

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Parasitologia

Laura Liana Maggi Fernandes

**PARTICIPAÇÃO DA ATIVAÇÃO DA VIA IL-33/ST2 NA INDUÇÃO DA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA, NA DIFERENCIAÇÃO DE MACRÓFAGOS E NA FIBROSE
INDUZIDA PELA INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni***

Belo Horizonte

2021

Laura Liana Maggi Fernandes

Participação da ativação da via IL-33/ST2 na indução da resposta imunológica, na diferenciação de macrófagos e na fibrose induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientador: Dra. Deborah Aparecida Negrão-Côrrea
Depto. de Parasitologia- ICB/UFMG

Belo Horizonte

2021

043 Fernandes, Laura Liana Maggi.
Participação da ativação da via IL-33/ST2 na indução da resposta imunológica, na ativação de macrófagos e na fibrose induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni* [manuscrito] / Laura Liana Maggi Fernandes. - 2021.

135 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dra. Deborah Aparecida Negrão-Côrrea.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Resposta imune. 4. Granuloma. 5. Cirrose Hepática. 6. Macrófagos. 7. Interleucina-33. I. Negrão-Côrrea, Deborah Aparecida. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



ATA DE DEFESA DE TESE - DOUTORADO

Laura Liana Maggi Fernandes321/2021/08
entrada
2º/2016
2016710211

As quatorze horas do dia 18 de agosto do ano de 2021, reuniu-se, por videoconferência, sala <https://conferenciaweb.rnp.br/webconf/laura-liana-maggi-fernandes>, a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: “Participação da ativação da via IL-33/ST2 na indução da resposta imunológica, na ativação de macrófagos e na fibrose induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni*”, área de concentração: Imunoparasitologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, assou a palavra ao (a) candidato (a), para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do (a) candidato (a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do (a) candidato (a) e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa	UFMG	Aprovada
Dra. Renata Heisler Neves	UERJ	Aprovada
Dr. Thiago de Almeida Pereira	Universidade de Stanford, EUA	Aprovada
Dr. Fabricio Marcus Silva Oliveira	UFMG	Aprovada
Dr. Wagner Luiz Tafuri	UFMG	Aprovada

Expedição do resultado final.**CONSIDERAÇÕES GERAIS – SOBRE TESE APRESENTADA PELO (A) O (A) CANDIDATO (A):**

Exigências	
Recomendações	
Sugestões	Foi sugerido pelos membros da banca examinadora que, na versão final da tese, a aluna apresente melhor detalhamento das legendas das figuras com ilustrações histopatológicas incluindo barras e coloração usada, bem como uma melhor descrição das alterações patológicas observadas.

Pelas indicações, o (a) candidato(a) foi considerado(a): **Aprovada.**

O resultado final foi comunicado publicamente ao(a) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 18 de agosto de 2021.

Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa

(Orientadora)

Dra. Renata Heisler Neves

Dr. Thiago de Almeida Pereira

Dr. Fabricio Marcus Silva Oliveira

Dr. Wagner Luiz Tafuri

Ata-COVID19- período isolamento social

Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

AGRADECIMENTOS

À DEUS por conceder o dom da vida, paciência, coragem e sabedoria para mais uma conquista. Por ter colocado no meu caminho somente pessoas maravilhosas, que tornaram meus dias melhores e me ajudaram em tantos momentos que precisei.

À minha orientadora Dra Deborah Negrão-Corrêa, pela dedicação, competência e serenidade em todos os momentos dessa caminhada. Obrigada por me receber em seu laboratório e por me fazer sentir capaz, mesmo diante de todos os obstáculos e desafios.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia de Helminhos Vanessa, João, Michelle, Vinícius, Jeferson, Samira, Guilherme, Gustavo por todo o ensinamento, paciência, cumplicidade, confiança, disponibilidade, imprescindível ajuda, convivências diárias, companheirismo, dedicação e principalmente pelos momentos de descontração que foram fundamentais nesta caminhada. Meu muito obrigado em especial ao meu companheiro de experimentos e confecção de artigo, Genil Mororó, seu auxílio e dedicação foram fundamentais nesta etapa da minha vida. Valeuzão!

Aos funcionários do GIDE Zenir, Selma, Beth que proporcionaram toda a estrutura para a realização dos experimentos com muita dedicação e carinho. E agradeço principalmente ao Zé Carlos que sempre esteve pronto para me ajudar.

A Dra Élide Rabelo pelo acolhimento e disponibilidade em utilizar seu laboratório; ao William Pereira Alves pela paciência e dedicação em me ensinar um pouco de biologia molecular e me orientar em todos os experimentos de RT-qPCR.

Ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, professores e funcionários.

