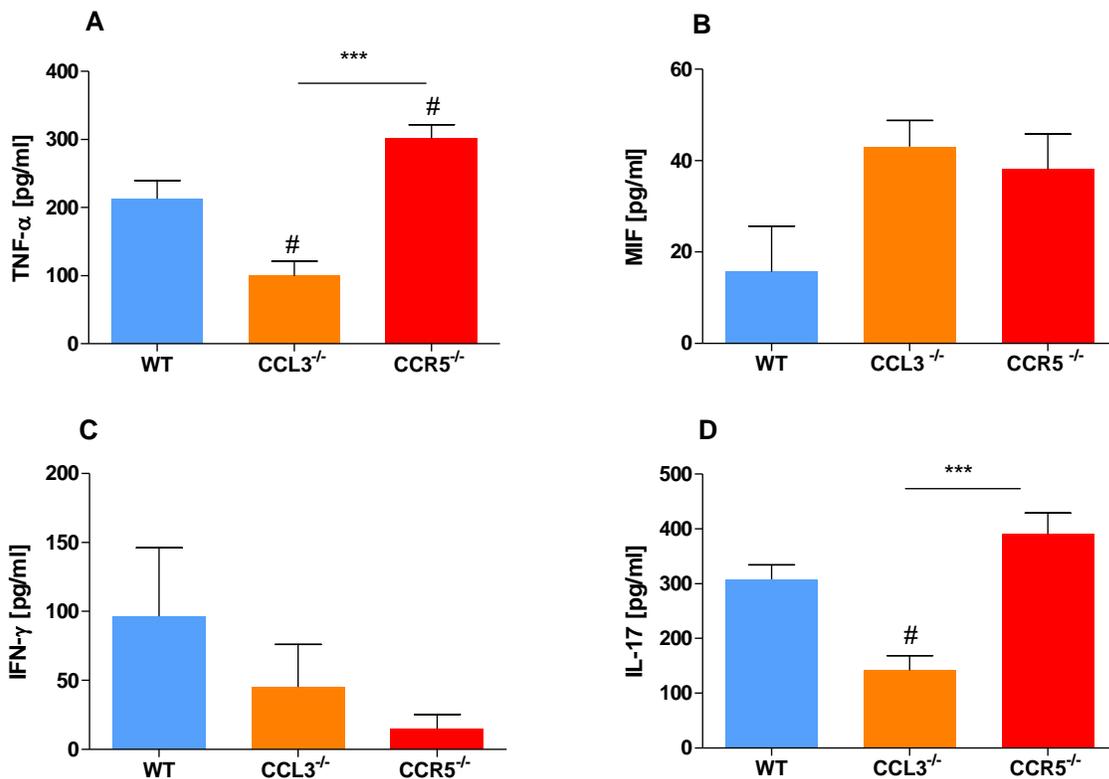


Figura 38. Concentração de citocinas fígado de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 ($CCL3^{-/-}$), deficientes na produção de CCR5 ($CCR5^{-/-}$) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Níveis de TNF- α (A), MIF(B), IFN- γ (C) e IL-17 (D) no homogenato de granuloma hepático de camundongos infectados com 25 cercarias/animal e necropsiados após 12 semanas da infecção *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração das citocinas estimadas pela técnica de ELISA. # representa $p < 0,05$ na comparação de camundongos $CCL3^{-/-}$ e $CCR5^{-/-}$ versus WT e * representa $p < 0,001$ na comparação entre camundongos $CCL3^{-/-}$ versus $CCR5^{-/-}$.**

A concentração das citocinas de perfil Th-2 no fígado dos animais experimentais está esquematizada na **Figura 39**. Os níveis de IL-5, apesar de um relativo declínio no grupo CCL3^{-/-}, não foram diferentes em relação aos níveis quantificados no fígado dos animais selvagens WT. A concentração de IL-4 e da citocina pró-fibrótica IL-13 no fígado de camundongos CCL3^{-/-} foi significativamente menor que em camundongos WT, enquanto que em camundongos CCR5^{-/-} a concentração destas citocinas foi significativamente aumentada em relação aos animais WT e CCL3^{-/-} (**Figura 39A e 39C**). Os dados obtidos no granuloma e no fígado sugerem que a ausência de CCL3 e do receptor CCR5 interferem no perfil da resposta imune de maneira oposta.

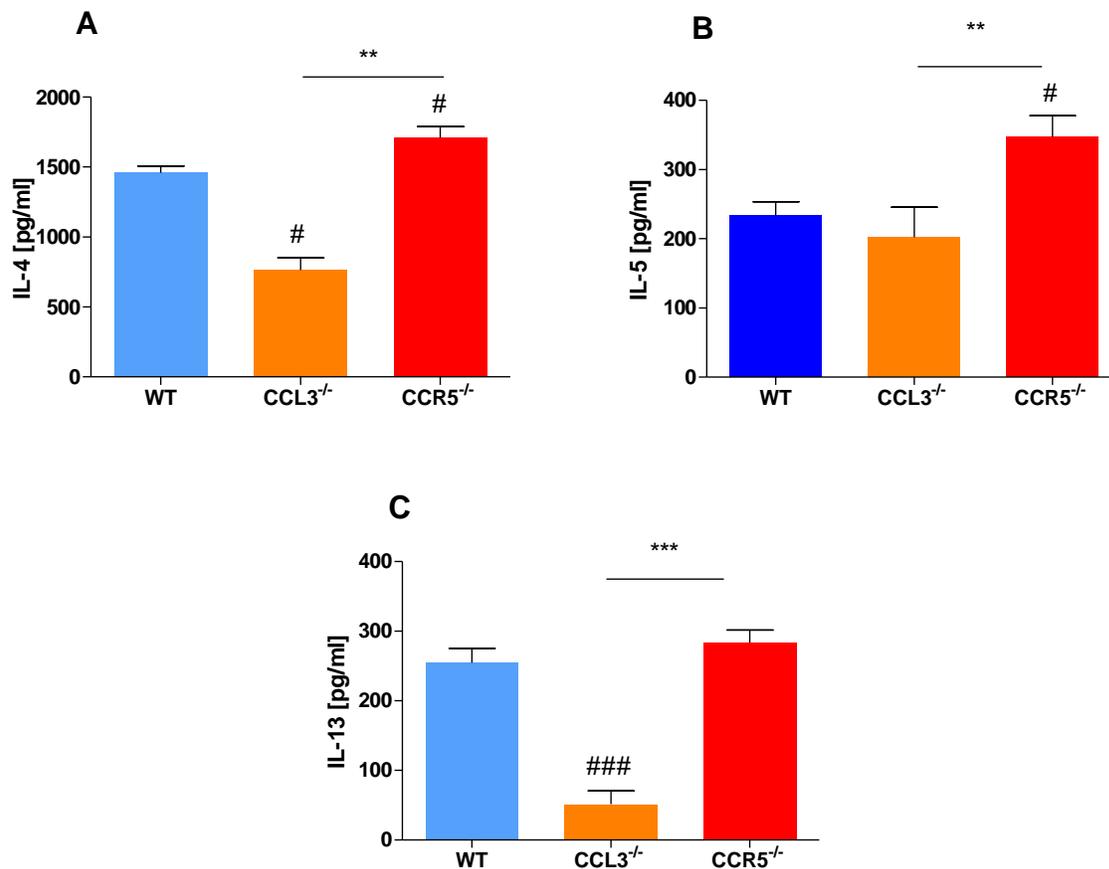


Figura 39. Concentração de citocinas de perfil Th-2 no fígado de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Níveis de IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C) no homogenato de granuloma hepático de camundongos infectados com 25 cercarias/camundongo e necropsiados após 12 semanas da infecção *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da concentração das citocinas estimadas pela técnica de ELISA # e ### representam respectivamente p<0,05 e p<0,001 na comparação dos animais CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} versus WT. ** e * representam p<0,01 e p<0,001 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} versus CCR5^{-/-}.**

A quantificação das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β no fígado de camundongos C57/BL6 WT, CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni* está esquematizada na **Figura 40**. A concentração de IL-10 foi significativamente aumentada no tecido hepático de camundongos CCR5^{-/-} quando comparados aos níveis obtidos do fígado de animais selvagens WT e CCL3^{-/-}. Entretanto, a concentração de TGF- β no homogenato hepático de animais CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} foi menor que em animais WT.

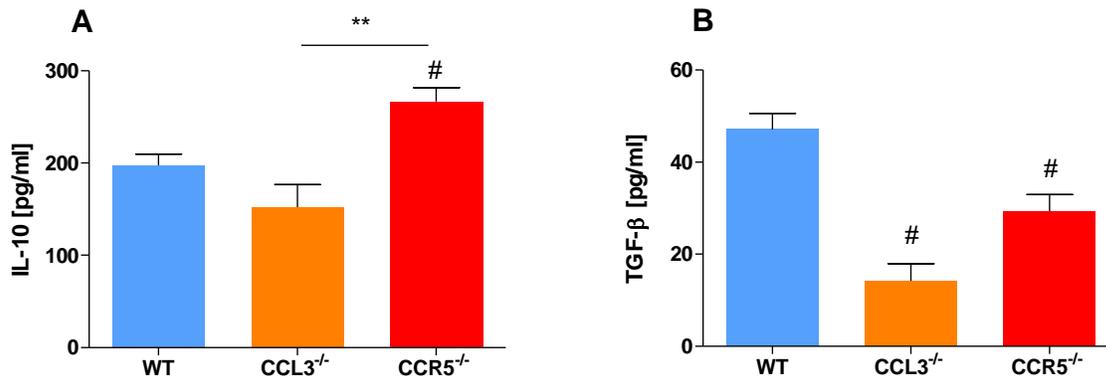


Figura 40. Concentração de citocinas regulatórias no fígado de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Níveis de IL-10 (A) e de TGF- β (B) no homogenato de fígado de camundongos infectados com 25 cercarias/camundongo e necropsiados após 12 semanas da infecção *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração das citocinas estimadas pela técnica de ELISA # representa p<0,05 na comparação de CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} versus WT. ** representa p<0,01 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} versus CCR5^{-/-}.

As **Tabelas 9** e **10** sintetizam a produção de quimiocinas e citocinas no fígado e nos granulomas entre os diferentes grupos experimentais durante a fase crônica da infecção.

Tabela 9. Produção de quimiocinas no fígado e no granuloma de animais WT, CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

Quimiocinas	Fígado			Granuloma		
	WT	CCL3 ^{-/-}	CCR5 ^{-/-}	WT	CCL3 ^{-/-}	CCR5 ^{-/-}
CXCL1	204 ± 32	25 ± 17 [#]	362±104 ^{***}	214 ± 34	31 ± 19 [#]	349±57 ^{####}
CCL3	123 ± 30	-	239±38 [#]	342 ± 44	-	212 ± 45 [#]
CCL11	1507 ± 34	971±126 ^{##}	1427 ± 29	3416±603	302±304 ^{###}	1326±34 [#]

Os dados representam a média ± erro padrão da concentração de quimiocinas em pg/ml. # e ## representam p<0,05 e P<0,01 na comparação dos valores obtidos dos animais CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} em relação aos animais WT e *** representa nível de significância com p<0,001 na comparação entre os animais CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

Tabela 9. Produção de quimiocinas no fígado e no granuloma de animais WT, CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

Citocinas	Fígado			Granuloma		
	WT	CCL3 ^{-/-}	CCR5 ^{-/-}	WT	CCL3 ^{-/-}	CCR5 ^{-/-}
TNF-α	213 ± 27	100 ± 21 [#]	302 ± 20 [*]	415 ± 54	268 ± 37 [#]	401 ± 38
MIF	16 ± 10	43 ± 6	38 ± 8	61 ± 16	37 ± 9	122 ± 9 ^{### *}
IFN-γ	96 ± 50	45 ± 30	15 ± 10	37 ± 14	14 ± 6	21 ± 10
IL-17	308 ± 26	142 ± 27 [#]	391 ± 38 [*]	372 ± 51	242 ± 40 [#]	582 ± 90 ^{###}
IL-4	1459 ± 48	764 ± 87 [#]	1710±81 ^{# *}	1610±100	1129±154	2035±90 ^{# *}
IL-5	234 ± 20	202 ± 43	347 ± 31 ^{###}	355 ± 75	273 ± 42	387 ± 19
IL-13	255 ± 21	52 ± 19 ^{###}	284 ± 17 ^{***}	306 ± 24	183 ± 30 [*]	372 ± 19 ^{# *}
IL-10	208 ± 14	182 ± 36	267 ± 15 ^{**}	389 ± 37	199±26 ^{***}	408±45 ^{***}
TGF-β	46 ± 4	14 ± 4 [#]	31 ± 3 [#]	21 ± 6	19 ± 3	42 ± 6 ^{# **}

Os dados representam a média ± erro padrão da concentração de quimiocinas em pg/ml. #, ## e ### representam p<0,05, p<0,01 e p<0,001 na comparação dos valores obtidos dos animais CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} em relação aos animais WT e *, ** e *** representam respectivamente nível de significância com p<0,05, p<0,01 e p<0,001 na comparação entre os animais CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

5.4.3.3. Atividade enzimática como determinação indireta do infiltrado celular nos granulomas hepáticos isolados de camundongos CCL3^{-/-}, CCR5^{-/-} e WT

A estimativa da infiltração/ativação celular nos granulomas isolados foi indiretamente realizada através da quantificação de atividade enzimática de Mieloperoxidase (MPO) como medida indireta da infiltração/ativação de neutrófilos, Peroxidase de Eosinófilos (EPO) para eosinófilos e de N-acetilglicosaminidase (NAG) para macrófagos durante a fase aguda e durante a fase crônica da infecção por *Schistosoma mansoni*.

Em camundongos não deficientes (WT), os granulomas hepáticos recuperados durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni* apresentaram atividade elevada de MPO, que foi estatisticamente semelhante à atividade de MPO quantificada no granuloma hepático recuperado de camundongos deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}) e de animais deficientes no receptor CCR5 (CCR5^{-/-}) no mesmo período da infecção (**Figura 41A**). Durante a fase crônica da esquistossomose a atividade de MPO foi baixa nos granulomas recuperados dos camundongos WT e em CCL3^{-/-} em relação aos níveis obtidos de granulomas isolados durante a fase aguda da infecção. Porém a atividade de MPO permaneceu aumentada nos animais deficientes na produção do receptor CCR5^{-/-} em relação aos animais CCL3^{-/-} e WT, mas sem significância estatística (**Figura 41B**).

Na oitava semana de infecção, a atividade de EPO nos granulomas de animais CCL3^{-/-} e nos animais CCR5^{-/-} (**Figura 41C**) foi estatisticamente menor que atividade de EPO detectada em granulomas de animais WT com o mesmo tempo de infecção. Durante a fase crônica, granulomas hepáticos isolados de animais CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} apresentaram aumento estatístico da atividade de EPO em relação aos animais não deficientes, WT (**Figura 41D**).

Nos granulomas isolados de camundongos WT e CCL3^{-/-} durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni* foi detectado baixa atividade de NAG, enquanto que nos camundongos CCR5^{-/-} esta atividade enzimática foi estatisticamente maior nesta fase da infecção (**Figura 41E**). Após 12 semanas de infecção foi observada uma diminuição da atividade de NAG nos camundongos CCL3^{-/-} em relação aos animais WT, e um aumento significativo dos níveis de NAG nos animais CCR5^{-/-} em relação aos camundongos não deficientes, sugerindo uma menor participação de macrófagos no granuloma durante a fase crônica na ausência do ligante CCL3 e um aumento da infiltração de macrófagos na ausência do receptor CCR5 (**Figura 41F**).

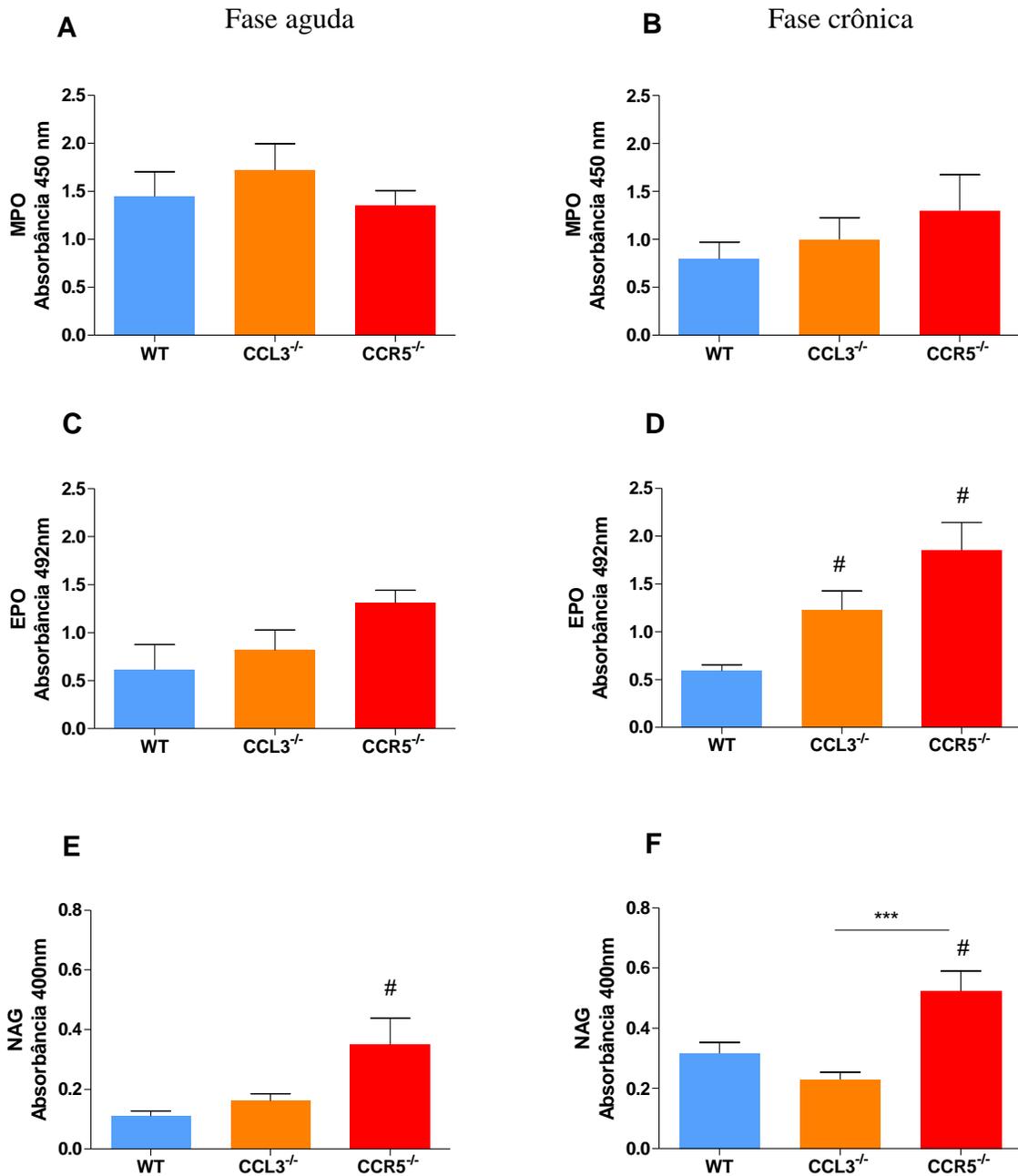


Figura 41. Atividade de Mieloperoxidase (MPO), Peroxidase de eosinófilos (EPO) e de N-acetilglicosaminidase (NAG) no granuloma camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a infecção por *S. mansoni*. (A) EPO em granulomas isolados na fase aguda da esquistossomose e em (B) na fase crônica; (C) MPO em granulomas isolados na fase aguda da esquistossomose e em (D) na fase crônica; (E) NAG em granulomas isolados na fase aguda da esquistossomose e em (F) na fase crônica). # e ## representam p<0,05 e p<0,01 na comparação entre os valores obtidos de camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} versus WT. * e * representam p<0,05 e p<0,001 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.**

5.4.3.4. O efeito de CCL3 e de CCR5 na composição e ativação celular no granuloma hepático durante a infecção experimental por *S. mansoni*

Analisando os resultados expostos até o momento, constatou-se que as diferenças entre os grupos experimentais ocorrem principalmente durante a fase crônica da infecção. Nossos dados também revelaram que a composição celular do granuloma, estimada pela atividade enzimática, e o perfil da resposta imunológica local foram alterados na ausência do ligante CCL3 e de um dos seus receptores, o CCR5. Para melhor caracterizar estas alterações, os granulomas hepáticos foram dissociados, as células recuperadas foram fenotipadas e a produção de citocinas em cada tipo celular foi estimada.

Granulócitos, macrófagos e linfócitos compõem o granuloma induzido por antígenos do ovo de *S. mansoni*. As células recuperadas de granulomas hepáticos de camundongos cronicamente infectados foram avaliadas por tamanho e granulosidade e o perfil está representado na **Figura 42**, apresentados como porcentagem e também extrapolados para número absoluto de células. Os animais CCR5^{-/-} e WT apresentaram proporções semelhantes de granulócitos, macrófagos e linfócitos. Os animais CCL3^{-/-} apresentaram menor proporção de linfócitos no granuloma hepático. Quando consideramos o número absoluto destas células foi verificado que camundongos CCL3^{-/-} apresentam menor número de granulócitos, macrófagos e linfócitos em seus granulomas em relação aos animais WT e CCR5^{-/-}. Contudo, este menor número de células só foi significativamente reduzido em relação ao número de linfócitos recuperados de camundongos CCL3^{-/-} em relação aos animais WT e os animais deficientes na expressão de CCR5, conforme **Figura 42F**.

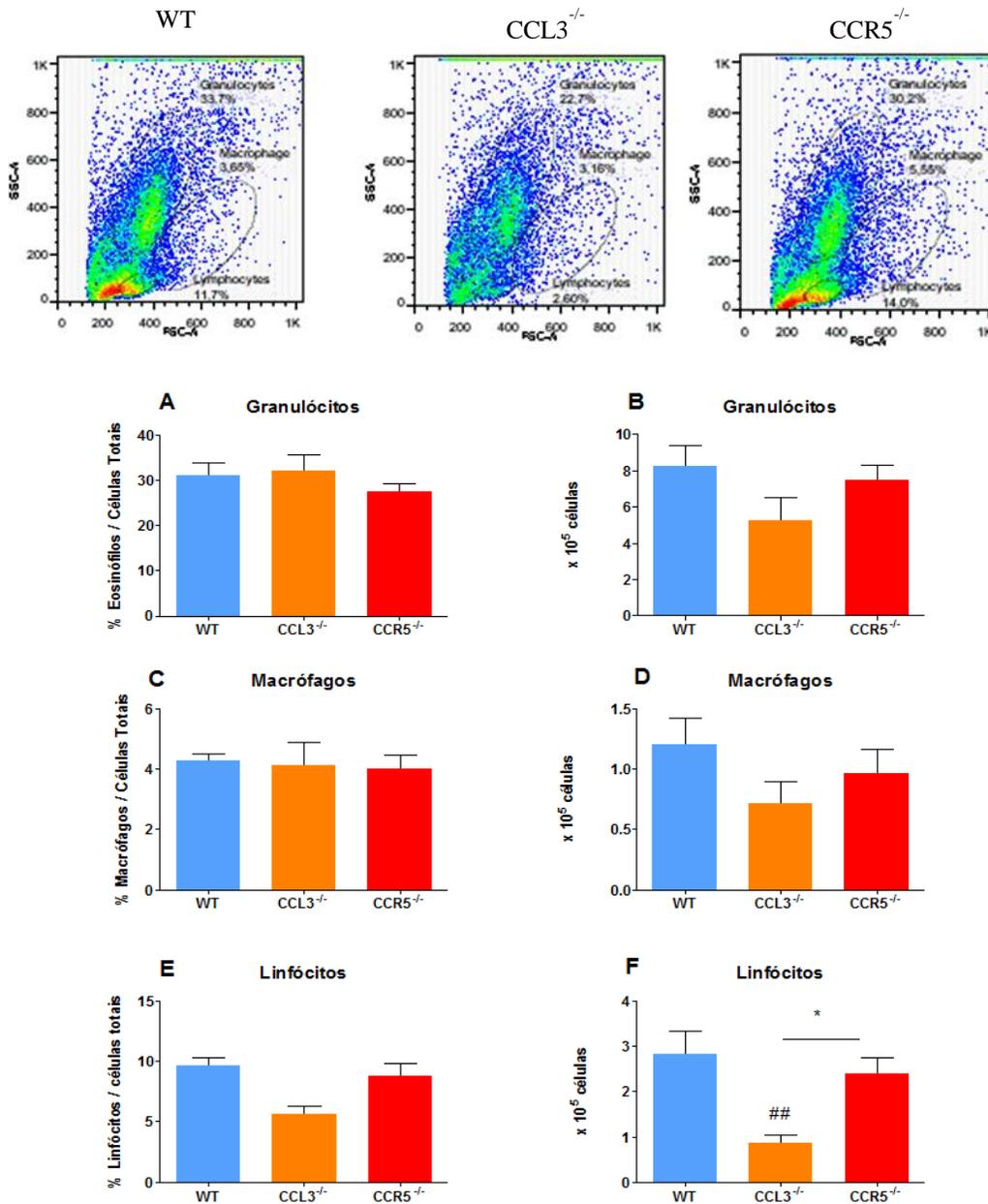


Figura 42. Proporção e número de Granulócitos, Macrófagos e Linfócitos na suspensão celular isolada de granuloma hepático de camundongos C57/BL6 selvagens WT, camundongos C57/BL6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}) e de CCR5 (CCR5^{-/-}) cronicamente infectados por *S. mansoni*. Acima dos gráficos encontra-se a figura representativa das populações celulares identificadas por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) nos diferentes grupos experimentais. (A) proporção de granulócitos, (B) número absoluto de granulócitos obtidos; (C) proporção de macrófagos e (D) número absoluto de macrófagos recuperados; (E) proporção de linfócitos e (F) número absoluto de linfócitos recuperados. Os valores representam a média ± EPM obtida após 12 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/camundongo de *S. mansoni*. ## representa p<0,05 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} versus WT. * representa p<0,05 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

Após a definição da população de linfócitos por tamanho e granulosidade, foram avaliadas a quantidade de linfócitos $CD3^+CD4^+$, conforme ilustrado na **Figura 43**. Camundongos geneticamente deficientes na produção de CCL3 apresentaram redução significativa no número de células T $CD3^+CD4^+$ recuperadas nos granulomas hepáticos em relação aos animais selvagens e também em relação aos animais deficientes na produção de CCR5 (**Figura 43B**). O número de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ que produzem IL-10 foi semelhante entre os três grupos experimentais, enquanto que o número de células produtoras de IL-4 apresentaram redução nos animais $CCL3^{-/-}$ e aumento nos animais $CCR5^{-/-}$ (**Figura 43C**).

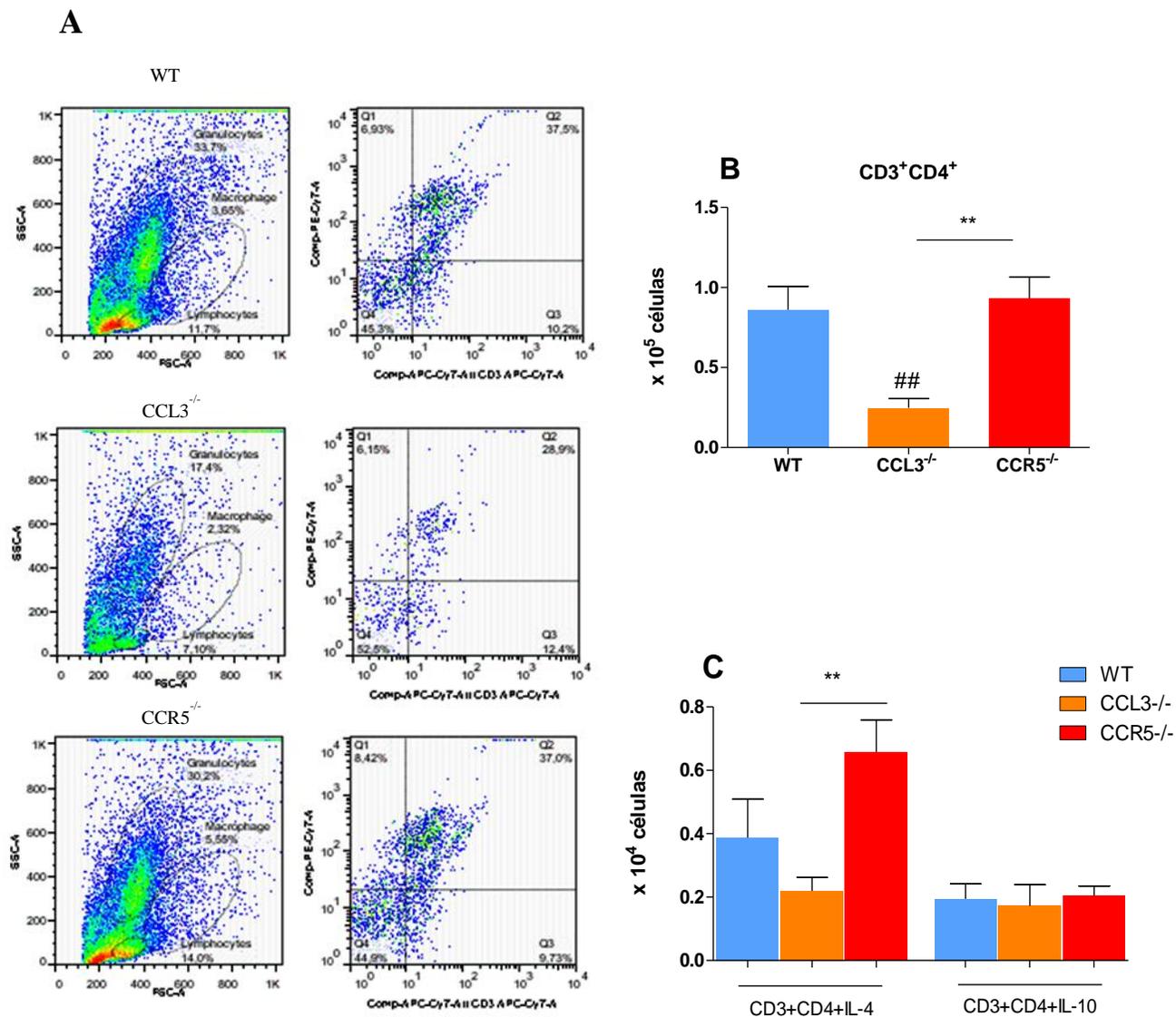


Figura 43. Proporção de células T CD3⁺CD4⁺ obtidas do granuloma hepático de camundongos C57/BL6 selvagens (WT), camundongos C57/BL6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}) e de CCR5 (CCR5^{-/-}) infectados por *S. mansoni*. (A) Figura representativa de linfócitos identificados por tamanho (FSC) e granulocidade (SSC) CD3⁺ e CD4⁺ em cada grupo experimental (B) Número absoluto de número de células T CD3⁺CD4⁺ e (C) Número absoluto de células T CD3⁺CD4⁺ produtoras de IL-4 e IL-10. Os valores representam a média ± EPM obtida após 12 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. ## representa p<0,01 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} versus WT. ** representa p<0,01 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

Dentro da população de linfócitos T CD4⁺CD25⁺, estimou-se a expressão de Foxp3 e a produção de IL-10, característicos de linfócitos T regulatórios (Treg), conforme ilustrado abaixo (**Figura 44A**). Constatou-se um aumento do número de células T CD4⁺CD25⁺ nos granulomas de animais deficientes na produção do receptor CCR5 em relação aos animais WT e CCL3^{-/-} (**Figura 44B**), refletindo uma maior ativação celular nos granulomas de animais CCR5^{-/-}. As análises da citometria de fluxo também revelaram que após 12 semanas da infecção por *S. mansoni* há uma menor porcentagem de células T regulatórias (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ IL-10⁺) no granuloma de camundongos deficientes na produção de CCR5 (**Figura 44C**).

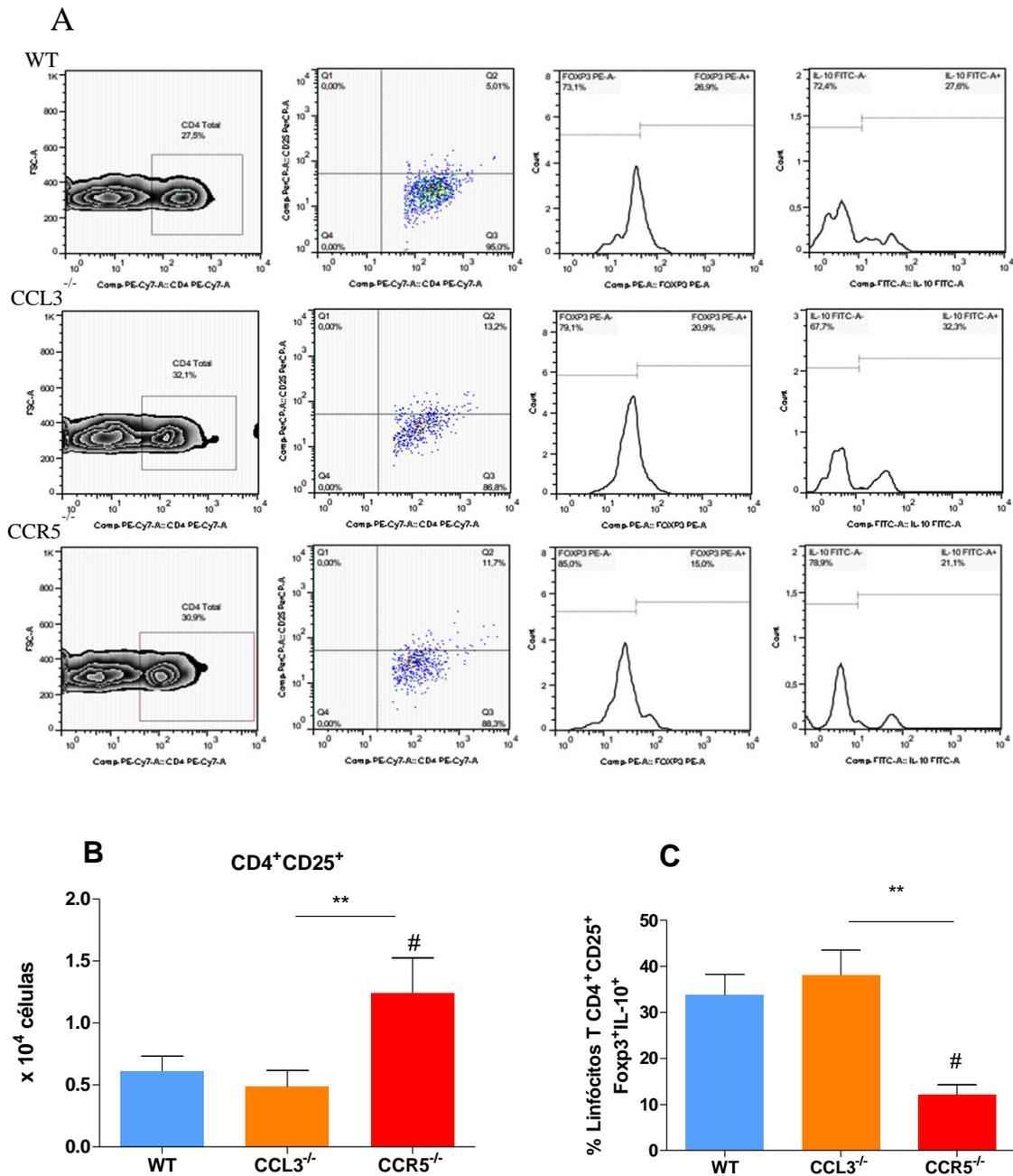


Figura 44. Quantificação de células T CD3⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺ purificadas do granuloma hepático de camundongos C57/BL6 selvagens (WT), camundongos C57/BL6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}) e de CCR5 (CCR5^{-/-}) infectados por *S. mansoni*. (A) Figura representativa de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ que expressam Foxp3 e produzem IL-10, (B) Número absoluto de número de células CD4⁺CD25⁺, (C) Número absoluto de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺. Os valores representam a média ± EPM obtida após 12 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. # representa p<0,05 na comparação entre camundongos CCR5^{-/-} versus WT. ** representa p<0,01 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

A população de granulócitos foi analisada pela expressão do antígeno CD11b e de CD193, que corresponde ao receptor CCR3, presente principalmente em eosinófilos, mas também em mastócitos, basófilos, linfócitos Th2 e plaquetas (Charo et al. 2006). Os resultados mostraram que não houve diferenças na porcentagem de granulócitos CD11b⁺CCR3⁺, apesar de uma relativa diminuição no número de células CD11b⁺CD193⁺ no granuloma de animais CCL3^{-/-} em relação aos animais WT e também aos animais CCR5^{-/-}, este aumento não foi estatisticamente significativo (**Figura 45A**). Dentro da população de granulócitos CD11b⁺CD193⁺ foi analisada a porcentagem de células que produzem IL-4 e IL-10, não sendo detectada diferença na produção de citocinas entre os grupos experimentais (**Figura 45B**).

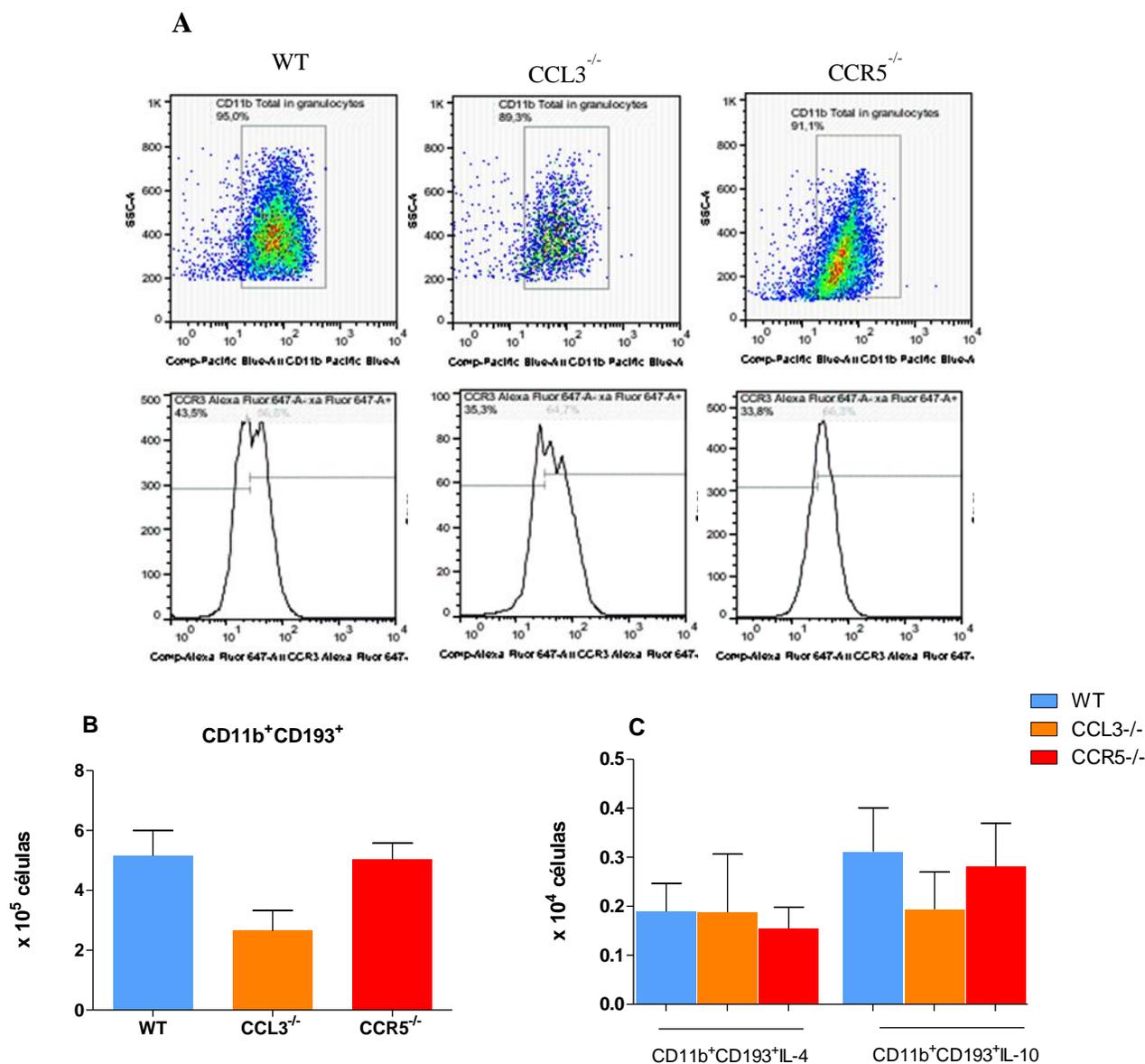


Figura 45. Quantificação de células CD11b⁺CD193⁺ e a produção de células obtidas do granuloma hepático de camundongos C57/BL6 selvagens (WT), camundongos C57/BL6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}) e de CCR5 (CCR5^{-/-}) infectados por *S. mansoni*. (A) Figura representativa de granulócitos CD11b⁺CD193⁺ (A) Número absoluto de número de células CD11b⁺CCR3⁺ (B) Número absoluto de células CD11b⁺CCR3^{-/-} produtoras de IL-4 e IL-10. Os valores representam a média ± EPM obtida após 12 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*.