Aos meus amigos Vanessa Mendes, Walison Rocha, Antônio Mendes, Denise Barguil, Charlene Patrony, Felipe Shigematsu que acompanham, apoiam e torcem pelo sucesso da minha trajetória, obrigada amigos, vocês são demais!

Agradeço a minha família, principalmente aos meus pais e irmãos por toda paciência, carinho, amor, palavras de incentivo neste momento. Por me apoiarem e me encorajarem em todas as minhas decisões e me auxiliarem sempre em novas conquistas. Muito obrigado, amo vocês!

Toda jornada bem sucedida começa com um simples desejo e termina com a concretização de um sonho!

“O amor ilumina a alma que deseja amar”

*Manoel Philomena de Miranda • Divaldo Pereira
Franco*

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS

Laboratório de Parasitologia Molecular – Universidade Federal de Minas Gerais

William Pereira Alves

Élida Mara Leite Rabelo

Laboratório de Imunohelmintologia

Laura Liana Maggi Fernandes

Genil Mororó Araújo Camelo Júnior

Izabella Chrystina Rocha

João Marcelo Peixoto Moreira

Vinícius Gustavo de Oliveira

Jeferson Kelvin Alves de Oliveira Silva

Michelle Carvalho de Rezende

Vanessa Fernandes Rodrigues

Deborah Aparecida Negrão-Côrrea

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

RESUMO

A liberação dos antígenos secretados pelos ovos de *Schistosoma mansoni* que ficam aprisionados nos tecidos, principalmente no fígado, induzem uma resposta inflamatória granulomatosa do tipo 2 (Th2) que é determinante para a evolução da morbidade da esquistossomose. IL-33 e seu receptor ST2, são expressos por diversas células imunes inatas, como macrófagos, eosinófilos, linfócitos inatos do tipo II que estimulam a produção precoce de citocinas, como IL-13 e IL-5, e participam da resposta imune responsável pela formação do granuloma e da evolução do processo de fibrose hepático. Sendo assim, idealizamos neste trabalho avaliar a participação da via IL-33/ST2 na formação e modulação dos granulomas hepáticos, no desenvolvimento da fibrose e na ativação e diferenciação de macrófagos. Desta forma, avaliamos comparativamente a resposta imune e a formação de granuloma em camundongos BALB/c (WT) e BALB/c geneticamente deficientes no receptor de IL-33 (ST2^{-/-}) experimentalmente infectados com *S. mansoni*. Estes animais foram acompanhados por até 14 semanas para avaliar a mortalidade. Em seguida, avaliou-se a carga parasitária, resposta imune hepática, a formação dos granulomas hepáticos, bem como, o processo de fibrose e a participação dos diferentes tipos de macrófagos envolvidos neste contexto. Nossos dados mostraram que a carga parasitária foi semelhante em camundongos WT e ST2^{-/-}, mas os animais ST2^{-/-} infectados apresentaram um aumento na taxa de mortalidade. A ausência da ativação de IL-33 não alterou a indução da resposta Th2 e levou a um predomínio de Th17 no tecido hepático. Os granulomas hepáticos de animais deficientes apresentaram conteúdo de hidroxiprolina semelhante com os WT, entretanto, estes são maiores e com intenso infiltrado celular, ricos em eosinófilos e neutrófilos. O granuloma de animais deficientes apresentou ainda matriz extracelular desorganizada, justificada pela redução na ativação de HSC e sua transdiferenciação em miofibroblastos, apesar da expressão aumentada de *TGF-β*. Isto impactou na expressão reduzida dos *Col III* e *Col VI* nos animais ST2^{-/-}, fato que foi acompanhado pela redução na formação de fibras reticulares na matrix extracelular do granuloma. A avaliação do perfil de macrófagos *in vitro* indicou que os monócitos recuperados da medula óssea de animais ST2^{-/-} e estimulados para diferenciação em M1 e M2 produzem menores níveis de arginase e maiores níveis de nitrito comparado às células diferenciadas de WT. Na esquistossomose experimental também foi detectado variação na ativação de macrófagos M2 no fígado dos camundongos ST2^{-/-} em comparação aos WT, com aumento da expressão de *ARG-1* e da atividade de arginase e redução de *MgI2* e *Chi3I3* na fase aguda da infecção, sugerindo maior ativação de M2a. Por outro lado, na esquistossomose crônica estes animais tiveram aumento significativo da expressão de *NOS-2* no tecido hepático, indicando aumento de macrófagos M1. Os dados indicam que a ativação da via IL-33/ST2 não é essencial para a indução da resposta Th2, mas é necessária para a modulação da resposta Th17, diferenciação adequada de macrófagos, para diferenciação de HSC em miofibroblastos e produção de diferentes colágenos, permitindo a formação de fibras reticulares e a formação de granulomas hepáticos capazes reduzir o dano tecidual e controlar a mortalidade do hospedeiro durante a esquistossomose.