Para as análises da população de macrófagos, as células isoladas do granuloma foram inicialmente separadas pelo critério de tamanho e granulosidade e posteriormente positivamente selecionadas $CD11b^+F4/80^+$, marcação amplamente utilizada na caracterização de macrófagos murinos teciduais (Gordon et al. 2011). A definição do número de células $CD11b^+F4/80^+$ e as produtoras de IL-4 e IL-10 está representada na **Figura 46A**. O número de células $CD11b^+F4/80^+$ isoladas do granuloma de animais $CCL3^{-/-}$ e animais $CCR5^{-/-}$ cronicamente infectados foi menor que em WT, entretanto a diferença não foi estatisticamente significativa (**Figura 46B**). De maneira semelhante, o número de células que expressam IL-4 também foi diminuída na população de macrófagos $CD11b^+F4/80^+$ do granuloma de animais $CCL3^{-/-}$ e de animais $CCR5^{-/-}$. Por outro lado, o número de macrófagos $CD11b^+F4/80^+$ que expressam IL-10 na população de células recuperadas de animais WT e $CCL3^{-/-}$ foram semelhantes, enquanto que houve redução de células $CD11b^+F4/80^+$ produtoras de IL-10 entre as células isoladas do granuloma de animais deficientes na expressão de CCR5 cronicamente infectados (**Figura 46C**).

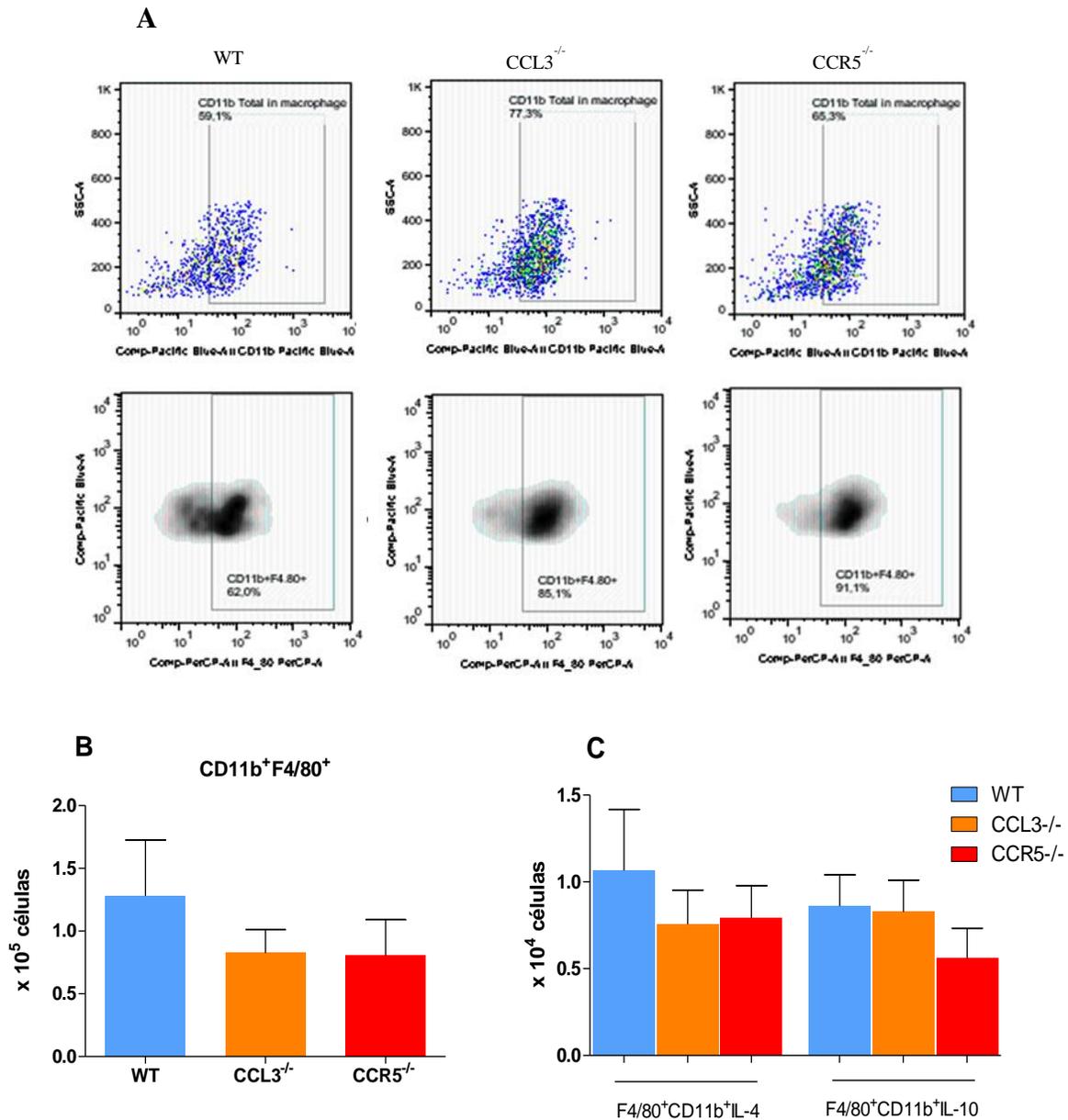


Figura 46. Quantificação de células CD11b⁺F4/80⁺ e a produção de células obtidas do granuloma hepático de camundongos C57/BL6 selvagens (WT), camundongos C57/BL6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}) e de CCR5 (CCR5^{-/-}) infectados por *S. mansoni*. (A) Figura ilustrativa da população de macrófagos CD11b⁺F4/80⁺ nos diferentes grupos experimentais, (B) Número absoluto de número de células CD11b⁺F4/80⁺ (C) Número absoluto de células CD11b⁺F4/80⁺ produtoras de IL-4 e IL-10. Os valores representam a média ± EPM obtida após 12 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*.

5.4.3.5. Efeito da ausência de CCL3 e CCR5 na infiltração e ativação de células CD11b⁺ no granuloma hepático na fase crônica da infecção por *Schistosoma mansoni*

Células do granuloma que expressam CD11b⁺ (principalmente macrófagos e em menores níveis eosinófilos) foram isolados e re-estimulados *in vitro* para confirmação do perfil de ativação celular, pois são células essenciais para formação/regulação do granuloma esquistossomótico que foram diferencialmente afetadas nos animais deficientes aqui analisados. Inicialmente foi quantificada a produção de quimiocinas pelas células purificadas. Conforme esperado, não foi detectada produção de CCL3 por células CD11b⁺ purificadas dos granulomas hepáticos no grupo de camundongos deficientes na produção deste ligante (**Figura 47A**). Também não foi detectada produção de CCL11 nas células CD11b⁺ nos granulomas de camundongos CCL3^{-/-} nesta fase da infecção (**Figura 47B**). Entretanto, houve uma maior produção de CXCL1 no sobrenadante de cultura de células CD11b⁺ de animais deficientes na produção de CCL3 que em animais não deficientes (**Figura 47C**). A produção de CXCL1 e de CCL3 no sobrenadante de cultura de células CD11b⁺ de animais CCR5^{-/-} foi semelhante ao detectado em camundongos WT, mas houve aumento da produção de CCL11.

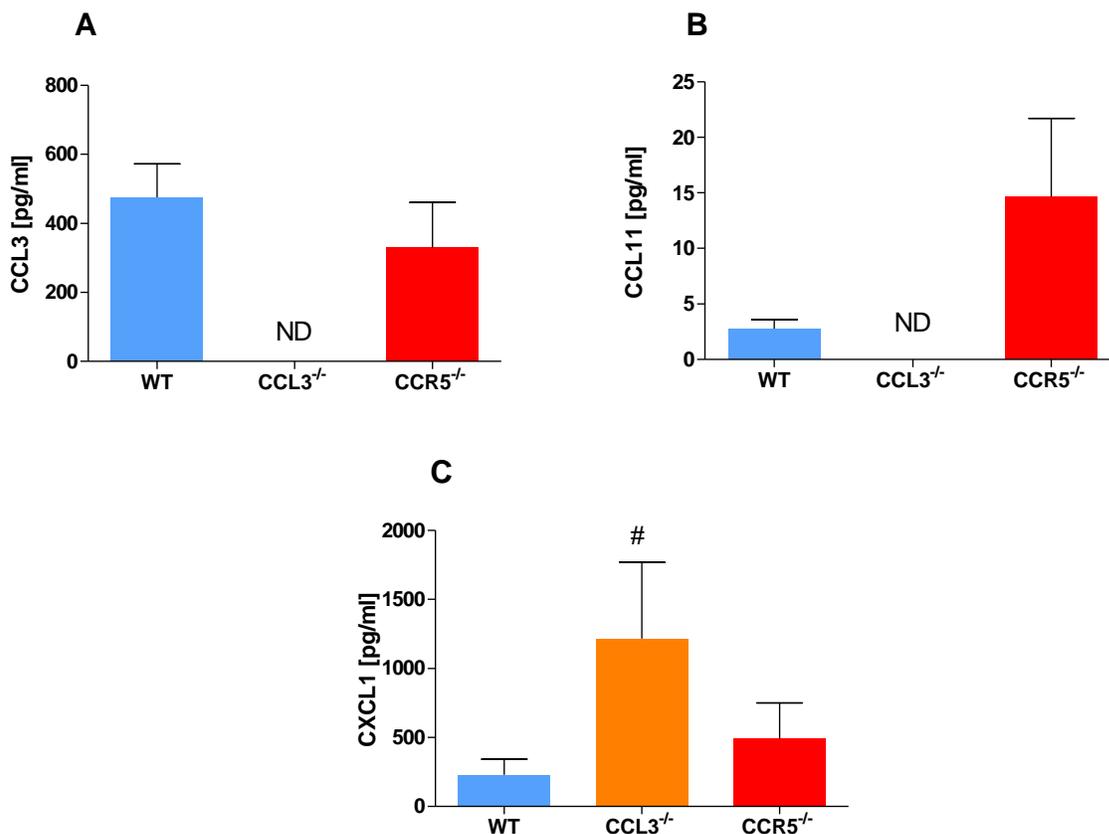


Figura 47. Quantificação da produção de quimiocinas em sobrenadante de cultura de células CD11b⁺ purificadas do granuloma hepático de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) na fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Foram quantificados níveis de CCL3 (A), CCL11 (B) e CXCL1 (C). Cada ponto representa média ± erro padrão obtido após 12 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. # representa p<0,05 para camundongos e CCL3^{-/-} comparados com camundongos WT.

O sobrenadante de cultura de células CD11b⁺ isolados de granulomas de camundongos cronicamente infectados dos diferentes grupos experimentais também foi utilizado para quantificar a produção citocinas. MIF e TNF- α citocinas pró-inflamatórias típicas de macrófagos do tipo 1. Já os M2 que são diferenciados na presença de citocinas de perfil Th2 também produzem IL-4 e IL-13 e citocinas regulatórias, como IL-10 e TGF- β (Gordon & Martinez 2010).

Foi verificado que a ausência do ligante CCL3 não alterou significativamente a produção de MIF e das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β (**Figura 48B, 48D e 48E**), mas resultou em aumento estatístico da produção de TNF- α e da citocina IL-4 por estas células (**Figura 48A e 48C**). Por outro lado, células CD11b⁺ isolados de granulomas de camundongos deficientes no receptor CCR5 produziram níveis semelhantes das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e MIF na comparação com animais selvagens (**Figura 48A e 48B**). Entretanto, a produção da citocinas de perfil Th2 foi aumentada nas células purificadas de granulomas de animais CCL3^{-/-} em relação aos animais WT. Adicionalmente, apesar da produção de níveis semelhantes de IL-10 entre os camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}, os níveis da citocina TGF- β produzidos por pelas células CD11b⁺ de animais CCR5^{-/-} foram estatisticamente menores em comparação com os animais WT e também na comparação com os animais CCL3^{-/-} (**Figura 48B, 48D e 48E**). Os níveis de IL-13 obtidos nos três grupos experimentais foram abaixo do detectado pelo ensaio.

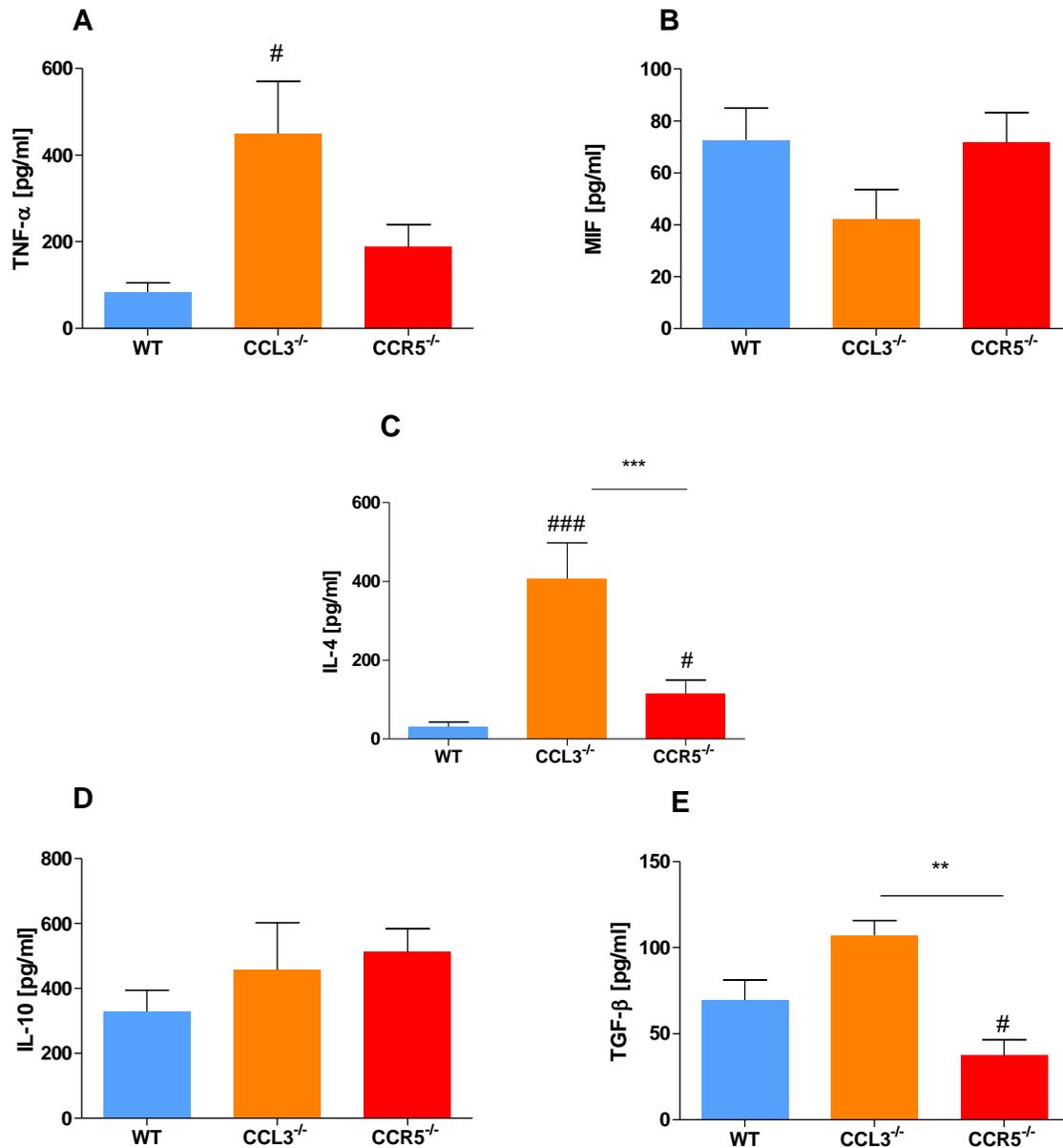


Figura 48. Produção de citocinas por células CD11b⁺ purificadas de granulomas hepáticos de camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) na fase crônica da infecção por *S. mansoni*. (A) TNF-α, (B) MIF, (C) IL-4, (D) IL-10, (E) TGF-β. Os valores representam a média ± EPM obtido em camundongos infectados pela via subcutânea com 25 cercarias/animal e necropsiados após 12 semanas da infecção por *S. mansoni*. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. # e ### representam p<0,05 e p<0,001 na comparação entre os valores obtidos de camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-} versus WT. ** e *** representam p<0,01 e p<0,001 na comparação entre camundongos CCL3^{-/-} e CCR5^{-/-}.

As enzimas Arg1 e iNOs em macrófagos são reguladas pela produção de citocinas do tipo 2 ou tipo-1, respectivamente, e atuam na degradação de L-arginina, o substrato comum de ambas enzimas. Para avaliar se CCL3 e CCR5 afetam a polarização dos macrófagos durante a formação do granuloma, células CD11b⁺ purificadas de granulomas dos diferentes grupos experimentais foram estimulados e o sobrenadante de cultura utilizado para mensurar a produção de óxido nítrico (na forma estável de nitrito) marca da estimulação clássica de macrófagos, e nas células foi quantificada a atividade de Arg1. Não foram detectados níveis de nitrito no sobrenadante de cultura de células isoladas de granuloma de todos os grupos experimentais. A produção de uréia não foi diferente entre os animais WT e CCL3^{-/-}. No entanto, a concentração de uréia foi estatisticamente menor nos animais CCR5^{-/-} em comparação com os animais WT, sugerindo menor atividade de arginase (**Figura 49**).

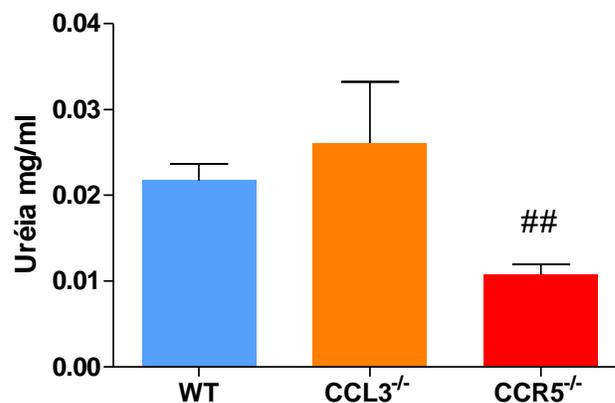


Figura 49. Quantificação da atividade de arginase em macrófagos isolados de granulomas hepáticos hepáticos camundongos C57BL/6 deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}), deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) e não deficientes (WT) durante a infecção crônica por *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da concentração das citocinas estimadas pela técnica de ELISA. Os valores representam a média ± EPM obtido com 10 animais/grupo infectados pela via subcutânea com 25 cercarias/animal e necropsiados após 12 semanas da infecção. Os dados são representativos de dois experimentos independentes. ## representa valor de p<0,01 na comparação entre os níveis dos animais CCR5^{-/-} versus WT.

5.5. DISCUSSÃO

As quimiocinas são os principais elementos envolvidos no recrutamento de células inflamatórias para o fígado em resposta a lesões teciduais (Marra & Tacke 2014; Czaja 2014). A quimiocina CCL3 se liga aos receptores CCR1 e CCR5 e é quimiotática para linfócitos, monócitos e eosinófilos, que são tipos celulares essenciais na formação do granuloma ao redor do ovo de *S. mansoni*. CCR5 é expresso principalmente em subpopulações de linfócitos e macrófagos, e por células do endotélio, epitélio e fibroblastos (Mueller et al. 2004). O sistema que envolve a sinalização via quimiocinas é caracterizada pela significativa redundância, uma vez que um receptor pode ligar a múltiplos ligantes, e, inversamente, um único ligante pode ligar-se vários receptores de quimiocinas. No caso específico do receptor CCR5, além de se ligar a CCL3, este receptor também é ativado por CCL4, CCL5 e CCL8. No entanto, o padrão de expressão espaço-temporal para diferentes quimiocinas e receptores pode indicar que provavelmente desempenham papéis distintos *in vivo* (de Oliveira et al. 2014). Trabalhos que avaliam a participação de quimiocinas durante a formação do granuloma esquistossomótico se baseiam principalmente em modelos de formação sincronizada de granulomas pulmonares (revisto por Chensue et al. 2013). No entanto, a dinâmica da resposta imunológica e da produção de quimiocinas pode ser influenciada pela anatomia fisiológica intrínseca do órgão acometido, direcionando a resposta inflamatória tecidual (Park et al. 2001). Particularmente na esquistossomose, trabalhos demonstraram diferenças órgão-específicas durante a formação do granuloma induzido por *S. mansoni* (Ragheb & Boros 1989), sendo verificada a atuação determinante de células residentes no tecido afetado em cooperação com as células do sistema imune na definição do processo inflamatório local (Anthony et al. 2012). No presente trabalho foi detalhada a resposta imunológica que se desenvolve no fígado, principal órgão acometido durante a evolução da doença crônica. O fígado é um órgão complexo e clinicamente relevante

durante a infecção por *S. mansoni* no qual residem muitas células especializadas em direcionar a inflamação local que é caracterizada por uma resposta granulomatosa fibrótica crônica contra os ovos do parasito que é determinante para a evolução da hepatopatologia (Anthony et al. 2012). Os dados do presente estudo confirmam a importância da produção da quiniocina CCL3 e do receptor CCR5 na formação do granuloma e evolução do quadro clínico da esquistossomose crônica em murinos. Apesar da deposição de ovos de *S. mansoni* no fígado dos animais geneticamente deficientes na produção de CCL3 e do receptor CCR5 ter sido semelhante ao detectado em camundongos não deficientes, a ausência da produção de CCL3 reduziu significativamente o tamanho do baço dos animais cronicamente infectados, enquanto que na falta de ativação de CCR5 foi verificado aumento do volume do fígado, do intestino, do baço, bem como um aumento da concentração de hidroxiprolina em granuloma hepático isolado, que indica maior deposição de colágeno, e aumento da atividade sérica de alanina aminotransferase, sugerindo maior lesão hepática.

A produção aumentada de CCL3 tem papel importante na evolução de outras patologias com predominância de resposta do tipo-2; Lukacs et al. (1996) demonstraram a participação de CCL3 na acumulação de eosinófilos no pulmão durante processos alérgicos e Alam et al. (1996) reportaram o aumento dos níveis de CCL3 no fluido broncoalveolar de pacientes asmáticos em relação a indivíduos não asmáticos. A participação de CCL3 e dos seus receptores na formação do granuloma esquistossomótico e na evolução da sua patologia apresentados no presente trabalho confirmam dados anteriores da literatura. Lukacs et al. (1993) demonstraram que a neutralização de CCL3 levou a formação de granulomas menores em modelo experimental de formação de formação de granulomas pulmonares. A atuação da produção de CCL3 na resposta imune parece ser mediada via ativação de CCR1, um dos receptores de CCL3, pois

camundongos deficientes na produção de CCR1 apresentam uma redução de 40% no tamanho do granuloma pulmonar em relação aos animais selvagens. A ausência de CCR1 também resultou em alteração do balanço Th1/Th2 com aumento da produção de IFN- γ e diminuição da produção de IL-4 (Gao et al. 1997). Posteriormente, a infecção experimental por *S. mansoni* em camundongos deficientes na produção de CCL3 também resultou em granulomas hepáticos menores, que foram acompanhados por menor produção de citocinas do perfil Th-2, especialmente IL-13 (Souza et al., 2005). A confirmação de CCL3 como um importante mediador da imunopatologia induzida na esquistossomose é reforçada pelo relato de maior produção de CCL3 por células de indivíduos infectados por *S. mansoni* e reestimuladas por antígeno do parasito *in vitro* (Falcão et al. 2002). Na esquistossomose humana, nossos dados também demonstram que a produção elevada de CCL3 em pessoas infectadas foi associada à esquistossomose grave (Souza et al., 2005; Souza et al. 2006) e os resultados apresentados no capítulo I demonstraram que a intensidade da fibrose hepática está associada com aumento dos níveis de CCL3 em pacientes com esquistossomose.

De maneira interessante, o papel pró-inflamatório mediado pela produção de CCL3 não está associado à ativação do receptor CCR5, já que camundongos deficientes na expressão de CCR5 apresentaram um quadro mais grave de esquistossomose, confirmando dados anteriormente publicados pelo nosso grupo de pesquisa (Souza et al., 2011). A fibrose hepática, hipertensão portal e hemorragias gástricas são as principais causas de morbidade e mortalidade em esquistossomose humana (Cheever et al. 2000), e por isso o interesse em compreender os mecanismos que regulam o desenvolvimento patologia hepática associada à participação de CCL3 e de CCR5 durante a infecção crônica por *S. mansoni*.

Evidências experimentais indicam que a produção local de CCL3 é determinante na formação do granuloma, afetando o recrutamento e ativação celular. Entretanto, os dados foram obtidos com modelos experimentais de formação de granulomas pulmonares ou avaliaram o perfil de ativação de células do baço ou linfonodo (Souza et al. 2005; Chensue 2013), sendo necessário esclarecer a resposta tecidual local. Com o foco na resposta hepática, nossos resultados mostram que a ausência de CCL3 ou do receptor CCR5 não produziram alterações significativas na concentração de citocinas no fígado durante a fase aguda da esquistossomose, apesar de ter sido verificado a redução da atividade de EPO nos animais deficientes de ambos os grupos. Além disto, nos camundongos deficientes para CCL3 foi verificada uma menor atividade de NAG no início da infecção. Estas diferenças podem ter consequências na organização do granuloma e gerar as diferenças identificadas posteriormente. A redução de atividade de EPO durante a fase aguda da esquistossomose em camundongos deficientes sugere que CCL3 é importante na acumulação de eosinófilos na formação do granuloma hepático, o que vai de encontro com dados prévios da literatura que mostraram a participação de CCL3 no recrutamento de eosinófilos durante processos alérgicos (Lukacs et al. 1996). A atuação de CCL3 em eosinófilos deve ocorrer pela ativação da via CCR1 e não via CCR3 (Ponath et al. 1996), o que mais uma vez reforça a via CCL3-CCR1 no agravamento da resposta granulomatosa. Essa redução inicial do infiltrado eosinofílico, parece ter estimulado a produção local de quimionas e citocinas, resultando na diminuição da concentração de CCL11 e de CXCL1 detectada no granuloma de fase crônica de esquistossomose de camundongos CCL3^{-/-}. Na fase crônica da esquistossomose foi verificado que granulomas formados na ausência de CCL3 aumentam a atividade de EPO, mas ainda apresentam uma menor celularidade, com diminuição significativa da infiltração de células TCD3⁺CD4⁺ e de células CD4⁺ produtoras de

IL-4 no granuloma de animais CCL3^{-/-} em relação aos animais WT e CCR5^{-/-}. Os dados mostram que CCL3 é uma quimiocina importante no recrutamento de células que irão formar o granuloma ao redor dos ovos do parasito. Tal fato indiretamente explica a redução da produção de citocinas e de quimiocinas nos granulomas destes animais tanto em relação aos animais selvagens quanto em relação aos animais deficientes na produção de CCR5.

Na tentativa de verificar o efeito da menor migração de celular na ativação das células que compõem o granuloma foi realizada a quantificação de citocinas no fígado e no granuloma de animais deficientes na produção do ligante CCL3, sendo verificada uma diminuição da concentração de IL-13, de TNF- e de IL-10 no homogenato de granuloma, enquanto que no tecido hepático, além da redução dos níveis das citocinas mencionadas, também verificamos redução da concentração de IL-4, IL-17 e TGF- β . Essa diferença entre o granuloma e os tecidos é uma evidência da importância da participação das células hepáticas residentes durante a resposta imunológica. A diminuição de IL-4 e de IL-10 já havia sido documentada anteriormente, porém a dosagem havia sido realizada em células do linfonodo mesentérico reestimuladas *in vitro* (Souza et al. 2005). Adicionalmente, o trabalho atual demonstrou a redução da produção de citocinas de diferentes perfis. Diminuição nos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-17, Th2 e também regulatórias (IL-10) durante a formação do granuloma. A ausência de CCL3 levou a uma resposta mais branda ao redor do ovo de *S. mansoni*. A avaliação patológica reflete essa resposta imunológica menos intensa. Conforme demonstrado, estes animais apresentam um menor aumento do baço em relação aos animais selvagens e em relação aos animais CCR5^{-/-}. Esse fato pode ser uma consequência de uma resposta imunológica mais tênue, uma vez que o baço é um órgão linfóide, e também em decorrência de uma menor inflamação no fígado destes animais, com menos fibrose e conseqüentemente uma menor pressão portal. Os

nossos dados reforçam a participação de CCL3 na patologia grave da esquistossomose, e ainda acrescenta a importância deste ligante no estabelecimento da resposta inflamatória ao redor dos ovos embolizados no fígado do hospedeiro com efeitos pró-inflamatórios durante a formação do granuloma hepático. Células residentes hepáticas produzem grandes quantidades de CCL3 durante processos inflamatórios hepáticos (Czaja 2014; Seki et al. 2009). Além disso, CCL3 parece atuar nas HSCs no processo de transdiferenciação em miofibroblastos, que em conjunto com os macrófagos são essenciais na produção de colágeno (Seki et al. 2009). A produção de CCL3 é importante no estabelecimento da resposta imunológica e amplificação da mesma, pois há relatos da produção aumentada desta quimiocina desde as fases iniciais até fases mais tardias de formação de granulomas no modelo de infecção por *S. japonicum*. Neste mesmo modelo a produção de CCL3 foi associada ao desenvolvimento de fibrose hepática, pois sua produção foi relacionada a expressão de TGF- β e PDGF- β (Burke et al. 2010).

De forma contrária, o receptor CCR5 parece atuar no controle negativo do processo inflamatório granulomatoso. Os animais deficientes na produção de CCR5 (CCR5^{-/-}) apresentaram uma maior infiltração de neutrófilos e macrófagos em relação aos animais CCL3^{-/-}. Foi observada uma maior produção de quimiocinas CXCL1 nos granulomas recuperados no fígado. De forma interessante, diferentemente do encontrado nos granulomas isolados, a dosagem tecidual de quimiocinas apontaram um aumento da produção de CCL3 em relação aos animais selvagens, sendo um indício da participação das células teciduais residentes no processo inflamatório hepático, uma vez que células residentes são importantes origem de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas (Anthony et al. 2012; Czaja 2014). Este aumento na produção de quimiocinas reflete uma maior infiltração/ativação celular observado no granuloma dos animais deficientes na produção de CCR5, verificado pelo aumento da atividade de EPO e NAG e pela

maior número de linfócitos TCD4+, além do aumento de células TCD4+ ativadas e produtoras de IL-4 no granuloma de camundongos deficientes cronicamente infectados. O papel de CCR5 no recrutamento celular e na inflamação é controverso, e aparentemente depende do modelo experimental empregado. Enquanto alguns estudos demonstraram claramente uma inibição de certos parâmetros da resposta inflamatória, outros mostraram uma exacerbação da inflamação em camundongos, indicando papel modulador deste receptor de quimiocina. Em camundongos deficientes na produção de CCR5 e infectados com *Toxoplasma gondii* houve uma menor migração das células NK para o local da infecção e, conseqüentemente, níveis mais baixos de IFN- γ (Khan et al. 2006). Camundongos deficientes em CCR5 e infectados com o *Trypanosoma cruzi* apresentaram menor grau de miocardite em decorrência da menor migração de células T no coração (Machado et al. 2005) e também um menor infiltrado eosinofílico e fibrose diminuída após desafio intrapulmonar com *Aspergillus fumigatus* (Schuh et al. 2002). Sob certas condições experimentais, a ausência de CCR5 pode exacerbar a inflamação. Por exemplo, camundongos deficientes em CCR5 exibiram no modelo de infecção por *Mycobacterium tuberculosis* um aumento da resposta humoral e da resposta DTH e um maior nível de infiltrado pulmonar (Zhou et al 1998; Algood & Flynn 2004). As análises dos dados obtidos pela citometria de fluxo nos mostraram que os animais deficientes na produção de CCR5 e cronicamente infectados por *S. mansoni* apresentam uma maior proporção de células CD4⁺CD25⁺ e de CD3⁺CD4⁺IL-4. A expressão de CD25, cadeia α do receptor de IL-2, em linfócitos TCD4⁺ demonstra uma maior ativação destas células nos granulomas dos animais CCR5^{-/-}, justificando o aumento da produção de citocinas e de quimiocinas no fígado destes animais. As quantificações da concentração de citocinas no tecido hepático e no granuloma isolado confirmaram o aumento da ativação das células locais em camundongos CCR5^{-/-} cronicamente infectados, demonstrando produção

aumentada de citocinas tanto no granuloma isolado (aumento de MIF, IL-17, IL-4, TGF- β), quanto no tecido hepático (aumento de TNF- α , IL-4, IL-5, IL-10). O excesso de produção de citocinas na ausência de CCR5 pode ser também o resultado da sinalização de seus ligantes através de outros receptores, já que a razão ligante/receptor pode ter aumentado na ausência de CCR5 (Zhou et al. 1998). Tal fato demonstra que, no modelo de inflamação induzida por ovos de *S. mansoni*, a expressão de CCR5 tem papel modulador da formação do granuloma.

Em nosso modelo experimental, a ausência de CCR5 alterou a produção de citocinas pró-inflamatórias, bem como de citocinas modulatórias e da resposta do tipo-2. O aumento da concentração de citocinas Th2, principalmente de IL-4 e IL-13 nos animais CCR5^{-/-} cronicamente infectados pode ter contribuído com a exacerbação da fibrose hepática observada nestes animais. Trabalhos anteriores mostram que a produção de IL-13 no fígado induz a produção de colágeno, TGF- β em HSCs (Sugimoto et al. 2005). IL-13 em conjunto com TGF- β pode atuar sinergicamente na ativação de miofibroblastos que produzem matriz extracelular. Na esquistossomose, o papel pró-fibrótico de IL-13 foi previamente demonstrado tanto em modelos experimentais (Chiaramonte et al. 1999; 2000; Fallon et al. 2000) como em humanos (De Jesus et al. 2004; Magalhães et al. 2004). Interessantemente, a resposta Th2 mais intensa não conseguiu diminuir o processo de lesão tecidual, uma vez os níveis séricos de AST foram estatisticamente aumentados no soro dos animais CCR5^{-/-}. O aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e MIF e uma acentuada resposta de perfil Th17 observada no granuloma e no fígado destes animais podem ter sido lesivos ao tecido. O aumento da produção de IL-17 em camundongos deficientes no receptor CCR5 pode também afetar na fibrose hepática induzida pela infecção por *S. mansoni*, já que trabalhos da literatura têm relacionado células Th17 no desenvolvimento da fibrose hepática crônica em outros modelos experimentais. O

aumento dos níveis de IL-17 no fígado e na circulação foi demonstrado durante a fibrose induzida por CCl₄ e pela ligadura do ducto biliar em camundongos (Meng et al. 2012). Um estudo desenvolvido por Zheng et al (2013) mostrou que o bloqueio da IL-17 reduzia a fibrose hepática, enquanto o tratamento com IL-17 recombinante resultou no aumento do desenvolvimento da fibrose. Além disso, demonstrou-se que os principais tipos de células no fígado que são ativadas por IL-17 são as células de Kupffer e HSCs, principais células envolvidas na fibrose (Meng et al. 2012).

Efeitos pró-inflamatórios da ativação da via CCR5 no desenvolvimento da fibrose têm sido descrita em modelo de indução de fibrose pulmonar experimental por Bleomicina. Neste modelo experimental, os animais deficientes na produção de CCR5 apresentaram menor deposição de colágeno (Ishida et al. 2007). Incidência reduzida de artrite e uma menor deposição do colágeno também foram documentadas na ausência deste receptor (Bao et al. 2005). Seki et al. (2009), demonstraram efeitos positivos da participação de CCR5 e também de CCR1 na fibrose hepática induzida em modelos experimentais após a administração de CCl₄ ou submetidos a ligadura do ducto biliar, pois constatou-se um aumento da expressão dos dois receptores além do aumento da produção dos seus ligantes CCL3, CCL4 e CCL5. Os mesmos autores relataram em humanos o aumento da expressão de RNAm para CCR5 e também para CCR1 em pacientes com cirrose hepática. Além disso, CCR5 é expresso em subpopulações de macrófagos e nos tecidos pelos fibroblastos (Mueller et al. 2004), o que indica a participação deste receptor durante a fibrogênese tecidual. Em alguns casos, os mecanismos de compensação devem suprir a ausência de CCR5, porém a divergência dos dados quanto à participação de CCR5 no desenvolvimento da fibrose pode ser dependente da natureza do estímulo e de

características órgão-específicas, possivelmente decorrentes de diferentes populações celulares no processo de reparação e modulação da resposta inflamatória.

CCR5 parece exercer um papel muito mais importante na resposta inflamatória que vai além da regulação do tráfico de células do sistema imunológico. Nossos dados confirmam que a sinalização via CCR5 induz regulação da ativação de células T, demonstrando que a presença de células regulatórias produtoras de IL-10 foi significativamente reduzida no fígado de animais CCR5^{-/-} em comparação aos animais WT e CCL3^{-/-}. A presença de células T regulatórias tem sido relacionada à proteção contra a patologia da esquistossomose experimental, pois previne a exacerbada produção de citocinas em resposta aos antígenos do ovo, conforme demonstrando por Hesse et al. (2004). De fato, os nossos dados corroboram com este dado, pois observamos uma maior produção de citocinas e uma maior ativação células em células T isoladas dos granulomas hepáticos de camundongos CCR5^{-/-}, indicando a importância da expressão deste receptor para migração de células T reg no local da inflamação. A importância da expressão de CCR5 para o recrutamento de células com propriedades regulatórias ao sítio inflamatório levando a modulação da resposta inflamatória também foi observada em modelos de *Leishmania major* (Yurchenko et al. 2006) em camundongos portadores de tumores (Schlecker et al. 2012). Souza et al. (2011) demonstraram uma frequência de células Foxp3⁺ na região do granuloma hepático de animais CCR5^{-/-} pela técnica de imunohistoquímica e menor produção de IL-10 por células do baço estimuladas *in vitro*. Mas interessante, o trabalho atual mostrou que a produção de IL-10 advinda de outras fontes foi aumentada no granuloma e no fígado de animais deficientes na produção de CCR5 e diminuída na nos animais CCL3^{-/-}. Freeman et al. (2005) e Baumgart et al. (2006) demonstraram, assim como os nossos dados, que as células T regulatórias não foram a principal origem de IL-10 no modelo de infecção de *S. mansoni*. Os resultados obtidos

mostraram que as possíveis origens de IL-10 são as células efectoras Th2 e que o possível papel regulatório exercido pelas células Treg na modulação do granuloma não é dependente exclusivamente da produção de IL-10. Apesar de demonstrarmos a redução de Treg nos granulomas de animais CCR5^{-/-}, o que provavelmente contribuiu com a exacerbação da resposta imunológica, o aumento dos níveis de IL-10 detectado nos animais CCR5^{-/-}, sugere a participação de outras vias regulatórias independentes de IL-10 no nosso modelo experimental. Baumgart et al. (2006) sugerem que a regulação da resposta imunológica pelas células Treg também possa ocorrer diretamente via controle da produção de citocinas por células efectoras, o que também não exclui a limitação da expansão das células T efectoras.

Com base nos papéis opostos de CCL3 e CCR5 observado em nossos experimentos, juntamente com provas a partir da literatura, Souza et al. (2008) propuseram um modelo em que o equilíbrio entre CCR1 e CCR5 pode ser determinante na evolução da infecção por *S. mansoni*. Este modelo baseia-se na premissa de que a ação CCL5 no receptor CCR5 favoreceria uma resposta regulada e formas mais leves da doença (Souza et al. 2008; Chensue et al, 1999; Falcão et al. 2002). Com efeito, um estudo demonstrou um maior risco de fibrose da esquistossomose em pacientes cujas células do sangue periférico respondem à estimulação através da produção de níveis intermediários de TNF- α associada à baixa CCL5, indicando um papel protetor da CCL5 (Booth et al. 2004). Acreditamos que este efeito seja mediado por ativação do receptor CCR5. Por outro lado, as formas graves da doença iriam resultar de um desequilíbrio de ativação do receptor no sentido de uma maior ativação do CCR1 mediado predominantemente por CCL3 (Falcão et al. 2002;. Souza et al. 2005; Sousa-Pereira et al. 2006; Gao et al. 1997).

Como muitas infecções por helmintos, a resposta imune contra *S. mansoni* é predominantemente do tipo 2 (Pearce & Macdonald 2002). Consequentemente M2 são a

principal subpopulação de macrófagos observadas durante a esquistossomose (Hesse et al. 2000; 2001). Na esquistossomose, os macrófagos podem estar envolvidos na polarização da resposta Th2 e na fibrogênese, bem como na regulação destes processos (Wynn & Barron 2010). Mas ao mesmo tempo, podem promover a progressão da patologia (Hesse et al. 2001; Herbert et al. 2004; Smith et al. 2004). Do sobrenadante de cultura de células CD11b⁺ isoladas de granulomas hepáticos de fase crônica não detectamos produção de nitrito em nenhum dos grupos experimentais, sugerindo falta de atividade da enzima iNOS e indicando que os macrófagos de granuloma não são do tipo M1. Por outro lado, houve atividade de ARG1 nas células CD11b⁺ isoladas de granuloma de todos os grupos experimentais, sendo que a atividade foi menor nos animais CCR5^{-/-}. Esta redução da atividade de ARG1 pode estar relacionada com a exacerbação da resposta observada neste grupo de animais, pois ARG1 expressa por macrófagos restringe a proliferação de células T *in vitro* e *in vivo*, depletando estoques extracelulares de L-arginina e limitando funções celulares (Pesce et al. 2009) e a disponibilidade destes elementos pode contribuir com a expansão celular e intensidade da resposta inflamatória. Estudos têm sugerido os M2 como importantes reguladores da resposta inflamatória. Esta hipótese é baseada na observação de que M2 expressam vários genes envolvidos na proliferação celular e síntese de colágeno, sendo o mais proeminente o da ARG-1 (Maizels et al. 2004; Hesse et al. 2000). Pesce et al. (2009) demonstraram que a ausência de atividade de ARG1 ocorre exacerbação da resposta do tipo 2, transformando a infecção letal em seu modelo de infecção experimental por *S. mansoni*. Assim, com base nos encontros de Pesce et al.(2009), no nosso modelo, a ausência de CCR5 e a redução da atividade de ARG1 pode ter causado um aumento da disponibilidade local de poliamidas, um dos motivos que podem ter contribuído com a robusta resposta inflamatória no fígado destes animais. Desta forma, o receptor CCR5 parece ser requerido para a regulação da

atividade dos M2, da resposta inflamatória e os seus efeitos patológicos. Como os níveis de IL-10 e de TGF- β no granuloma e no fígado dos animais CCR5 foram aumentados, aparentemente essa regulação da inflamação via ARG1 possa ser um mecanismo supressor primário mesmo na presença de citocinas regulatórias, assim como sugerido por Pesce et al. (2009) em seu modelo experimental de *S. mansoni*. Li et al. (2014) mostraram que o bloqueio de CCR5 estimulou a ativação alternativa de macrófagos em camundongos com lesões medulares reduzindo M1 e aumentando M2 na lesão e estimulando a recuperação motora, demonstrando a importância deste receptor na ativação dos macrófagos M2.