Palavras chave: *S.mansoni*, resposta Th2, granuloma hepático, fibrose, macrófagos, IL-33

ABSTRACT

The release of antigens secreted by *Schistosoma mansoni* eggs that are trapped in tissues, especially the liver, induce a type 2 (Th2) granulomatous inflammatory response, which is crucial for the evolution of schistosomiasis morbidity. IL-33 and its ST2 receptor, are expressed by several innate immune cells, such as macrophages, eosinophils, type II innate lymphocytes that stimulate the early production of cytokines, such as IL-13 and IL-5, and participate in the immune response responsible for granuloma formation and the evolution of the hepatic fibrosis process. Therefore, in this work we idealized the evaluation of the participation of the IL-33/ST2 pathway in the formation and modulation of hepatic granulomas, in the development of fibrosis and in the activation and differentiation of macrophages. Thus, we comparatively evaluated the immune response and granuloma formation in BALB/c (WT) and BALB/c genetically deficient mice without IL-33 receptor (ST2^{-/-}) experimentally infected with *S. mansoni*. These animals were followed for up to 14 weeks to assess mortality. Then, the parasite load, hepatic immune response, formation of hepatic granulomas, as well as the fibrosis process and the participation of different types of macrophages involved in this context were evaluated. Our data showed that the parasite load was similar in WT and ST2^{-/-} mice, but the ST2^{-/-} infected animals showed an increased mortality rate. The absence of IL-33 activation did not alter the induction of the Th2 response and led to a predominance of Th17 in liver tissue. Hepatic granulomas from deficient animals presented hydroxyproline content similar to WT, however, these are larger and with intense cellular infiltrate, rich in eosinophils and neutrophils. The granuloma of deficient animals also presented a disorganized extracellular matrix, justified by the reduction in the activation of HSC and its transdifferentiation into myofibroblasts, despite the increased expression of *TGF-β*. This impacted the reduced expression of *Col III* and *Col VI* in ST2^{-/-} mice, a fact that was accompanied by a reduction in the formation of reticular fibers in the extracellular matrix of the granuloma. *In vitro* macrophage profile evaluation indicated that monocytes retrieved from the bone marrow of ST2^{-/-} mice and stimulated to differentiate into M1 and M2 produce lower levels of arginase and higher levels of nitrite compared to differentiated WT cells. In experimental schistosomiasis it was also detected variation in the activation of M2 macrophages in the liver of ST2^{-/-} mice compared to WT, with increased expression of *ARG-1* and arginase activity and reduction of *MgL2* and *Chi3l3* in the acute phase of the infection, suggesting greater activation of M2a. On the other hand, in chronic schistosomiasis these animals had a significant increase in *NOS-2* expression in liver tissue, indicating an increase in M1 macrophages. The data indicate that activation of the IL-33/ST2 pathway is not essential for the induction of the Th2 response, but it is necessary for the modulation of the Th17 response, adequate macrophage differentiation, for differentiation of HSC into myofibroblasts and production of different collagens, allowing the formation of reticular fibers and the formation of hepatic granulomas capable of reducing tissue damage and controlling host mortality during schistosomiasis.

Key words: *S. mansoni*, Th2 response, hepatic granuloma, fibrosis, macrophages, IL-33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica dos países endêmicos para a esquistossomose no ano de 2020.....	17
Figura 2. Distribuição geográfica das diferentes espécies do gênero <i>Schistosoma</i> . (Fonte:...	20
Figura 3. Distribuição da esquistossomose no Brasil.....	21
Figura 4. Ciclo biológico de <i>S.mansoni</i>	23
Figura 5. Diferenciação dos subtipos de macrófagos.....	33
Figura 6. Delineamento experimental capítulo 1.	43
Figura 7. Delineamento experimental capítulo 2.	44
Figura 8. Delineamento experimental capítulo 3.	45
Figura 9. Avaliação da carga parasitária e taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c WT e ST2 ^{-/-}	63
Figura 10. Níveis séricos de citocinas e imunoglobulinas.	65
Figura 11. Resposta Th2 e regulatórias do baço.....	66
Figura 12. Resposta imune no fígado.	68
Figura 13. Equilíbrio entre as respostas imune Th2, Th1, Th17 e regulatória no fígado de camundongos BALB/c WT e ST2 ^{-/-} durante a infecção por <i>S.mansoni</i>	70
Figura 14. Avaliação do granuloma e lesões hepáticas.....	72
Figura 15. Infiltração celular no fígado.....	73
Figura 16. Análise imunohistoquímica da expressão de α -SMA em granulomas hepáticos induzidos por <i>S.mansoni</i> . o padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney e o valor de <i>p</i> foi atribuído. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de diferentes linhagens(**** p <0,0001).....	80
Figura 17. Avaliação da deposição de colágeno no fígado de camundongos WT e ST2 ^{-/-} infectados com <i>S.mansoni</i>	82
Figura 18. Expressão de genes pró-fibróticos no fígado de camundongos WT e ST2 ^{-/-} infectados.....	83
Figura 19. Deposição de fibras de colágeno na coloração de Picrosirius Red em granulomas hepáticos de camundongos WT e ST2 ^{-/-} infectados com <i>S.mansoni</i>	85
Figura 20. Deposição de colágeno intersticial em granulomas hepáticos.....	85
Figura 21. Quantificação da atividade de óxido nítrico em sobrenadante de BMDM de camundongos WT e ST2 ^{-/-} infectados por <i>S.mansoni</i>	95
Figura 22. Quantificação da atividade de arginase em sobrenadante de BMDM de camundongos WT e ST2 ^{-/-} infectados por <i>S.mansoni</i>	96
Figura 23. Quantificação da atividade de N-acetilglicosamidase (NAG), óxido nítrico e arginase no homogenato hepático de camundongos WT e ST2 ^{-/-} durante a infecção por <i>S.mansoni</i>	98
Figura 24. Caracterização do perfil de macrófagos ativados no fígado durante a infecção por <i>S.mansoni</i>	100
Figura 25. Esquema dos efeitos da ausência da sinalização da via IL-33/ST2 na esquistossomose experimental.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de primers utilizados.....	56
---	----