Os dados obtidos sugerem que a ausência de CCR5 possa interferir com a polarização de células CD11b⁺, pois camundongos deficientes na expressão deste receptor, apresentaram uma menor produção de TGF- β e menor atividade de ARG1. A atual classificação dos macrófagos em duas subpopulações distintas simplifica a complexa atividade funcional destas células e por isso subdivisões foram propostas. De acordo com Martinez & Gordon (2014), os M2 de acordo com o estímulo podem ser subdivididos em três subpopulações: M2a são ativados por IL-4 e IL-13, M2b por imuno-complexos em combinação com IL-1 ou LPS, e M2c ativados por IL-10, TGF- β ou glicocorticoides. Mosser & Edwards (2008), propuseram um agrupamento alternativo tendo em vista as três principais funções homeostáticas destas células: papel protetor, reparação tecidual e na regulação da resposta imune. Há algumas evidências da participação de CCR5 na polarização de macrófagos. Em monócitos humanos ao se diferenciarem em macrófagos teciduais observou-se perda da expressão de CCR2 e aumento da expressão de CCR1 e CCR5 (Kauffman et al. 2001). Além disso, sinais anti-inflamatórios como hormônios glicocorticoides e a citocina IL-10 aumentam a expressão de certos receptores incluindo CCR5, principalmente em M2c. Essa subpopulação de macrófagos é caracterizada pela supressão e regulação da

inflamação. Ou seja, a sinalização via CCR5 pode ativar genes relacionados ao controle da imunidade específica e da inflamação. Em ambientes inflamatórios dominados por IL-10, a expressão de receptores de quimiocinas por M2 pode ser considerada um indício da participação destes elementos na regulação da resposta inflamatória (Mantovani et al. 2004). De fato, nossos resultados mostram diferenças de ativação de células CD11b⁺ que sugerem a importância do receptor CCR5 no contexto inflamatório durante a infecção por *S. mansoni*. A maioria dos trabalhos que caracterizam os M2 se baseiam em testes *in vitro* que ignoram a natureza e o contexto do estímulo antigênico. A resposta na esquistossomose crônica é complexa com padrão misto de produção de citocinas. Levando em consideração este fato, a formação de subpopulações de macrófagos claramente definidas pode não ser possível. A ativação de macrófagos é de fato um processo dinâmico, e as mesmas células que podem fazer parte de uma reação pró-inflamatória, podem mais tarde participar na resolução do processo inflamatório e na reparação tecidual como consequência da mudança no ambiente da resposta inflamatória (Martinez et al. 2008; Mosser & Edwards 2008). Citocinas, quimiocinas e outros elementos regulam o padrão de resposta, resultando em um painel de numerosos e distintos fenótipos (Stout & Suttles 2004). Tendo em vista a possível participação de CCR5 na ativação destas células durante a infecção por *S. mansoni*, e sua importância no processo de fibrogênese e modulação da resposta inflamatória, investigações mais detalhadas serão futuramente realizadas.

5.6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS (CAPÍTULO II)

- A avaliação parasitológica demonstrou que a ausência de CCL3 e de CCR5 não alterou o número de vermes, a deposição de ovos no fígado e no intestino e o número de ovos eliminados nas fezes dos animais experimentalmente infectados por *S. mansoni*, tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção;
- A avaliação patológica demonstrou que a ausência de CCL3 não alterou a deposição de colágeno, tamanho do fígado e do intestino, mas apresentou uma redução significativa do baço em relação aos animais selvagens e aos animais deficientes na produção de CCR5. A infecção por *S. mansoni* em camundongos CCR5^{-/-} resultou em maior lesão hepática, detectada pelo aumento significativo dos níveis séricos de ALT durante a fase crônica da infecção. Além disso, nos granulomas destes animais houve uma maior deposição de colágeno e aumento significativo do intestino e do fígado;
- As principais diferenças quanto ao desenvolvimento da resposta imune entre os grupos experimentais utilizados ocorreram durante a fase crônica da infecção;
- Na fase crônica da infecção, a deposição de ovos no fígado de camundongos deficientes na produção de CCL3 induz menor produção das quimiocinas CCL11 e CXCL1. Os animais CCR5^{-/-}, apresentam uma maior produção de CCL3 e CXCL1;
- A ausência de CCL3 resultou na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-17, Th-2 IL-4, IL-13 e da citocina modulatória IL-10 em camundongos infectados por *S. mansoni*. Entretanto, animais CCR5^{-/-} apresentaram aumento de produção de citocinas do perfil Th2, especialmente IL-4, e aumento de MIF, IL-17 e IL-10 na fase crônica da esquistossomose experimental;
- Nos camundongos geneticamente deficientes na produção de CCL3 o granuloma induzido pela deposição de ovos de *S. mansoni* no fígado apresentou redução de

celularidade, especialmente linfócitos T CD3⁺CD4⁺. Já na ausência de CCR5 há um maior número de células ativadas TCD4⁺CD25⁺ e menor recrutamento células TCD4⁺CD25⁺Foxp3⁺IL-10⁺, marcadores de linfócitos regulatórios.

- Em conjunto, os dados apresentados indicam que CCL3 participa da formação do infiltrado celular inflamatório, já que na sua ausência observou-se uma menor celularidade, menor produção de quimiocinas e de citocinas durante a formação do granuloma esquistossomótico hepático. CCR5 atua na regulação negativa do processo inflamatório ao redor dos ovos de *S. mansoni*, pois a resposta inflamatória foi mais exacerbada na ausência deste receptor com aumento da produção de citocinas de diferentes perfis e menor recrutamento de células T regulatórias, além de evidências da participação de CCR5 na polarização de macrófagos M2 durante a resposta inflamatória granulomatosa.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abath FGC, Morais CNL, Montenegro CEL, Wynn TA, Montenegro SML 2006. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in Parasitology* 22: 85-91.

Adamali H, Armstrong ME, McLaughlin AM, Cooke G, McKone E, Costello CM, Gallagher CG, Leng L, Baugh JA, Fingerle-Rowson G, Bucala RJ, McLoughlin P, Donnelly SC 2012. Macrophage Migration Inhibitory Factor Enzymatic Activity, Lung Inflammation, and Cystic Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 186(2): 162-169.

Alam R, York J, Boyars M, Stafford S, Grant JA, Lee J, Forsythe P, Sim T, Ida N 1996. Increased MCP-1, RANTES, and MIP1-alpha in bronchoalveolar lavage fluid of allergic asthmatic patients. *Am J Respir Crit Care Med* 153: 1398-1404.

Algood HM & Flynn JL 2004. CCR5-deficient mice control *Mycobacterium tuberculosis* infection despite increased pulmonary lymphocytic infiltration. *J Immunol* 173: 3287-3296.

Allen SJ, Crown SE, Handel TM 2007. Chemokine: receptor structure, interactions and antagonism. *Annu Rev Immunol* 25: 787-820.

Almadi MA, Aljebreen AM, Sanai FM, Marcus V, Almeghaiseeb ES, Ghosh S 2011. New insights into gastrointestinal and hepatic granulomatous disorders. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 8(8): 455-466.

Alves Oliveira LF, Moreno EC, Gazzinelli G, Martins-Filho OA, Silveira M, Gazzinelli A, Malaquias LC, LoVerde P, Leite PM, Correa-Oliveira R 2006. Cytokine Production Associated with Periportal Fibrosis during Chronic Schistosomiasis *Mansoni* in Humans. *Infection and Immunity* 74(2): 1215-1221.

Amaral RS & Porto MAS 1994. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. *Rev Soc Bras Méd Trop* 27(3): 73-90.

Amiri P, Locksley RM, Parslow TG, Sadick M, Mckerrow JH 1992. tumor necrosis factor restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature* 356: 604-607.

Amsden AF, Boros DL, Hood AT 1980. Etiology of the liver granulomatous response in *Schistosoma mansoni* infected athymic nude mice. *Infect Immun* 27: 75-80.

Andrade ZA & Prata A 1963. Asymptomatic schistosomiasis studied by needle biopsy of the liver. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 5: 236-242.

Andrade ZA & Warren KS 1964. Mild prolonged schistosomiasis I mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 58: 53-57.

- Andrade ZA, Cheever AW 1971. Alterations of the intrahepatic vasculature in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg* 20(3): 425-432.
- Andrade ZA 1987. Pathology of human schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82(4): 17-23.
- Andrade ZA 2004. Hepatopathy Schistosomal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(1): 51-57.
- Andrade ZA 2004. Regressão da fibrose hepática. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 314-320.
- Andrade ZA 2008. Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. *Acta Trop* 20(108): 79-82.
- Andrade ZA 2009. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunology*, 31: 656-663.
- Angeli V, Faveeuw C, Roye O, Fontaine J, Teissier E, Capron A, Wolowczuk I, Capron M, Trottein F 2001. Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. *J Exp Med* 193: 1135-1147.
- Anthony RM, Rutitzky LI, Joseph F, Urban Jr, Stadecker MJ Gause WC 2007. Protective immune mechanism in helminth infection. *Nature Review Immunology* 7: 975-987.
- Anthony BJ, Ramm GA, McManus DP 2012. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. *Trends Parasitol* 28(12): 572-579.
- Araujo MI, Bacellar O, De Jesus AR, Carvalho EM 1994. The absence of gamma-interferon production of *S. mansoni* antigens in patients with schistosomiasis. *Braz J Med Biol Res* 27: 1619-1625.
- Araujo MI, De Jesus AR, Bacellar O 1996. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur J Immunol* 26: 1399-1403.
- Bach JP, Rinn B, Meyer B, Dodel R, Bacher M 2008. Role of MIF in inflammation and tumorigenesis. *Oncology* 75: 127-133
- Bacher M, Meinnhardt A, Lan HY, Mu W, Metz CN, Chesney JA, Calandra T, Gemsa D, Donnelly T, Atkins RC, Bucala R 1997. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol* 150: 235-246.
- Bahia-Oliveira LMG, Gazzinelli G, Eloi-Santos SM, Cunha-Melo JR, Alves-Oliveira LF, Silveira AMS, Viana IRC, Carmo J, Souza A, Correa-Oliveira R 1992. Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of *Schistosomiasis mansoni*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 86: 57-61.
- Balkwill F 2009. Tumour necrosis factor and cancer. *Nature Reviews* 9: 361-371.
- Bao L, Zhu Y, Zhu J, Lindgren JU 2005. Decreased IgG production but increased MIP-1beta expression in collagen-induced arthritis in C-C chemokine receptor 5-deficient mice. *Cytokine* 31(1) :64-71.
- Barbosa CS, Favre TC, Amaral RS, Pieri OS 2008. Epidemiologia e controle da Esquistossomose mansoni. In *Schistosoma mansoni & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar*. 1a edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 965-1028.

- Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Vieira LQ, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology* 78: 352-358.
- Barron L & Wynn TA 2011. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. *Eur J Immunol* 41(9): 2509-2514.
- Barron L & Wynn TA 2011. Interactions between fibroblasts, macrophages, Th2 and Th17 immunity regulate fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* doi:10.1152/ajpgi.00414.2010.
- Battaller R & Brenner DA 2005. Liver fibrosis. *J Clin Invest* 115: 209-218.
- Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M 2006. Naturally occurring CD4+Foxp3+ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. *J Immunol* 176: 5374-5387.
- Bloom BR & Bennett B 1996. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153(3731): 80-82.
- Bergquist R, Utzinger J & McManus DP 2008. Trick or treat: the role of vaccines in integrated schistosomiasis control. *PLoS Negl Trop Dis* 2: 244.
- Bernhagen J, Krohn R, Lue H, Gregory JL, Zerneck A, Koenen RR, Dewor M, Georgiev I, Schober A, Leng L, Kooistra T, Fingerle-Rowson G, Ghezzi P, Kleemann R, Mccoll SR, Bucala R, Hickey MJ, Weber C 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature Medicine* 13: 587-596.
- Bergquist R, Utzinger J & McManus DP 2008. Trick or treat: the role of vaccines in integrated schistosomiasis control. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2: 244.
- Bica I, Hamer DH, Stadecker MJ 2000. Hepatic schistosomiasis. *Infect Dis Clin North Am* 14: 583-604.
- Bina JC & Prata A 2003. Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarandi: I- *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 36(2): 211-216.
- Bloom BR & Bennett B 1996. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 153(3731): 80-82.
- Bogea T, Favre TC, Rotenberg L, Silva HS, Pieri OS 1996. Circadian pattern of cercarial emergence in *Schistosoma mansoni* (Plathelmyntes: Digenea) from isolated *Biomphalaria glabrata*. *Chronobiol Int* 13(2): 93-101.
- Bogliolo L 1958. Anatomical bases of hepatosplenic *Schistosomiasis mansoni* (the hepatosplenic form of schistosomiasis) and their clinical applications. *Resen Clin Cient* 27: 86-89.
- Booth M, Mwatha JK, Joseph S, Jones FM, Kadzo H, Ileri E, Kazibwe F, Kemijumbi J, Kariuki C, Kimani G, Ouma JH, Kabatereine NB, Vennervald BJ, Dunne DW 2004. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low INF- γ , high TNF- α or low RANTES, depending on age and gender. *J Immunol* 172: 1295-1303.

- Boros DL 1989. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* Infection. *Clinical microbiology Reviews* 2(3): 250-269.
- Boros DL, Pelley RP, Warren KS 1975. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 114:1437-1441.
- Boros DL & Warren KS 1970. Delayed Hypersensitivity-Type Granuloma Formation And Dermal Reaction Induced And Elicited By a Soluble Factor Isolated From *Schistosoma Mansoni* Eggs. *J Exp Med* 488-507.
- Bottieau E, Clerinx J, De Vega MR 2006. Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. *J Infect* 52: 339-45.
- Bozza M, Satoskar AR, Lin G, Lu B, Humbles AA, Gerard C, David JR 1999. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis. *J Exp Med* 189: 341-346.
- Brunet LR, Finkelman FD, Cheever AW, Kopf MA, Pearce EJ 1997. IL-4 protects against TNF- α -mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J Immunol* 159: 777-785.
- Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li, YS, Ellis MK, Mcmanus DP 2009. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology* 31: 163-176.
- Burke ML, McManus DP, Ramm GA, Duke M, Li Y, Jones MK, Gobert GN 2010. Temporal Expression of Chemokines Dictates the Hepatic Inflammatory Infiltrate in a Murine Model of Schistosomiasis. *Plos Negl Trop Dis* 4(2): e598.
- Butterworth AE 1994. Immunity ad morbidity in human schistosomiasis. *Tropical Geographical Medicine* 46: 197-208.
- Cairo Working Group 1992. The use of diagnostic ultrasound in schistosomiasis attempts at standardization of methodology. *Acta Trop* 51: 45-63.
- Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R 1994. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 179: 1895-1902.
- Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R 1995. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377:68-71.
- Calandra T, Echtenacher B, Roy DL, Pugin J, Metz CN, Hultner L, Heumann D, Mannel D, Bucala R, Glauser MP 2000. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* 6: 164-170.
- Calandra T & Roger T 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 791-800.

- Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LF, Silveira AM, Oliveira RC, Gazzinelli G 2008. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop* 108(2-3): 109-117
- Capron A & Dessaint JP 1985. Effector and regulatory mechanisms in immunity to schistosomes: a heuristic view. *Annals Review of Immunology* 3: 455-476.
- Carvalho EM, & Andrade ZA 2005. Imunopatologia da Esquistossomose. In: COURA, J.R. (Ed.) *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- Carvalho AT, Filho OAM, Correa-Oliveira R 2008. A Resposta Imune na Forma Crônica da Esquistossomose Mansonii. In Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar*. 1a edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.701-716.
- Cerri GG, Alves VAF, Magalhães A 1984. Hepatosplenic schistosomiasis mansoni: ultrasound manifestations. *Radiology* 153: 777-780.
- Charo IF, Ransohoff RM 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 354: 610-621.
- Cheever AW 1968. Conditions affecting accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull. World Health Organ.* 39: 328-331.
- Cheever AW, Byram JE, Hieny S, Von Lichtenberg F, Lunde MN, Sher A 1985. Immunopathology of *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* infection in B cell depleted mice. *Parasite Immunol* 7: 399-413.
- Cheever AW, Duvall RH, Hallack TAJR, Minker RG, Malley JD, Malley KG 1987. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 37(1): 85-97.
- Cheever AW, Poindexter RW, Wynn TA 1999. Egg laying is delayed but worm fecundity is normal in SCID mice infected with *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* with or without recombinant tumor necrosis factor alpha treatment. *Infect Immun* 65(5): 2201-2208.
- Cheever AW, Hoffmann KF, Wynn TA 2000. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol Today* 21: 465-466.
- Chensue SW, Warmington KS, Ruth J, Lincoln PM, Kunkel SL 1994. Cross-regulatory role for interferon- γ (IFN- γ), IL-4 and IL-10 in schistosome egg granuloma formation: in vivo regulation of Th activity and inflammation. *Clin Exp Immunol* 98: 395-400.
- Chensue SW, Warmington KS, Allenspach EJ, Lu B, Gerard C, Kunkel SL, Lukacs NW 1999. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (Type 1) and schistosomal (Type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *J Immunol* 163: 165-173.
- Chensue SW 2013. Chemokines in innate and adaptive granuloma formation. *Front Immunol* 4(43): 1-9.

- Chiaromonte, 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.
- Chiaromonte MG, Mentink-Kane M, Jacobson BA, Cheever AW, Whitters MJ, Goad ME, Wong A, Collins M, Donaldson DD, Grusby MJ, Wynn TA 2003. Regulation and function of the interleukin 13 receptor α -2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J Exp Med* 197: 687-701.
- Chiu BC & Chensue SW 2002. Chemokine responses in schistosomal antigen-elicited granuloma formation. *Parasite Immunol* 24: 285-294.
- Chiu BC, Freeman CM, Stolberg VR 2003. Cytokine chemokine networks in experimental mycobacterial and schistosomal pulmonary granuloma formation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 29: 106-116.
- Chiu BC, Freeman CM, Stolberg VR, Hu JS, Komuniecki E, Chensue SW 2004. The innate pulmonary granuloma: characterization and demonstration of dendritic cell recruitment and function. *Am J Pathol* 164(3): 1021-1030.
- Chuah C, Jones MK, Burke ML, McManus DP, Gobert GN 2014. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in Parasitology* 30(3):141-150.
- Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH 2014. Human Schistosomiasis. *The Lancet* 383(9936): 2253-2264.
- Corraliza IM, Campo ML, Soler G, Modobell M 1994. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. *J Immunol Methods* 174: 231-235.
- Corrêa-Oliveira R, Malaquias LC, Falcao PL, Viana IR, Bahia-Oliveira LM, Silveira AM, Fraga LA, Prata A, Coffman RL, Lambertucci JR, Cunha-Melo JR, Martins-FilHO OA, Wilson RA, Gazzinelli G 1998. Cytokines is a determinant of the susceptibility and resistance in human *Schistosomiasis mansoni*. *Braz. Me. Biol Res* 31: 171-177.
- Corrêa-Oliveira R, Rodrigues Caldas I, Martins-Filho OA, Carvalho Queiroz C, Lambertucci JR, Renan Cunha-Melo J, Soares Silveira A, Prata A, Wilson A, Gazzinelli G 2000. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. *Acta Trop* 77(1): 141-146.
- Coutinho AD 1990. A new dynamic approach to the diagnosis of Symmers' fibrosis on schistosomiasis by ultrasound. *Rev Inst Med Trop* 32(2): 73-77.
- Coura JR & Amaral RS 2004. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99 5: 13-19.
- Crompton DW 1999. How much human helminthiasis is there in the world? *J Parasitol* 85: 397-403.

- Curwen RS & Wilson RA 2003. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. *Trends Parasitol* 19(2): 63-66.
- Czaja AJ 2014. Review article: chemokines as orchestrators of autoimmune hepatitis and potential therapeutic targets. *Aliment Pharmacol Ther* 40(3): 261-279.
- Dairaghi DJ, Franz-Bacon K, Callas E, Cupp J, Schall TJ, Tamraz SA, Boehme SA, Taylor N, Bacon KB 1998. Macrophage inflammatory protein-1beta induces migration and activation of human thymocytes. *Blood* 91: 2905-2913.
- David JR 1966. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 56: 72-77.
- De Jesus AR, Miranda DG, Miranda RG, Araújo I, Magalhães A, Bacellar M, Carvalho EM 2000. Morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection determined by ultrasound in an endemic area of Brazil, Caatinga do Moura. *Am J Trop Med Hyg* 63(1-2): 1-4.
- De Jesus AR, Magalhães A, Miranda DG, Araujo MI, De Jesus AA, De Almeida RP, Rego MA, Burattini MN, Pearce EJ, Carvalho EM 2004. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun* 72: 3391-3397.
- De Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhães A, de Jesus AA, de Almeida RP, Rêgo MA, Burattini MN, Pearce EJ, Carvalho EM 2012. Clinical and Immunologic Evaluation of 31 Patients with Acute *Schistosomiasis mansoni*. *The Journal of Infectious Diseases* 185: 98-105.
- De Jong YP, Abadia-Molina AC, Satoskar AR, Clarke K, Rietdijk ST, Faubion WA, Mizoguchi E, Metz CN, Alsahli M, ten Hove T, Keates AC, Lubetsky JB, Farrell RJ, Michetti P, van Deventer SJ, Lolis E, David JR, Bhan AK, Terhorst C 2001. Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF. *Nature Immunology* 11: 1061-1066.
- De Oliveira CE, Oda JM, Losi Guembarovski R, de Oliveira KB, Ariza CB, Neto JS, Banin Hirata BK, Watanabe MA 2014. CC chemokine receptor 5: the interface of host immunity and cancer. *Dis Markers* 126954 doi: 10.1155/2014/126954.
- De Souza RP, Cardoso LS, Lopes GT, Almeida MC, Oliveira RR, Alcântara LM, Carvalho EM, Araujo MI 2012. Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to *Schistosoma mansoni* Infection. *J Parasitol Res* doi: 10.1155/2012/394981.
- De Waal Malefyt R, Yssel H, De Vries J E 1993. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4-T cell clones and resting T cells: specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol* 150: 4754-4765.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-666.
- Denkinger CM, Metz C, Fingerle-Rowson G, Denkinger MD, Forsthuber T 2004. Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp* 52: 389-400.

- Dessein AJ, Couissinier P, Demeure C, Rihet P, Kohlstaedt S, Carneiro-Carvalho D, Ouattara M, Goudot-Crozel V, Dessein H, Bourgois A 1992. Environmental genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*. *Immunol Invest* 21: 423-453.
- Dessein AJ, Hillaire D, Elwali NE, Marquet S, Mohamed-Ali Q, Mirghani A, Henri S, Abdelhameed AA, Saeed OK, Magzoub MM, Abel L 1999. Severe liver fibrosis in *S. mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon- γ receptor gene. *Am. J. Hum. Genet* 65: 709-721.
- Dewals BD, Marillier RG, Hoving JC, Leeto M, Schwegmann A, Brombacher F 2010. IL-4R α -Independent Expression of Mannose Receptor and Ym1 by Macrophages Depends on their IL-10 Responsiveness. *Plos Neglected Tropical Disease* 4(5): e689, 1-13.
- Doenhoff MJ 1997. A role for granulomatous inflammation in the transmission of infection disease: schistosomiasis and tuberculosis. *Parasitology* 115: 113-S115.
- Donnelly SC & Bucala R 1997. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. *Mol Med Today* 3: 502-507.
- Donnelly SC 1997. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nature Med* 3: 320-323.
- Dragic T, Litwin V, Allaway GP, Martin SR, Huang Y, Nagashima KA, Cayanan C, Maddon PJ, Koup RA, Moore JP, Paxton WA 1996. HIV-1 entry into CD4 cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381: 667-673.
- Dunne DW & Doenhoff MJ 1983. *Schistosoma mansoni* egg antigens and hepatocyte damage in infected T-cell-deprived mice. *Contrib. Microbiol Immunol* 7: 22-29.
- Dunne DW, Jones FM, Doenhoff MJ 1991. The purification, characterization, serological activity and hepatotoxic properties of two cationic glycoproteins (alpha and omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs. *Parasitology* 103(2): 225-236.
- Dunne DW, Butterworth AE, Fulford AJC, Kariuki HC, Langley JG, Ouma JH, Capron A, Pierce RJ, Strurrock RF 1992. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. *Eur J Immunol* 22: 1483-1494.
- Dunne DW & Pearce EJ 1999. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes Infect* 1: 533-560.
- Dunne DW & Cooke A 2005. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nature Review Immunology* 5: 420-426.
- Drummond SC, Silva LCS, Amaral RS, Sousa-Pereira SR, Antunes CM, Lambertucci JR 2006. Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(1): 37-44.
- Drummond SC, Pereira SRS, Silva LCS, Antunes CM, Lambertucci JR 2010. Schistosomiasis control program in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105(4): 519-523.

- Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM 2006. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol* 80: 1298-1307.
- Fairfax KC, Amiel E, King IL, Freitas TC, Mohrs M, Pearce EJ 2012. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. *PLoS Pathog* 8(1): e1002490.
- Falcão PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A, Gazzinelli G, Coffman RL, Correa-Oliveira R 1998. Human *Schistosomiasis mansoni*: IL-10 modulates the *in vitro* granuloma formation. *Parasite Immunol* 20: 447-454.
- Falcão PL, Correa-Oliveira R, Fraga LA, Tavani A, Proudffot AEI, Wells TNC, Williams TJ, Jose PJ, Teixeira MM 2002. Plasma concentrations and role of macrophage inflammatory protein-1 α during chronic *Schistosoma mansoni* infection in humans. *J Infect Dis* 186: 1696-1700.
- Fallon PG & Dunne DW 1999. Tolerization of Mice to *Schistosoma mansoni* Antigens Causes Elevated Type 1 and Diminished Type 2 Cytokine Responses and Increased Mortality in Acute Infection. *The Journal of Immunol* 162: 4122-4132.
- Fallon PG 2000. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and man. *Immunol Today* 1: 29-35.
- 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.
- Fernandes JS, Araujo MI, Lopes DM, de Souza Rda P, Carvalho EM, Cardoso LS 2014. Monocyte Subsets in Schistosomiasis Patients with Periportal Fibrosis. 703653. doi: 10.1155/2014/703653.
- Finkelstein JL, Schleinitz MD, Carabin H, McGarvey ST 2008. Decision-model estimation of the age-specific disability weight for schistosomiasis japonica: a systematic review of the literature. *Plos Negl Trop Dis* 2(3): e158.
- Freeman CM, Chiu BC, Stolberg VR, Hu J, Zeibecoglou K, Lukacs NW, Lira SA, Kunkel SL, Chensue SW 2005. CCR8 is expressed by antigen-elicited, IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ T cells, which regulate Th2-mediated granuloma formation in mice. *J Immunol* 174: 1962-1970.
- Gao JL, Wynn TA, Chang Y, Lee EJ, Broxmeyer HE, Cooper S, Tiffany HL, Wespahl, H, Kwon-Chung J, Murphy PM 1997. Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation, and type 1–type 2, cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J Exp Med* 185: 1959-1968.
- Gazzinelli G, Lambertucci JR., Katz N, Rocha RS, Lima MS, Colley DG 1985. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. Immunological status of patients with acute infection after treatment. *J Immunol* 135: 2121-2127.
- Gentile R, Costa-Neto SF, Gonçalves MML, Bonecker ST, Fernandes, FA, Garcia JS, Barreto MGM, Soares MS, Andrea PSD, Peralta JM, Rey L 2006. An ecological field study of the water-

rat *Nectomys squamipes* as a wild reservoir indicator of *Schistosoma mansoni* transmission in an endemic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101(I): 111-117.

Gomes LI, Enk MJ, Rabello, A 2013. Diagnosing schistosomiasis: where are we? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0231>.

Gonçalves MM, Barreto MG, Peralta RH, Gargioni C, Gonçalves T, Igreja RP, Soares MS, Peralta JM 2006. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. *Acta Tropica* 100 (1-2): 24-30.

Gonzalez J, Mouttalib S, Delage C, Calise D, Maoret JJ, Pradère JP, Klein J, Buffin-Meyer B, Van der Veen B, Charo IF, Heeringa P, Duchene J, Bascands JL, Schanstra JP 2013. Dual effect of chemokine CCL7/MCP-3 in the development of renal tubulointerstitial fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 438(2): 257-263.

Goodridge HS, Marshall FA, Wilson EH, Houston KM, Liew FY, Harnett MM, Harnett W 2004. *In vivo* exposure of murine dendritic cell and macrophage bone marrow progenitors to the phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein ES-62 polarizes their differentiation to an anti-inflammatory phenotype. *Immunology* 113: 491-498.

Gordon S 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.

Gordon S, Martinez FO 2010. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 28: 32(5): 593-604.

Gordon S, Hamann J, Lin HH, Stacey M 2011. F4/80 and the related adhesion-GPCRs. *Eur J Immunol* 41: 2470-2525.

Green AP, Mangan F, Ormerodo JE 1980. Induction of cell infiltration and acid hydrolase release into the peritoneal cavity of mice. *Inflammation* 4: 205-213.

Grenfell RF, Martins W, Enk M, Almeida A, Siqueira L, Silva-Moraes V, Oliveira E, Carneiro NF, Coelho PM 2013. *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108(3): 328-334.

Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L 2006. Human schistosomiasis. *Lancet* 368: 1106-1118.

Gryseels B 2012. Schistosomiasis. *Infect Dis Clin N Am* 26: 383-397.

Hams E, Aviello G, Fallon PG 2013. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Frontiers in Immunology* 4:doi 10.3389/fimmu.2013.00089.

Hagan P, Blumenthal UJ, Dunne DW, Simpson AJG, Wilkins HA 1991. Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. *Nature* 6306: 243-245.

- Haseeb MA, Shirazian DJ, Preis J 2001. Elevated serum levels of TNF- α , sTNF-RI and sTNF-RII in murine schistosomiasis correlate with schistosome oviposition and circumoval granuloma formation. *Cytokine* 15(5): 266-269.
- Hatz C, Jenkins JM, Ali QM, Abdel-Wahab MF, Cerri GG, Tanner M 1992. A review of the literature on the use of ultrasonography in schistosomiasis with special reference to its use in field studies. 2. *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop* 51(1): 15-28.
- Hatz CF 2001. The use of ultrasound in schistosomiasis. *Adv Parasitol* 48: 225-284.
- Heinrichs D, Knäuel M, Offermanns C, Berres ML, Nellen A, Leng L, Schmitz P, Bucala R, Trautwein C, Weber C, Bernhagen J, Wasmuth HE 2011. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) exerts antifibrotic effects in experimental liver fibrosis via CD74. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(42):17444-9. doi: 10.1073/pnas.1107023108.
- Henri S, Chevillard C, Mergani A, Paris P, Gaudart J, Camilla C, Dessein H, Montero F, Elwali NE, Saeed OK, Magzoub M, Dessein AJ 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. *Journal of Immunology* 169: 929-936.
- Herbert DR, Holscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, Claussen B, Forster I, Brombacher F 2004. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20: 623-635.
- Hermann E, Wasmuth MD, Frank Tacke MD, Christian TMD 2010. Chemokines in Liver Inflammation and Fibrosis. *Seminars In Liver Disease* 30(3): 215-225.
- Hernandez HJ, Wang Y, Zellas N, Stadecker MJ 1997. Expression of class II, but not class I, major histocompatibility complex molecules is required for granuloma formation in infection with *Schistosoma mansoni*. *Eur J Immunol* 27: 1170-1176.
- Hernandez-Pando R, Rook GAW 1994. The role of TNF-cx in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology* 82: 591-595.
- Hesse M, Cheever AW, Jankovic D, Wynn TA 2000. NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. *Am J Pathol* 157(3): 945-955.
- Hesse M, Modovell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA 2001. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1 type 2 cytokines *in vivo*: granulomas pathology is shaped by the pattern of l-arginase metabolism. *J Immunol* 167: 6533-6544.
- Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA 2004. The Pathogenesis of Schistosomiasis Is Controlled by Cooperating IL-10-Producing Innate Effector and Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology* 172: 3157-3166.

Hiatt RA 1979. Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *Journal of Infectious Diseases* 3: 659-666.

Hoffmann KF, Caspar P, Cheever AW, Wynn TA 1998. IFN-gamma, IL-12, and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. *J Immunol* 161(8): 4201-4210.

Hoffman KF, Cheever AW, Wynn TA 2000. IL-10 and the dangers of immune polarization: Excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J Immunol* 164: 6406-6416.

Hokke CH & Yazdanbakhsh M 2005. Schistosome glycans and innate immunity. *Parasite Immunol.* 27: 257-264.

Homeida M, Ahmed S, DaFalla AA, Suliman S, Eltom I, Nash TE, Bennett JL 1988. Morbidity associated with *Schistosoma mansoni* infection as determined by ultrasound: a study in Gezira, Sudan. *Am J Trop Med Hyg*: 39: 196-201.

Ishida Y, Kimura A, Kondo T, Hayashi T, Ueno M, Takakura N, Matsushima K, Mukaida N 2007. Essential roles of the CC chemokine ligand 3-CC chemokine receptor 5 axis in bleomycin induced pulmonary fibrosis through regulation of macrophage and fibrocyte. *Am J Pathol* 170(3): 843-854.

Jakubzick C, Wen H, Matsukawa A, Keller M, Kunkel SL, Hogaboam CM 2004. Role of CCR4 ligands, CCL17 and CCL22, during *Schistosoma mansoni* egg induced pulmonary granuloma formation in mice. *Am J Pathol* 165(4): 1211-1221.

Jankovic D, Kullberg MC, Noben-Trauth N, Caspar P, Ward JM, Cheever AW, Paul E, Sher A 1999. Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. *J Immunol* 163: 337-342.

Jia TW, Zhou XN, Wang XH, Utzinger J, Steinmann, Wu XH 2007. Assessment of the age-specific disability weight of chronic schistosomiasis japonica. *Bull World Health Organ* 85: 458-465.

Joseph AL, Boros DL 1993. Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *J Immunol* 151(10): 5461-5471.

Kabatereine NB, Vennervald BJ, Ouma JH, Kemijumbi J, Butterworth AE, Dunne DW, Fulford AJ 1999. Adult resistance to *Schistosomiasis mansoni*: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. *Parasitology* 118: 101-105.

Kane CM, Cervi L, Sun J, McKee AS, Masek KS, Shapira S, Hunter CA, Pearce EJ 2004. Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. *J Immunol* 173: 7454-7461.

Kaplan MH, Whitfield JR, Boros DL, Grusby MJ 1998. Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. *J Immunol* 160: 1850-1856.

- Karanja DM, Colley DG, Nahlen BL, Ouma JH, Secor WE 1997. Studies on schistosomiasis in western Kenya. Evidence for immune-facilitated excretion of schistosome eggs from patients with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus co-infection. *Am J Med Hyg* 56: 515-521.
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J 1972. A simple device for quantitative stool Thick-Smear Technique for Schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 14(6): 397-400.
- Katz N 1998. Schistosomiasis control in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 93: 33-35.
- Katz N, Peixoto SV 2000. Critical analysis of the estimated number of schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical* 33(3): 303-308.
- Kaufmann A, Salentin R, Gerns D, Sprenger H 2001. Increase of CCR1 and CCR5 expression and enhanced functional response to MIP-1a during differentiation of human monocytes to macrophages. *J Leukoc Biol* 69: 248-252.
- Khan IA, Thomas SY, Moretto MM, Lee FS, Islam SA, Combe C, Schwartzman JD, Luster AD 2006. CCR5 is essential for NK cell trafficking and host survival following *Toxoplasma gondii* infection. *PLoS Pathog* 2(6): e49.
- Kheir MM, Eltoun IA, Saad AM, Ali MM, Baraka OZ, Homeida MM 1999. Mortality due to schistosomiasis mansoni: a field study in Sudan. *Am J Trop Med Hyg* 60(2): 307-310.
- King CL, Malhotra I, Mungai P, Wamachi A, Kioko J, Ouma JH, Kzura JW 1998. B-cell sensitisation to helminthic infection develops *in utero* in humans. *J Immunol* 160: 3578-3584.
- King CH, Dickman K, Tisch DJ 2005. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet* 365: 1561-1569.
- King CH, Dangerfield-Cha M 2008. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illn* 4: 65-79.
- Kitani A, Fuss I, Nakamura K, Kumaki F, Usui T, Strober W 2003. Transforming growth factor (TGF)-beta1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF-beta1-mediated fibrosis. *J Exp Med* 198: 1179-1188.
- Kopf M, Le Gros G, Bachmann M, Lamers MC, Bluethmann H, Kohler G 1993. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 352: 245-248.
- Lacerda CM, Freire W, Vieira De Melo PS, Lacerda HR, Carvalho G 2002. Splenectomy and ligation of the left gastric vein in schistosomiasis mansoni: the effect on esophageal vericeal pressure measured by a non-invasive technique. *Keio J Med* 51(2): 89-92.
- Lagasse E, Weissman IL 1996. Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. *J Immunol Methods* 197(1-2):139-150.
- Lambertucci JR, Jordan P, Weber G, Surrock RF 1993. *Schistosoma mansoni*: Pathological and clinical aspects. In: (Eds) Human Schistosomiasis. Wallingford: Cab. International, p.195-235.

- Lambertucci JR, Gerspacher-Lara R, Pinto-Silva RA, Barbosa MM, Teixeira R, Barbosa HF, Serufo JC, Rezende DF, Drummond SC, Rayes AAM 1996. O projeto Queixadinha: a morbidade e o controle da esquistossomose em área endêmica no nordeste de Minas Gerais, Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 29: 127-135.
- Lambertucci JR, Serufo JC, Gerspacher-Lara R, Rayes AAM, Teixeira R, Nobre V, Antunes CM 2000. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Trop* 77: 101-109.
- Lambertucci JR, Cota GF, Pinto-Silva RA, Serufo JC, Gerspacher-Lara R, Drummond SC, Antunes CM, Nobre V, Rayes A 2001. Hepatosplenic Schistosomiasis in Field-based Studies: a Combined Clinical and Sonographic Definition. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96(1): 147-150.
- Lantz M, Guilberg U, Nilsson E, Olsson I 1990. Characterization In Vitro of a Human Tumor Necrosis Factor-binding Protein A Soluble Form of a Tumor Necrosis Factor Receptor. *J Clin Invest* 86: 1396-1402.
- Leal Neto OB, Galvão TYC, Esteves FAM, Gomes AMAS, de Souza Gomes EC, de Araújo KCGM, Barbosa CS 2012. Spatial analysis of schistosomiasis human cases in the horticultural community of Zona da Mata of Pernambuco state, Brazil. *Rev Bras Epidemiol* 15: 771-780.
- Lenzi HL, Lenzi JA, Sobral AC 1987. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. *Braz J Med Biol Res* 20: 433-435.
- Lenzi HL, Lenzi JA, Kerr IB, Antunes SL, Mota EM, Oliveira DN 1991. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 86(III): 77-90.
- Lenzi HL, Jurberg AD, Coelho PMZ, Lenzi JA 2008a. Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no Hospedeiro Definitivo. In Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar. 1ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.85-146
- Lenzi HL, Romanha WS, Machado MP, Mota EM, Lenzi JA. Patologia Experimental com Enfoque o Granuloma Esquistossomótico 2008b. In Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar. 1ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, p.569-654.
- Lenzi HL, Kimmel E, Schoechtman H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco RS, Mariano M, Lenzi JA 1998. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93(1): 141-51.
- Lue H, Kleeman R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanism of action and role in disease, *Microbes and Infection* 4: 449-460.
- Li F, Cheng B, Cheng J, Wang D, Li H, He X 2014. Blockade Promotes M2 Macrophage Activation and Improves Locomotor Recovery After Spinal Cord Injury in Mice. Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P. *Inflammation* doi: 10.1007/s10753-014-0014-z.