LISTA DE ABREVIACÕES

- ALT- Alanina aminotransferase
- AAM- Macrófago alternativamente ativado
- ANOVA - Análise de Variância
- ARG-1- Arginase-1
- AST- Aspartato transpeptidase
- BSA - Albumina de Soro Bovino
- CAM- moléculas de adesão celular
- CCL- ligante de quimiocina com motive C-C (*chemokine [C-C motif] ligand*)
- CEUA- Comissão de Ética de Uso de Animais
- Chi3l3 (YM1)- chitinase-like 3
- CTGF- Connective tissue growth factor
- CXCL- ligante de quimiocina com motive C-X-C (*chemokine [C-X-C motif] ligand*)
- DAMPs- Moléculas associadas a danos teciduais
- ECM- Matriz extracelular
- ELISA – Ensaio imunoenzimático
- EPM- Erro padrão de media
- EPO- Peroxidase de eosinófilo
- Fcγbp- Protein- binding FC-γ
- GAMA-GT- γ-Glutamiltransferase
- H&E- Hemotoxilina e eosina
- HSC- Células hepáticas estreladas
- ICB – Instituto de Ciências Biológicas
- Ig – Imunoglobulina
- IL – Interleucinas
- IL1RL1- IL-1 receptor-like 1
- ILC2- Células linfóides inatas do tipo 2
- IFN-γ – Interferon gama
- LE- Luís Evangelista
- LTB4- leucotrienos B4
- LPS- Lipopolissacarídeos
- MgL2- macrophage galactose N-acetyl-galactosamine specific lectin 2

M1- Macrófagos classicamente ativados
M2- Macrófagos alternativamente ativados
mRNA- RNA mensageiro
MAPK- Proteínas Map Quinase
MPO- Mieloperoxidase
NAG- N-acetilglicosaminidase
NOS-2- Nitric oxide synthase 2
iNOS- óxido nítrico sintase
OAT - L-ornitina aminotransferase
ODC -L-ornitina descarboxilase
OPD - O-fenilenodiamina
OPG- Gramas por ovos
PAMPs- padrões moleculares associados a patógenos
PBS – Salina tamponada “*phosphate buffered saline*”
PGD2- Prostaglandina D2
RELM- β - Resistin-like molecule β
Relm- α (FIZZ1)- Resistin Like-Molecule alpha
RNS- espécies reativas de nitrogênio
 α -SMA - α -smooth muscle actin
SEA- Antígeno solúvel de ovo *Schistosoma mansoni*
STAT- Sinal transdutor e ativador de transcrição
TAA- tiocetamida
TFF-3- Trefoil peptide-3
TGF- β - Fator de transformação de crescimento
Th1 - Resposta imune do tipo 1
Th2 – Resposta imune do tipo 2
Th17- Resposta imune do tipo 17
TLRs- Receptores do tipo Toll
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
TSLP- Thymic stromal lymphopoietin
Treg- Células T regulatórias
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
USP- Universidade de São Paulo
WT- Selvagens “*Wild Type*”