- Liu T, Dhanasekaran SM, Jin H, Hu B, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Phan SH 2004. FIZZ1 stimulation of myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* 164(4): 1315-1326.
- Lukacs NW, Kunkel SL, Strieter RM, Warmington K, Chensue SW 1993. The role of macrophage inflammatory protein-1 alpha in *Schistosoma mansoni* egg induced granulomatous inflammation. *J Exp Med* 177: 1551-1559.
- Lukacs NW, Chensue SW, Strieter RM, Warmington K, Kunkel SL 1994. Inflammatory granulomas formation is mediated by TNF-alpha-inducible intercellular adhesion molecule-1. *The Journal of Immunology* 152: 5883-5889.
- Lukacs NW, Standiford TJ, Chensue SW, Kunkel RG, Strieter RM, Kunkel SL 1996. C-C chemokines-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *J Leukoc Biol* 60: 573-578.
- Lundy SK, Lukacs NW 2013. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Front Immunol* 4: 39 doi: 10.3389.
- Macdonald AS, Straw AD, Bauman B, Pearce EJ 2001. CD8-dendritic-cell activation status plays an integral role in influencing th2 response development. *J Immunol* 167: 1982-1988.
- Macdonald AS, Araujo MI, Pearce EJ 2002. Immunology of parasitic helminth infections, *Infection and Immunity* 70: 427-433.
- Macdonald AS, Patton EA, Flamme AC, Araujo MI, Huxtable CR, Bauman B, Pearce EJ 2002. Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction. *J Immunol* 168: 4643-4649.
- Machado MM, Rosa ACF, Oliveira IRS, Cerri GG 2002. Aspectos ultra-sonográficos da esquistossomose hepatoesplênica. *Radiol Bras* 35(1): 41-45
- Machado FS, Koyama NS, Carregaro V, Ferreira BR, Milanezi CM, Teixeira MM, Rossi MA, Silva JS 2005. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis* 191: 627-636.
- Mackay CR 2001. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2: 95-101.
- Magalhães A, Miranda DG, Miranda RG, Araújo MI, de Jesus AA, Silva A, Santana LB, Pearce E, Carvalho EM, de Jesus AR 2004. Cytokine Profile Associated with Human Chronic Schistosomiasis Mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(I): 21-26.
- Magalhães ES, Mourao-Sa DS, Vieira-De-Abreu A, Figueiredo RT, Pires AL, Farias-Filho FA, Fonseca BP, Viola JP, Metz C, Martins MA, Castro-Faria-Neto HC, Bozza P T, Bozza MT 2007. Macrophage migration inhibitory factor is essential for allergic asthma but not for Th2 differentiation. *Eur J Immunol* 37: 1097-1106.
- Mailzels RM & Yazdanbakhsh M 2003. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews immunology* 3: 733-744.
- Maizels RM, Balic A, Gomez-Escobar N, Nair M, Taylor MD, Allen JE 2004. Helminth parasites-masters of regulation. *Immunological Reviews* 201: 89-116.

- Malaquias LCC, Falcão PL, Silveira AMS, Gazzinelli G, Prata A, Coffmann RL, Pzziolo VR, Corrêa-Oliveira R 1997. Cytokine regulation of human response to *Schistosoma mansoni*: I. Analysis of the role of IL-4, IL-5, and IL-10 on peripheral blood mononuclear cells responses. *Scand. J Immunol* 46: 304-311.
- Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P 2001. Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol* 22(6): 328-336.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25(12): 677-686.
- Marra RF & Tacke F 2014. Roles for Chemokines in Liver Disease. *Gastroenterology* 147: 577-594.
- Marra F, Aleffi S, Galastri S, Provenzano A 2009. Mononuclear cells in liver fibrosis. *Seminars in Immunopathology* 31(3): 345-358.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M 2008. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience* 13: 453-461.
- Martinez FO & Gordon S 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000 Prime Rep.* 6: 13 doi: 10.12703.
- McManus DP & Loukas A 2008. Current status of vaccines for schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev* 21: 225-242.
- McKenzie GJ, Fallon PG, Emson CL, Grecis RK, McKenzie AN 1999. Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type2-mediated responses. *J Exp Med* 189: 1565-1572.
- Meng F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D, Cong M, Iwaisako K, Liu X, Zhang M, Osterreicher CH, Stickel F, Ley K, Brenner DA, Kisseleva T. 2012. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 143: 765-776.
- Menten P, Wuyts A, Van Dame J 2002. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev* 13: 455-481.
- Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R 1999. Sustained Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) and Cytoplasmic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor. *The Journal of Biological Chemistry* 274: 18100-18106.
- Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 345-350.
- Modena CM, Lima WS, Coelho PMZ 2008. Wild and domesticated animals as reservoirs of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Acta Tropica* 108: 242-244.

- Mohamed-Ali Q, Elwali NE, Abdelhameed AA, Mergani A, Rahoud S, Elagib KE, Saeed OK, Abel L, Magzoub MM, Dessein AJ 1999. Susceptibility to Periportal (Symmers) Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infections: Evidence That Intensity and Duration of Infection, Gender, and Inherited Factors Are Critical in Disease Progression. *The Journal of Infectious Diseases* 180: 1298-1306
- Montenegro SM, Miranda P, Mahanty S, Abath FG, Teixeira KM, Coutinho EM, Brinkman J, Gonçalves I, Domingues LA, Domingues AL, Sher A, Wynn TA 1999. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the crossregulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J Infect Dis* 179: 1502-1514.
- Moore DL, Grove DI, Warren KS 1977. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantification of cell populations. *J Pathol* 121: 41-50.
- Moore K, de Waal Malefyt R, Coffman R, O'Garra A 2001. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.
- Morais CNL, Souza JR, Melo WG, Aroucha ML, Domingues ALC, Wynn T, Abath FGC, Montenegro SML 2002. Studies on the production and regulation of interleukin, IL-13, IL-4 and Interferon- γ in human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 113-114.
- Morais CNL, Souza JR, Melo WG, Aroucha ML, Miranda P, Coutinho Domingues AL, Abath FGC, Montenegro SML 2008. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(6): 561-568.
- Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P, 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25(2): 75-84.
- Mosser DM 2003. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73: 209-212.
- Mosser DM & Edwards JP 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Rev Immunol* 8: 958-969.
- Mueller A & Strange PG 2004. The chemokine receptor, CCR5. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36: 35-38.
- Murray PJ & Wynn TA 2011. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 11(11): 723-737.
- Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52(1): 145-176.
- Mwatha JK, Kimani G, Kamau T, Mbugua GG, Ouma JH, Mumo J, Fulford, AJ, Jones FM, Butterworth AE, Roberts MB, Dunne DW 1998. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN- γ , but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 160: 1992-1999.

- Nakajima H, Takagi H, Horiguchi N, Toyoda M, Kanda D, Otsuka T, Emoto Y, Emoto M, Mori M 2006. Lack of macrophage migration inhibitory factor protects mice against concanavalin A-induced liver injury. *Liver Int* 26(3): 346-351.
- Negrão-Corrêa D, Fittipaldi JF, Lambertucci JR, Teixeira MM, Antunes CM, Carneiro M 2014. Association of *Schistosoma mansoni*-Specific IgG and IgE Antibody Production and Clinical Schistosomiasis Status in a Rural Area of Minas Gerais, Brazil. *Plos One* 4;9(2):e88042. doi: 10.1371/journal.pone.0088042.
- Negrão-Corrêa D, Souza DG, Pinho V, Barsante MM, Souza AL, Teixeira MM 2004. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. *Infection and Immunity* 72: 1135-1142.
- Niamey Working Group 2000. Ultrasound in schistosomiasis. A practical guide to the standardized use of ultrasonography for the assessment of schistosomiasis related morbidity. Geneva, Switzerland.
- Nibbs RJ, Wylie SM, Pragnell IB, Graham GJ 1997. Cloning and characterization of a novel murine beta chemokine receptor, D6. Comparison to three other related macrophage inflammatory protein-1 α receptors, CCR1, CCR3, and CCR5. *J Biol Chem* 272: 12495-12504.
- Ohmori YL, Wyner S, Marumi D, Armstrong M, Stoler TA 1993. Tumor necrosis factor- α induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokine in vivo. *Am J Pathol* 142: 861-870.
- Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Abe M, Harn DA Jr 1999. Induction of TH2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J Immunol* 163: 6712-6717.
- Okano M, Satoskar AR, Nishizaki K, Harn DA 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.
- Oliveira DM, Silva-Teixeira DN, Gustavson S, Oliveira SM, Goes AM 2000. Nitric oxide interaction with IL-10, MIP-1 α , MCP-1 and RANTES over the in vitro granuloma formation against different *Schistosoma mansoni* antigenic preparations on human schistosomiasis. *Parasitology* 120(4): 391-398.
- Olson TS, Ley K 2002. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 283: R7-28.
- Ong VH, Carulli MT, Xu S, Khan K, Lindahl G, Abraham DJ, Denton CP 2009. Cross-talk between MCP-3 and TGF- β promotes fibroblast collagen biosynthesis. *Exp Cell Res* 315: 151-161.
- Ozaki T, Kumagai M, Inaba T, Soto H, Ito M, Kamiya H 1997. Features of *Schistosoma mansoni* infection in SCID mice. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 28(4): 838-843.
- Paraense WL 2001. The schistosome vectors in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 7-16.

- Park MK, Hoffmann KF, Cheever AW, Amichay D, Wynn TA, Farber JM 2001. Patterns of chemokine expression in models of *Schistosoma mansoni* inflammation and infection reveal relationships between type 1 and type 2 responses and chemokines *in vivo*. *Infect Immun* 69: 6755-6768.
- Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Experimental Medicine* 173: 159-166.
- Pearce EJ & Macdonald AS 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Rev Immunol* 2: 499-511.
- Pearce EJ, Kane CM, Sun J, Taylor JJ, Mckee AS, Cervi L 2004. Th2 response polarization during infection with helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological Reviews* 207: 117-126.
- Pearce EJ 2005. Priming of the immune response by schistosome eggs. *Parasite Immunol* 27: 265-270.
- Pellegrino J, Macedo DG 1955. A simplified method for concentration of cercarial. *J Parasitol* 41: 306-309.
- Pellegrino J & Siqueira AF 1956. Técnica de perfusão para colheita de *S. mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev Brás Malariol Doenças Trop* 8: 585-597.
- Pellegrino J & Katz N 1968. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *Adv Parasitol* 41:233-290.
- Pereira FEL, Bogliolo L 2000. Inflamações. In Bogliolo L, Brasileiro Filho G. *Patologia*, 6 edição. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.112-148.
- Perona-Wright G, Jenkins SJ, Macdonald AS 2006. Dendritic cell activation and function in response to *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* 36: 711-721.
- Perry CR, Burke ML, Stenzel DJ, McManus DP, Ramm GA, Gobert GN 2011. Differential expression of chemokine and matrix re-modelling genes is associated with contrasting schistosome-induced hepatopathology in murine models. *PLoS Negl Trop Dis* 5(6):e1178. doi: 10.1371/journal.pntd.0001178
- Pesce J, Kaviratne M, Ramalingam TR, Thompson RW, Urban JR JF, Cheever AW, Young DA, Collins M, Grusby MJ, Wynn TA 2006. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *The Journal of Clinical Investigation* 116(7): 2044-2055.
- Pesce J, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, Smith AM, Thompson RW, Cheever AW, Murray PJ, Wynn TA 2009. Arginase-1-Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine-Driven Inflammation and Fibrosis. *PLoS Pathog* 5(4): e1000371.
- Polman K, Stelma FF, Le Cessie S, De Vlas SJ, Falcaõ Ferreira ST, Talla I, Deelder AM, Gryseels B 2002. Evaluation of the patterns of *Schistosoma mansoni* infection and re-

infection in Senegal, from faecal egg counts and serum concentrations of circulating anodic antigen. *Ann Trop Med Parasitol* 96: 679-689.

Ponath PD, Qin S, Post TW, Wang J, Wu L, Gerard NP, Newman W, Gerard C, Mackay CR 2006. Molecular cloning and characterization of a human eotaxin receptor expressed selectively on eosinophils. *J Exp Med* 183(6): 2437-2448.

Post TW, Bozic CR, Rothenberg ME, Luster AD, Gerard N, Gerard C 1995. Molecular characterization of two murine eosinophil beta chemokine receptors. *J Immunol* 155: 5299-5305.

Prata A & Andrade ZA 1963. Fibrose de Symmers sem esplenomegalia. *O Hospital* 63: 617-623.

Prata A, Bina JC 1968. Development of hepatosplenic form of schistosomiasis: a study of 20 patients observed during a 5-year period. *Gaz Med Bahia* 68: 49-60.

Prata A 1992. Influence of host related factors in the development of the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87(4): 39-44.

Qadir K, Metwali A, Blum AM, Li J, Elliott DE, Weinstock JV 2001. TGF-beta and IL-10 regulation of IFN-gamma produced in Th2-type schistosome granulomas requires IL-12. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 281: G940G946.

Qiu B, Frait KA, Reich F, Komuniecki E, Chensue SW 2001. Chemokine expression dynamics in mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *Am J Pathol* 158: 1503-1515.

Ragheb S & Boros, DL 1989. Characterization of Granuloma T Lymphocyte Function from *Schistosoma mansoni* infected mice. *The Journal of Immunology* 142(9): 3239-3246.

Ramadan E, Ramadan MEE, Shafik MY 2013. Role of TNF alpha in schistosoma mansoni infection and cirrhotic liver. *International Journal of Pharmaceutical and Medical Research* 1(1):6-12.

Ramalingan TR, Pesce JT, Sheik F, Cheever AW, Mentink-Kane MM, Wilson MS, Stevens S, Valenzuela DM, Murphy AJ, Yancopoulos GD, Urban Jr JF, Donnelly RP, Wynn TA 2008. Unique functions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receptor α 1 chain. *Nature Immunology* 9: 25-33.

Raso P, Pedroso ERE 1987. Esquistossomose mansônica. In Bogliolo L, Lopes ER, Chapadeiro E, Raso P, Tafuri WL. *Patologia*, 4a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1065-1086.

Raso P, Pedroso RPE, Neves J 1986. Patologia da forma aguda toxêmica, da esquistossomose mansoni. *Ver Soc Bras Med Trop* 19: 45-55.

Raso P & Neves J 1965. Contribuição ao conhecimento do quadro anatômico do fígado na forma toxêmica da esquistossomose mansoni através de punções e biópsias. *Ann Fac Med UFMG* 22: 147-165.

Reiman RM, Thompson RW, Feng CG, Hari D, Knight R, Cheever AW 2005. Interleukin- 5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect Immun* 74: 1471-1479.

- Richter J, Domingues ALC, Barata CH, Prata AR, Lambertucci JR 2001. Report of the Second Satellite Symposium on Ultrasound in Schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo* 96: 151-156.
- Richter J 2000. Evolution of schistosomiasis-induced pathology after therapy and interruption of exposure to schistosomes: a review of ultrasonographic studies *Acta Tropica* 77: 111-131.
- Rodrigues JL 2009. Influência da produção do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) na evolução da infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Parasitologia 158 pp.
- Ross AG, Vickers D, Olds GR, Shah SM, McManus DP 2007. Katayama Syndrome. *Lancet Infect Dis* 7(3): 218-224.
- Ross AG, Bartley PB, Sleigh AC 2002. Schistosomiasis. *N Engl J Med* 346: 1212-1220.
- Ruth JH, Lukacs NW, Warmington KS, Polak TJ, Burdick M, Kunkel SL, Strieter RM, Chensue SW 1998. Expression and participation of eotaxin during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen elicited granuloma formation. *J Immunol* 161: 4276-4282.
- Rutitzky LI, Lopes da Rosa JR, Stadecker MJ 2005. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *J Immunol* 175(6): 3920-3926.
- Rutitzky LI & Stadecker MJ 2006. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 327-330.
- Rutitzky LI, Hernandez HJ, Stadecker MJ 2001. Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection. *PNAS* 98(23): 13243-13248.
- Sabin EA & Pearce EJ 1995. Early IL-4 production by non- CD4+ cells at the site of antigen deposition predicts the development of a T helper 2 cell response to *Schistosoma mansoni* eggs. *J Immunol* 155: 4844-4853.
- Sabin EA, Kopf MA, Pearce EJ 1996. *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J Exp Med* 184: 1871-1878.
- Sahin H & Wasmuth HE 2013. Chemokines in tissue fibrosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1832: 1041-1048.
- Sánchez-Zamora YI, Rodriguez-Sosa M, 2014. The Role of MIF in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* 804519: doi 10.1155/2014/804519.
- Schramm G, Mohrs K, Wodrich M, Doenhoff MJ, Pearce EJ, Haas H, Mohrs M 2007. Cutting edge: IPSE/alpha-1, a glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, induces IgE-dependent, antigen-independent IL-4 production by murine basophils *in vivo*. *J Immunol* 178: 6023-6027.
- Schlecker E, Stojanovic A, Eisen C, Quack C, Falk CS, Umansky V, Cerwenka A 2012. Tumor-infiltrating monocytic myeloid-derived suppressor cells mediate CCR5-dependent recruitment of regulatory T cells favoring tumor growth. *J Immunol* 189(12): 5602-5611.

Scholte RG, Carvalho OS, Malone JB, Utzinger J, Vounatsou P 2012. Spatial distribution of *Biomphalaria* spp., the intermediate host snails of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Geospat Health* 6: S95-S101.

Scholte RG, Gosoniu L, Malone JB, Chammartin F, Utzinger J, Vounatsou P 2014. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. *Acta Tropica* 132: 57-63.

Schuh JM, Blease K, Hogaboam CM 2002. The role of CC chemokine receptor 5 (CCR5) and RANTES/CCL5 during chronic fungal asthma in mice. *FASEB J* 16: 228-230.

Seki E, De Minicis S, Gwak GY, Kluwe J, Inokuchi S, Bursill CA, Llovet JM, Brenner DA, Schwabe RF 2009. CCR1 and CCR5 promote hepatic fibrosis in mice. *J Clin Invest* 119(7): 1858-1870.

Seki , Kumagai T, Kwansa-Bentum B, Furushima-Shimogawara R, Anyan WK, Miyazawa Y, Iwakura Y, Ohta N 2012. Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 suppress excessive neutrophil infiltration and hepatocyte damage during acute murine schistosomiasis japonica. *Infect Immun* 80(1): 159-68.

Shahat SA, El-Dhshan MA, Aissa SS, Dorra A, Metwally KM 2007. Flowcytometric analysis of T-lymphocytes and serum tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) levels in *Schistosoma mansoni* patients. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology* 37(3): 1065-1074.

Shang XZ, Chiu BC, Stolberg V, Lukacs NW, Kunkel SL, Murphy HS, Chensue SW 2002. Eosinophil recruitment in type-2 hypersensitivity pulmonary granulomas: source and contribution of monocyte chemotactic protein-3 (CCL7). *Am J Pathol* 161: 257-266.

Shi X, Leng L, Wang T, Wang W, Du X, Li J, McDonald C, Chen Z, Murphy JW, Lolis E, Noble P, Knudson W, Bucala R 2006. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 25: 595-606

Silva LM, Ribeiro-Dos-Santos R, Soares MB, Andrade ZA 2006. Characterization of the vascular changes in schistosomal portal (pipestem) fibrosis of mice. *Acta Trop* 98(1): 34-42.

Silva A, Santana LB, Jesus AR 2008. A Resposta Imune na Forma Aguda da Esquistossomose Mansoni. In Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL, *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar. 1ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz.

Silva-Teixeira DN, Contigli C, Lambertucci JR, Serufo JC, Rodrigues V 2004. Gender-related cytokine patterns in sera of schistosomiasis patients with symmers' fibrosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 11(3): 627-630.

Silveira-Lemos D, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Souza-Soares AL, Castro-Silva P, Costa-Silva MF, Guimarães PH, Ferraz HB, Oliveira-Fraga LA, Teixeira MM, Corrêa-Oliveira R 2010. Seric chemokines and chemokine receptors in eosinophils during acute human schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 380-386.

Silveira MR, Nunes KP, Cara DC, Souza DG, Corrêa Jr A, Teixeira MM, Negrão-Corrêa D 2002. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic

inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infection and Immunity* 70: 6263-6272.

Siqueira LM, Coelho PM, Oliveira ÁA, Massara CL, Carneiro NF, Lima AC, Enk MJ 2011. Evaluation of two coproscopic techniques for the diagnosis of schistosomiasis in a low-transmission area in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 106(7): 844-850

Smith P, Walsh CM, Mangan NE, Fallon RE, Sayers JR, McKenzie AN, Fallon PG 2004. *Schistosoma mansoni* worms induce anergy of T cells via selective upregulation of programmed death ligand 1 on macrophages. *J Immunol* 173(2): 1240-1248.

Smith P, Fallon RE, Mangan NE, Walsh CM, Saraiva M, Sayers JR, McKenzie AN, Alcami A, Fallon PG 2005. *Schistosoma mansoni* secretes a chemokine binding protein with antiinflammatory activity. *J Exp Med* 202(10): 1319-1325.

Smith P, Mangan NE, Walsh CM, Fallon RE, MacKenzie ANJ, Van Rooijen N, Fallon PG 2007. Infection with a Helminth Parasite Prevents Experimental Colitis via a Macrophage-Mediated Mechanism. *The Journal of Immunology* 178: 4557-4566.

Smith PM, Jacque B, Conner JR, Poltorak A, Staderker MJ 2011. IRAK-2 regulates IL-1-mediated pathogenic Th17 cell development in helminthic infection. *PLoS Pathog.* 7:e1002272, doi:10.1371/journal.ppat.1002272

Souza AL, Sousa-Pereira SR, Teixeira MM, Lambertucci JR, Teixeira AL 2006. The role of chemokines in *Schistosoma mansoni* infection: insights from human disease and murine models. *Mem. Inst Oswaldo Cruz* 101(1): 333-338.