WHO- Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	17
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1	Gênero <i>Schistosoma</i>	20
2.2	<i>Schistosoma mansoni</i>	20
2.2.1	<i>S. mansoni</i> no Brasil	21
2.2.2	<i>S. mansoni</i> : desenvolvimento e resposta imune.....	22
2.2.3	Granuloma esquistossomótico	27
2.2.4	Macrófagos e o granuloma	31
2.2.5	IL-33 e a esquistossomose	35
3.	JUSTIFICATIVA	39
4.	OBJETIVOS.....	40
4.1	Objetivo geral	40
4.2	Objetivos específicos.....	40
5.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
5.1	Animais experimentais	41
5.2	<i>S.mansoni</i> : obtenção de antígenos e infecção experimental.....	41
5.3	Delineamento experimental.....	42
5.3.1	Delineamento experimental - Capítulo 1 – Morbidade, Carga parasitária e Resposta imune	42
5.3.2	Delineamento experimental – Capítulo 2 – Evolução da Fibrose Hepática	43
5.3.3	Delineamento experimental - Capítulo 3 – Perfil de ativação de Macrófagos	44
5.4	Avaliação da infecção.....	45
5.4.1	Quantificação dos ovos de <i>S.mansoni</i> nas fezes	45
5.4.2	Recuperação dos vermes adultos do sistema porta hepático	45
5.4.3	Quantificação de ovos no tecido	46
5.5	Curva de sobrevivência	46
5.6	Avaliação da resposta imunológica	47
5.6.1	Obtenção do soro	47
5.6.2	Imunoglobulinas IgE e IgG1	47
5.6.3	Obtenção e ativação de células do baço.....	48
5.6.4	Quantificação de citocinas e quimiocinas no fígado e sobrenadante da cultura de baço	49
5.7	Alterações hepáticas induzidas pela infecção por <i>S.mansoni</i>	50

5.7.1	Análises histopatológicas e morfométricas.....	50
5.7.2	Imunohistoquímica	51
5.7.3	Hidroxi prolina.....	52
5.7.4	Determinação da atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO).....	52
5.7.5	Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO).....	53
5.7.6	Determinação da atividade de N-acetilglicosamidase (NAG).....	53
5.7.7	Determinação sérica da atividade de alanina aminotransferase ALT.....	54
5.8	Expressão dos genes associados à fibroses e ativação de macrófagos no tecido hepático - RT-qPCR.....	55
5.9	Perfil de ativação de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos BALB/c WT e ST2 ^{-/-} infectados por <i>S. mansoni</i>	56
5.9.1	Obtenção e diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea.....	56
5.9.2	Quantificação da atividade de arginase.....	57
5.9.3	Quantificação de óxido nítrico.....	58
5.10	Análises estatísticas	58
6.	CAPÍTULO 1	60
6.1	RESULTADOS - Capítulo 1	62
6.1.1	Avaliações parasitológicas e mortalidade de camundongos WT e ST2 ^{-/-}	62
6.1.2	Resposta Th2 sistêmica.....	64
6.1.3	Resposta imune do fígado.....	66
6.1.4	Granulomas e lesões hepáticas	70
6.2	DISCUSSÃO - Capítulo 1.....	73
7.	CAPÍTULO 2	78
7.1	RESULTADOS – Capítulo 2	80
7.1.1	Diferenciação de células estreladas hepáticas (HSC).....	80
7.1.2	Deposição de colágeno	81
7.1.3	Expressão de genes pró-fibróticos e diversidade de tipos de fibras de colágeno no granuloma periovular hepático	82
7.1.4	Presença de fibras reticulares	85
7.2	DISCUSSÃO - Capítulo 2.....	85
8.	CAPÍTULO 3	92
8.1	RESULTADOS - Capítulo 3.....	94
8.1.1	Caracterização do perfil de diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT e ST2 ^{-/-} infectados com <i>S.mansoni</i>	94

8.1.2 Perfil de ativação de macrófagos hepáticos.....	97
8.2 DISCUSSÃO - Capítulo 3.....	101
9. CONCLUSÃO GERAL.....	106
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
11. ANEXOS.....	132

1. INTRODUÇÃO

Em 1851, no Egito, Theodor Bilharz descreveu pela primeira vez a esquistossomose que permanece sendo uma das doenças parasitárias mais estudadas (Amaral *et al.* 2006). A esquistossomose é uma doença tropical potencialmente letal e crônica, endêmica em 78 países localizados em regiões tropicais e sub-tropicais do mundo (**figura 1**). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (WHO 2020) é estimado que 236 milhões de pessoas sejam acometidas por esta helmintose em todo mundo, sendo a África Subsaariana a área com maior número de pessoas infectadas e com risco de transmissão. A quimioterapia preventiva em larga escala tem sido adotada como estratégia de controle para esquistossomose em 51 países endêmicos com transmissão de moderada a alta, sendo reportado para o ano 2019 um total de 105.391.167 milhões de pessoas que receberam tratamento, das quais 86.258.239 milhões eram crianças em idade escolar (WHO 2020).