Souza PR, Souza AL, Negrao-Correa D, Teixeira AL, Teixeira MM 2008. The role of chemokines in controlling granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni* infection. *Acta Trop* 108(2-3): 135-138.

Souza ALS, Souza PRS, Pereira CA, Fernandes A, Guabiraba R, Russo RC, Vieira LQ, Correa Jr A, Teixeira MM, Negrão-Corrêa DN 2011. Experimental Infection with *Schistosoma mansoni* in CCR5-Deficient Mice Is Associated with Increased Disease Severity, as CCR5 Plays a Role in Controlling Granulomatous Inflammation. *Infection and Immunity* 79(4): 1741-1749.

Souza AL, Roffe E, Pinho V, Souza DG, Silva AF, Russo RC, Guabiraba R, Pereira CA, Carvalho FM, Barsante MM, Correa-Oliveira R, Fraga LA, Negrao-Correa D, Teixeira MM 2005. Potential role of the chemokine macrophage inflammatory protein 1alpha in human and experimental schistosomiasis. *Infect Immun* 73: 2515-2523.

Sousa-Pereira SR, Teixeira AL, Silva LC, Souza AL, Antunes CM, Teixeira MM, Lambertucci JR 2006. Serum and cerebral spinal fluid levels of chemokines and Th2 cytokines in *Schistosoma mansoni* myeloradiculopathy. *Parasite Immunol* 28(9): 473-478.

Sozzani S, Luini W, Borsatti A, Polentarutti N, Zhou D, Piemonti L, D'Amico G, Power CA, Wells TN, Gobbi M, Allavena P, Mantovani A 1997. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines. *J Immunol* 159:1993-2000.

- Speziali E, Bethony J, Martins-Filho O, Fraga LAO, Lemos DS, Souza LJ, Corrêa-Oliveira R, Faria AMC 2004. Production of interferon- γ by natural killer cells and aging in chronic human schistosomiasis. *Mediators of Inflammation* 13(5-6): 327-333.
- Stadecker MJ, Hernandez HJ 1998. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. *Parasite Immunol* 20: 217-221.
- Stadecker ET, Asahi H, Finger E, Hernandez HJ, Rutitzky LI, Sun J 2004. The immunobiology of Th1 and high-pathology schistosomiasis *Immunological Reviews* 201: 168-179.
- Stavitsky A 2004. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infection and Immunity* 72: 1-12.
- Stavitsky, AB & Xianli, J 2002. In vitro and in vivo regulation by macrophage migration inhibitory factor (MIF) of expression of MHC-II, costimulatory, adhesion, receptor, and cytokine molecules. *Cellular Immunology* 217: 95-104.
- Stavitsky AB, Metz C, Liu S, Xianli J, Bucala R 2003. Blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in *Schistosoma japonicum* infected mice results in an increased adult worm burden and reduced fecundity. *Parasite Immunology* 25: 369-374.
- Stefanovic L, Stefanovic B 2006. Mechanism of direct hepatotoxic effect of KC chemokine: sequential activation of gene expression and progression from inflammation to necrosis. *J Interferon Cytokine Res* 26: 760-770.
- Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M & Utzinger J 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis* 6: 411-425.
- Stout RD & Suttles J 2004. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J Leukoc Biol* 76(3): 509-513.
- Strath M, Warren DJ, Sanderson CJ 1985. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods* 83(2): 209-215.
- Sugimoto R, Enjoji M, Nakamuta M, Ohta S, Kohjima M, Fukushima M, Kuniyoshi M, Arimura E, Morizono S, Kotoh K, Nawata H 2005. Effect of IL-4 and IL-13 on collagen production in cultured LI90 human hepatic stellate cells. *Liver Int* 25(2): 420-428.
- Symmers WSTC 1904. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova *Bilharzia haematobia*. *Journal of Pathology and Bacteriology* 9: 237-239.
- Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G 1990. IL-4 directs the development of different subsets of helper T cells. *Journal of Immunology* 145: 3796-3806.

Tavares-Neto J & Prata A 1990. A forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica, em relação à composição racial e o nível sócio-econômico, em Catolândia/BA. *Rev Soc Bras Med Trop* 23(1): 37-42.

Taylor JJ, Mohrs M, Pearce EJ 2006. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J Immunol* 176: 5839-5847

Teixeira MM, Wells TN, Lukacs NW, Proudfoot AE, Kunkel SL, Williams TJ, Hellewell PG 1997. Chemokine-induced eosinophil recruitment. Evidence of a role for endogenous eotaxin in an in vivo allergen model in mouse skin. *Journal of Clinical Investigation* 100: 1657-1666.

Teixeira R, Coelho PM, Brasileiro Filho G, Azevedo Junior GM, Serufo JC, Pfeilsticker FJ, Abreu FP, Costa CP Jr, Pfeilsticker FJ, Santa Cecilia GD, Lambertucci JR 2001. Pathogenic aspects of pyogenic liver abscess associated with experimental schistosomiasis. *Am J Trop Med Hyg* 64(5-6): 298-302.

Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Andrade ZA, Cunha-Mello JR, Wilson RA, Correia-Oliveira R 2002. The study of the cell activation in peripheral blood and spleen of hepatoesplenic patients suggests an exchange of cells between these two compartments in advanced human *Schistosomiasis mansoni* infection. *Scand. J. Immunol* 56(3): 315-322.

Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho OA, Peruhype-Magalhães ES, Silveira-Lemos D, Malaquias LCC, Oliveira LFA, Silveira AMS, Gazzinelli A, Gazzinelli G, Corrêa-Oliveira R 2008. Cytokines, chemokine receptors, CD4⁺CD25^{HIGH} T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. *Acta Tropica* 108: 139-149.

Thomas PG, Carter MR, Atochina O, Da'dara AA, Piskorska D, McGuire E, Harn DA 2003. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth antigen uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J Immunol* 171: 5837-5841.

Thompson RW, Pesce JT, Ramalingam T, Wilson MS, White S, Cheever AW, Ricklefs SM, Porcella SF, Li L, Ellies LG, Wynn TA 2008. Cationic Amino Acid Transporter-2 Regulates Immunity by Modulating Arginase Activity. *Plos Pathog* 4(3): 1-17.

Turner JD, Jenkins GR, Hogg KG, Aynsley SA, Paveley RA, Cook PC, Coles MC, Mountford AP 2011. CD4⁺CD25⁺ regulatory cells contribute to the regulation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by schistosome infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1269. doi:10.1371/journal.pntd.0001269.

Valadares TE, Coelho PM, Pellegrino J, Sampaio IB 1981. *Schistosoma mansoni*: comparison of oviposition of the LE (Belo Horizonte), SP (São Paulo) and ST (Liberia) strains in mice. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 23(1): 1-5.

Van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, Kruize YC, Schmitz M, Kurt-Jones EA, Espevik T, de Jong EC, Kapsenberg ML, Golenbock DT, Tielens AG, Yazdanbakhsh M 2002. A novel host – parasite lipid cross talk: schistosomal lysophosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 277: 48122-48129.

- Vas J, Gronwall C, Marshak- Rothstein A, Silverman GJ 2012. Natural antibody to apoptotic cell membranes inhibits the pro-inflammatory properties of lupus auto-antibody immune complexes. *Arthritis Rheum.* 64: 3388-3398.
- Vella AT & Pearce EJ 1992. CD4+ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. *J Immunol* 148(7): 2283-2290.
- Von Boehmer H 2005. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6: 338-344.
- Von Stebut E, Metz M, Milon G, Knop J, Maurer M 2003. Early macrophage influx to sites of cutaneous granuloma formation is dependent on MIP-1 α/β released from neutrophils recruited by mast cell-derived TNF- α . *Blood* 101: 210–215.
- Walsh CM, Smith P, Fallon PG 2007. Role for CTLA-4 but not CD25⁺ T cells during *Schistosoma mansoni* infection of mice. *Parasite Immunol* 29: 293-308.
- Wang J, Roderiquez G, Oravec T, Norcross MA 1998. Cytokine regulation of human immunodeficiencyvirus type 1 entry and replication in human monocytes/macrophages through modulation of CCR5 expression. *The Journal of Virology* 72: 7642-7647.
- Warren KS 1968. Pathophysiology and pathogenesis of hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Bull NY Acad Med* 44: 280-294.
- Warren KS 1979. The pathogenesis of hepatosplenic schistosomiasis: from manto monkey to mouse to molecule. *Prog Liver Dis* 6: 439-455.
- Warren KS 1982. The effect of immunopathogenesis of schistosomiasis: in Oi'ho models. *Immunol Rev* 61:189-213.
- Wasmuth HE, Tacke F, Trautwein C 2010. Chemokines in Liver Inflammation and Fibrosis. *Seminars in Liver Disease* 30(3): 215-225.
- Weinstock J V & Boros DL 1983. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansoni. *J Immunol* 130: 418-422.
- Whitfield PJ, Barlett A, Brown MB, Mariott C 2003. Invasion by shistosome cercariae: studies in human skin explants. *Trends Parasitol* 19(8): 339-340.
- Wilson MS, Mentik-Kane MM, Pesce JT, Ramalingan TR, Thompson R, Wyn TA 2007. Immunopatology of schistosomiasis. *Immunology and Cell Biology* 85: 148-154.
- Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, Mckenzie BS, Umenschein WM, Mattson JD, Basham B, Smith K, Chen T, Morel F, Lecron J, Kastelein RA, Cua DJ, Mcclanahan TK, Bowman EP, Waal Malefyt R 2007. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17–producing helper T cells. *Nat Immunol* 8: 950-957.

- Wolmarans CT, De Rock KN, Straus HD, Bornman M 2002. Daily emergence of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* cercariae from naturally infected snails under field conditions. *J. Helminthol* 76: 273-277.
- WHO 2002: Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: Report of a WHO expert committee. *WHO Tech Rep Ser* 912: 1-57.
- Wynn TA, Eltoun I, Oswald IP, Cheever AW, Sher A 1994. Endogenous interleukin-12 (IL₁₂) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*, and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. *J Exp Med* 179: 1551-1556.
- Wynn TA, Cheever AW, Williams ME, Hieny S, Caspar P, Kuhn R, Muller W, Sher A 1998. IL-10 regulates liver pathology in acute murine schistosomiasis *mansoni* but is not required for immune down-modulation of chronic disease. *J Immunol* 160: 4473-4480.
- Wynn TA 1999. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis *mansoni*: the cross-regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the response of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J Infect Dis* 179: 1502-1514.
- Wynn TA 2000. Analyses of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell1 and T helper cell –type cytokine responses *in vivo*. *J Immunol* 159: 5014-5023.
- Wynn TA 2004. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 4: 583-594.
- Wynn TA 2007. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *Journal of Pathology* 214: 1199-1210.
- Wynn & Barron 2010. Macrophages: Master Regulators of Inflammation and Fibrosis. *Semin Liver Dis* 30(3): 245-257. Zheng L, Chu J, Shi Y, Zhou X, Tan L, Li Q, Cui L, Han Z, Han Y, Fan D 2013. Bone marrow-derived stem cells ameliorate hepatic fibrosis by down-regulating interleukin-17. *Cell Biosci* 3(1):46 doi: 10.1186/2045-3701-3-46.
- Yurchenko E, Tritt M, Hay V, Shevach EM, Belkaid Y, Piccirillo CA 2006. CCR5-dependent homing of naturally occurring CD4⁺ regulatory T cells to sites of *Leishmania major* infection favors pathogen persistence. *J Exp Med* 203(11): 2451-2460.
- Zhou Y, Kurihara T, Ryseck RP, Yang Y, Ryan C, Loy J, Warr G, Bravo R 1998. Impaired macrophage function and enhanced T cell dependent immune response in mice lacking CCR5, the mouse homologue of the major HIV-1 coreceptor. *J Immunol* 160: 4018-4025.
- Zimmermann N, Hershey GK, Foster PS, Rothenberg ME 2003. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol* 111: 227-242.
- Zimmermann HW & Tacke F 2011. Modification of chemokine pathways and immune cell infiltration as a novel therapeutic approach in liver inflammation and fibrosis. *Inflamm Allergy Drug Targets* 10: 509-536.
- Zlotnik A, Yoshie O 2012. The Chemokine Superfamily Revisited. *Immunity* 36: 705-716

Zuidema PJ 1981. The Katayama syndrome: an outbreak in Dutch tourists to the Omo National Park, Ethiopia. *Tro Geog Med* 33: 30-35.

Zwingerberger H, Irschick E, Siqueira GV, Dacal RC, Feldmeie 1990, R. Tumor necrosis factor in hepatoesplenic schistosomiasis. *Scand J Immunol* 31: 205-211.

7. ANEXOS

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

Parecer nº. ETIC 274/05

Interesse: Profa. Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa
Departamento de Parasitologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 28 de setembro de 2005, o projeto de pesquisa intitulado « **Estudo das Alterações Imunológicas de Pacientes com Esquistossomose Mansônica e sua Associação com Formas Clínica e Parasitológica** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Dr. Rui Rothe - Neves
Vice-Presidente do COEP/UFMG

ANEXO B- Ficha Clínico Epidemiológica

**FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG.
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL.
PROJETO QUEIXADINHA - ESQUISTOSSOMOSE**

FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

Nome do paciente:..... Apelido.....

Numero: /...../...../ - /...../...../...../...../ - /...../...../
 area casa paciente

Naturalidade:

Idade: /...../...../ a /...../...../ m Sexo: 1 /...../ Masculino 2 /...../ Feminino

Estado civil: 1 /...../ Solteiro 2 /...../ Casado 3 /...../ Viúvo 4 /...../ Outros

Cor: 1 /...../ Branca 2 /...../ Preta 3 /...../ Morena Escolaridade:

TRATAMENTO ANTERIOR

Esquistossomose	1 /...../ Não	2 /...../ Sim	Data:/...../.....
Sangramento digestivo	1 /...../ Não	2 /...../ Sim	Data:/...../.....
Transfusão	1 /...../ Não	2 /...../ Sim	Data:/...../.....
Injeções	1 /...../ Não	2 /...../ Sim	Data:/...../.....
Manipulação Dentária	1 /...../ Não	2 /...../ Sim	Data:/...../.....
Alcool:			

EXAME FÍSICO

Peso: /...../...../...../ kg; /...../...../...../ g Altura: /...../...../...../ cm

P.A: /...../...../...../ : /...../...../...../ mmHg Pulso: /...../...../ bpm

Estado geral: 1 /...../ B 2 /...../ R 3 /...../ P

Ausculta: 1 /...../ Normal 2 /...../ Alterada:

.....

.....

Abdome: 1 /...../ Ascite 2 /...../ Circulação colateral 3 /...../ Ausência

Fígado: 1 /...../ Palpável 2 /...../ Não palpável

Se palpável: Direito: /...../...../...../ cm da RCD
Esquerdo: /...../...../...../ cm do Ap. Xifóide

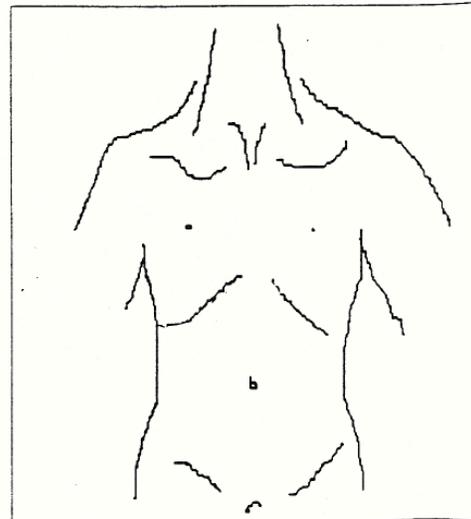
Superfície: 1 /...../ Lisa 2 /...../ Nodular 8 /...../ N. A.

Consistência: 1 /...../ Normal 2 /...../ Endurecida
 3 /...../ Dura 8 /...../ N.A.

Baço: 1 /...../ Palpável 2 /...../ Endurecida
 3 /...../ Dura 4 /...../ N.A.

Se palpável: /...../...../...../ cm do RCE

Consistência: 1 /...../ Normal 2 /...../ Endurecida
 3 /...../ Dura 8 /...../ N.A.



ANEXO C- Exame Ultrassom

EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO

IDENTIFICAÇÃO

Data: / /	Número:
Nome:	
Idade:	Peso: Altura

FÍGADO

Lobo Direito ⇒	<u>Diâmetros</u>	Longitudinal: _____ (mm)
		Antero-Posterior: _____ (mm)
Lobo Esquerdo ⇒	<u>Diâmetros</u>	Longitudinal: _____ (mm)
		Antero-Posterior: _____ (mm)
Contornos	1 - Liso 2 - Rugoso	_____
Ramos Portais Periféricos ⇒	1 - Parede ⇒	_____ (mm)
	Total ⇒	_____ (mm)
	2 - Parede ⇒	_____ (mm)
	Total ⇒	_____ (mm)
	3 - Parede ⇒	_____ (mm)
	Total ⇒	_____ (mm)
Fibrose (OMS)		_____
Fibrose ⇒	1 Ausente 2 Leve 3 Moderada 4 Intensa	_____
Distribuição ⇒	1 Central 2 Periférica 3 Central e Periférica	_____

HILO HEPÁTICO

Veia Porta	Luz ⇒	_____ (mm)
	Parede ⇒	_____ (mm)
Bifurcação da Veia Porta	Parede ⇒	_____ (mm)
Vesícula Biliar	Parede ⇒	_____ (mm)
Linfonodos	Número ⇒	_____
	Diâmetro do Maior ⇒	_____ (mm)

BAÇO E SISTEMA PORTA

Diâmetro Longitudinal do Baço	_____ (mm)
Colaterais	1 Sim 2 Não _____
Quais ?	_____
Dilatação de Tributárias	1 Sim 2 Não _____
Quais ?	_____

OUTROS ACHADOS

ANEXO D- Valores de p obtidos na análise univariada

Variáveis		MIF	rTNF- R1	CCL3	CCL7	CCL24
		p	p	p	p	p
Sociais	Sexo	0,854	0,007	0,882	0,014	0,703
	Idade	0,988	0,518	0,339	0,183	0,913
	Faixa etária	0,775	0,772	0,964	0,197	0,594
	Tratamento	0,152	0,311	0,348	0,657	0,378
	Contato água	0,359	0,985	0,635	0,402	0,648
	Opg	0,317	0,011	0,346	0,208	0,587
Fígado Clínica	Palpável ou não	0,343	0,626	0,225	0,243	0,725
	Borda direita	0,296	0,269	0,750	0,138	0,118
	Borda esquerda	0,631	0,150	0,916	0,042	0,102
	Superfície	0,249	0,015	0,650	0,053	0,659
	Contorno	0,771	0,039	0,303	0,133	0,350
	Consistência	0,159	0,007	0,110	0,234	0,207
Fígado Ultrassom (mm)	Longitudinal direito	0,564	0,540	0,189	0,936	0,830
	Longitudinal esquerdo	0,150	0,630	0,553	0,792	0,838
	Ântero-posterior dir.	0,177	0,741	0,881	0,130	0,476
	Ântero-posterior esq.	0,741	0,959	0,525	0,745	0,638
Veia porta (mm)	Diâmetro contínuo	0,311	0,312	0,730	0,331	0,045
	Diâmetro categórica	0,184	0,271	0,114	0,512	0,042
	Espessura contínua	0,981	0,169	0,730	0,518	0,619
	Espessura categórica	0,951	0,157	0,697	0,157	0,459
	Espessura ramificação	0,004	0,006	0,379	0,292	0,041
	Espessura ramificação categórica	0,002	0,031	0,379	0,500	0,038
Baço clínica	Palpável ou não	0,182	0,198	0,902	0,193	0,697
	Tamanho	0,587	0,157	0,535	0,114	0,502
	Consistência	0,918	0,015	0,889	0,456	0,158
Baço ultrassom (mm)	Tamanho contínuo	0,948	0,136	0,717	0,676	0,520
	Tamanho categórico	0,797	0,102	0,103	0,164	0,388
Vesícula biliar (mm)	Espessura contínua	0,805	0,040	0,042	0,266	0,034
	Espessura categórica	0,634	0,179	0,103	0,662	0,021

Os valores destacados em negrito mostram os níveis de significância com $p < 0,05$ para cada variável resposta analisada. Os valores incluídos na no modelo de análise múltipla final são aqueles com valores de $p < 0,250$.

Os valores categorizados para cada variável são esses: Tamanho do baço **Tamanho longitudinal do baço** < 120 mm e ≥ 120 mm; Tamanho do fígado < 85 mm e ≥ 85 mm; Tamanho longitudinal lobo esquerdo < 90 mm e ≥ 90 mm; Tamanho longitudinal lobo direito; Diâmetro da veia porta < 11 mm e ≥ 11 mm; Espessura da veia porta na entrada do hilo < 6 mm e ≥ 6 mm; Espessura parede veia porta bifurcações secundárias < 5 mm e ≥ 5 mm; Espessura da parede da vesícula biliar < 4 mm e ≥ 4 mm.