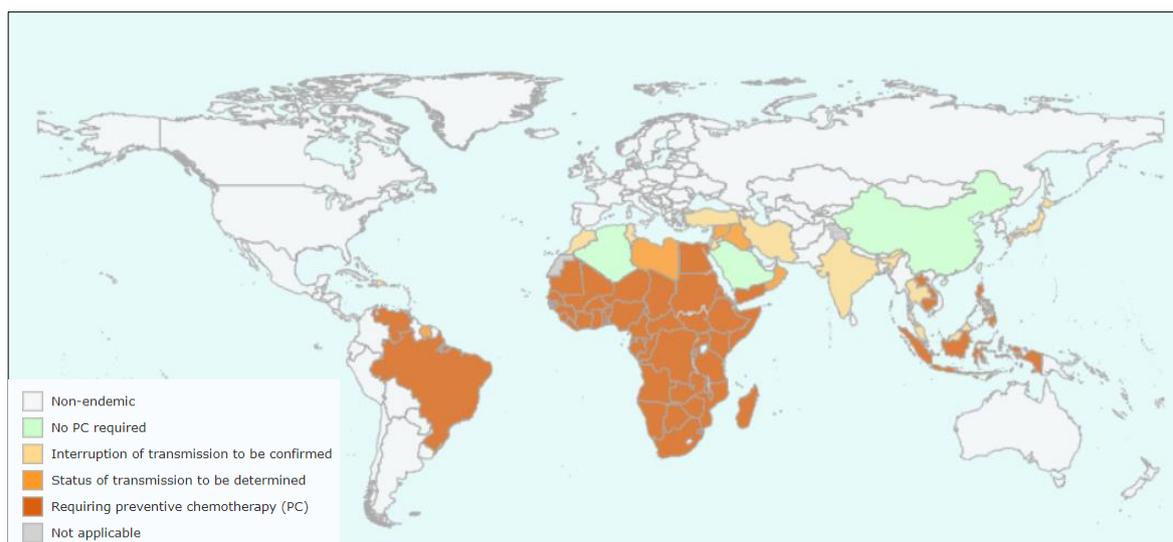


Figura 1. Distribuição geográfica dos países endêmicos para a esquistossomose no ano de 2020. 78 países são endêmicos, sendo 51 países que requerem o tratamento preventivo (WHO 2020).

A morbidade da esquistossomose humana está relacionada à carga parasitária, tempo de exposição ao parasito e/ou frequência de reinfecções, estado nutricional e co-morbidades do hospedeiro. Outro fator determinante na morbidade da esquistossomose é o tipo e intensidade da resposta imunológica do hospedeiro à infecção (Hiatt *et al.* 1980; De Jesus *et al.* 2002; Abath *et al.* 2006).

Devido à adaptação parasito-hospedeiro bem-sucedida, 90% dos indivíduos infectados em áreas endêmicas são assintomáticos na fase aguda da esquistossomose (Novato-Silva *et al.* 1992; Andrade 2008; Colley *et al.* 2014; Schwartz & Fallon 2018). A grande maioria dos

infectados evolui para a fase crônica leve, onde os ovos do parasito ficam retidos em pequena quantidade nas ramificações terminais mais finas da veia porta no fígado ou nas veias intestinais, originando granulomas peri-ovulares isolados (Andrade & Prata 1963; Cheever *et al.* 2000; Andrade 2008). Apenas uma pequena parcela dos pacientes (entre 4 a 10% dos infectados) pode evoluir para forma crônica grave da esquistossomose, denominada de hepatoesplenica, que é caracterizada pela intensa deposição de ovos na região periportal, provocando expansão fibrótica generalizada no espaço porta acompanhada de lesões destrutivas e obstrutivas do sistema da veia porta intra-hepático (Andrade 2008).

A resposta imune induzida por *Schistosoma mansoni* no hospedeiro é caracterizada por três momentos distintos. Primeiramente, o hospedeiro infectado desenvolve uma resposta imunológica direcionada aos antígenos secretados por esquistossômulos e vermes adultos, determinando a produção de citocinas pró-inflamatórias predominantemente de perfil Th1. Em seguida, com o aparecimento dos ovos, novos antígenos são secretados induzindo a maturação de novas células dendríticas e alterando o perfil das citocinas para Th2, determinante na indução da reação celular responsável pela formação de granulomas periovulares e pela deposição de colágeno no tecido (Dunn *et al.* 1977; Grzych *et al.* 1991; Pearce *et al.* 1991; Pearce *et al.* 2004; Costain *et al.* 2018). A fase final pode ser chamada, também de fase imunomoduladora, caracteriza-se pela ativação de diversos mecanismos imunoreguladores, como aumento da produção de IL-10, que regula as células T CD4⁺ efetores e reduz o tamanho do granuloma ao redor dos ovos depositados, conseqüentemente, modulando a imunopatologia (Boros *et al.* 1975; Jankovic *et al.* 1998; Falcão *et al.* 1998; Wynn *et al.* 1998; Hoffmann *et al.* 2000; Pearce & MacDonald 2002; Lundy & Lukacs 2013; Chuah *et al.* 2014). Esta alteração da resposta imune é de extrema importância para a evolução da morbidade da esquistossomose, garantindo quadros menos graves da doença na maioria dos indivíduos infectados.

A participação de elementos da resposta imune Th2 associados à formação e modulação do granuloma tem sido bem caracterizada e descrita em diversos trabalhos (Yu *et al.* 2012; Hams *et al.* 2013; Lundy & Lukacs 2013; Chuah *et al.* 2014; Schwartz *et al.* 2014a; Egesa *et al.* 2018). Entretanto, ainda não é completamente esclarecido o papel da resposta imune inata hepática ou intestinal neste processo. Atualmente, alguns elementos da resposta imune inata vêm sendo estudados no contexto das doenças infecciosas. Dentre estes elementos podemos citar as alarminas TSLP, IL-25 e IL-33, devido ao papel pró-inflamatório que desempenham (Vannella *et al.* 2016). IL-33 é uma citocina da família IL-1 considerada crucial para a indução da resposta Th2 associada à resposta a infecções por nematódeos e doenças alérgicas (Schimtz *et al.* 2005; Oboki *et al.* 2010; Sattler *et al.* 2013; Yasuda *et al.* 2018;

Krishack *et al.* 2019). Contudo, em relação à esquistossomose, a possível participação da via de ativação IL-33/ST2 na patologia da doença é pouco estudada e tem sido o principal interesse do nosso grupo de pesquisa e o foco desta tese.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Schistosoma*

A esquistossomose é causada por parasitos que pertencem ao filo Platyhelminthes (Gegenbauer 1859), classe Trematoda Rudolphi 1808, subclasse Digenea Carus 1863, ordem Strigeiforme La Rue 1926, Superfamília Schistosomatoidea Stiles & Hassal 1898, Família Schistosomatidae Stiles & Hassal 1898, e ao gênero *Schistosoma* Weiland 1858. Ao menos seis espécies deste gênero são capazes de infectar o homem, cinco delas causam esquistossomose intestinal, são elas: *Schistosoma mansoni* Sambon 1907, *S. japonicum* Katsurada 1904, *S. mekongi* Vogt, Bruckner & Bruce 1978, *S. guineensis*, *S. intercalatum* Fischer 1934, e apenas uma espécie, denominada *S. haematobium* (Bilharz 1852), se desenvolve nas veias do trato urogenital (Schwartz & Fallon 2018). A transmissão das diferentes espécies do gênero *Schistosoma*, ilustrada na **figura 2**, depende da ocorrência de espécies de moluscos que são os hospedeiros intermediários susceptíveis a estes parasitos. *Schistosoma mansoni* é a espécie com ampla distribuição na África e Arábia, e é a única responsável pelas infecções observadas na América (Gryseels 2012; Colley *et al.* 2014).

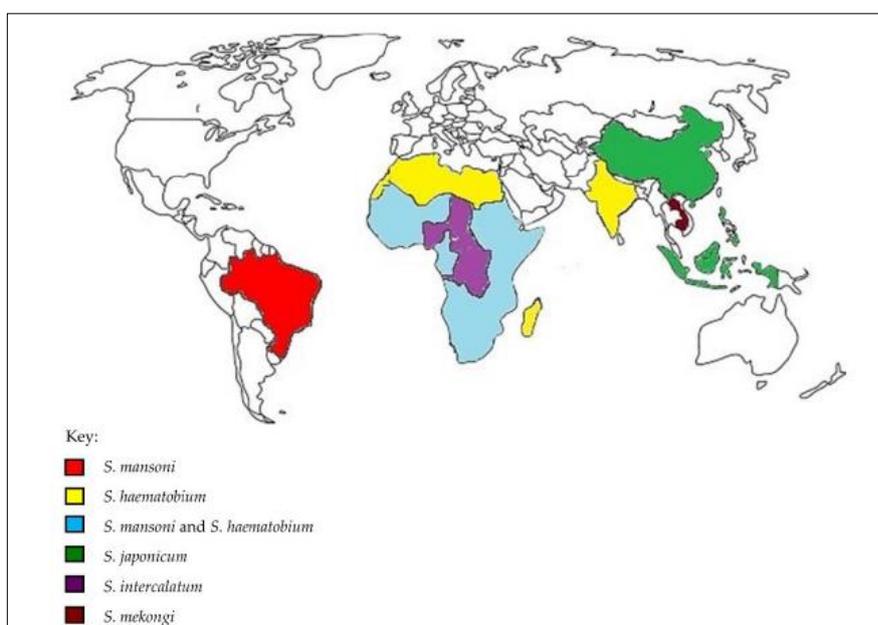


Figura 2. Distribuição geográfica das diferentes espécies do gênero *Schistosoma*. *S. mansoni*: sub-Saharan, África, Oriente Médio, América do Sul; *S. intercalatum*: Congo, Nigéria, Chad, República Central Africana; *S. haematobium*: sub-Saharan, Norte da África, Oriente Médio, Índia, Ilha de Madagascar e Maurício; *S. japonicum*: países da Ásia – China, Filipinas, Indonésia; *S. mekongi* Laos e Camboja; *S. guineensis* (não representado no mapa). (Fonte: Masamba *et al.* 2016).

2.2 *Schistosoma mansoni*

2.2.1 *S. mansoni* no Brasil

No Brasil, a única espécie do gênero *Schistosoma* encontrada é *S. mansoni*. Há indícios de que este parasito foi introduzido no país através do tráfico de escravos, estabelecendo-se por ter encontrado condições ambientais favoráveis e um hospedeiro intermediário adequado (Katz & Almeida 2003) e assim dissipou-se pelo fluxo migratório humano do litoral para o interior das cidades. A esquistossomose foi detectada pela primeira vez por Pirajá da Silva em 1908 no estado da Bahia, e ainda hoje é considerada um grande problema de saúde pública, devido a grande extensão de áreas de transmissão e a morbidade associada a esta infecção (Amaral *et al.* 2006). A transmissão da esquistossomose no Brasil ocorre em uma vasta área endêmica, compreendendo as regiões litorâneas dos Estados de Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, além de extensas regiões da Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais. No Pará, Maranhão, Piauí, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Goiás e no Distrito Federal, a transmissão é focal, não atingindo grandes áreas, como visto na **figura 3** (Coura & Amaral 2004; Katz 2018).

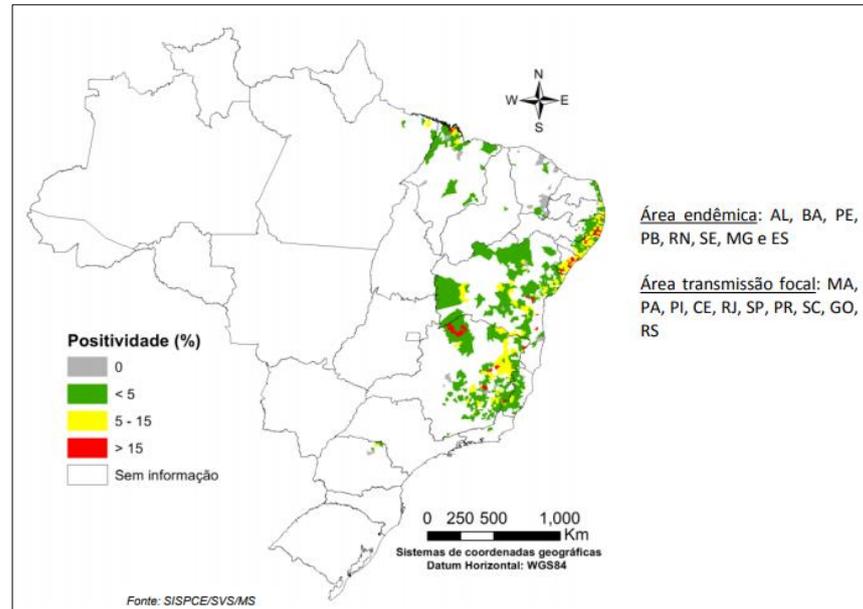


Figura 3. Distribuição da esquistossomose no Brasil. Estimativa realizada pelo Programa Nacional de Controle da Esquistossomose entre os anos 2009 a 2017. Destacado em vermelho as áreas de maior concentração de casos, representado principalmente pelos estados de Minas Gerais e Bahia (FONTE: SISPCE/SVS/MS).

Estimativas realizadas no final da década de 90 indicavam que no Brasil, a esquistossomose afetava cerca de 8 milhões de pessoas, residindo em 17 estados brasileiros

(Katz & Peixoto 2000). O inquérito nacional de prevalência da esquistossomose e geohelmintoses, realizado entre 2010 e 2015, reporta 14 estados brasileiros e o Distrito Federal considerados endêmicos para esquistossomose (Katz 2018). O Nordeste e o Sudeste são as macrorregiões que apresentaram as maiores taxas de positivities, com 1,27% e 2,35%, respectivamente. No Norte a taxa foi de 0,01%, no Centro-Oeste de 0,02% e no Sul de 0%. Nas áreas endêmicas, a proporção de positivos para o país foi de 0,27% e 3,28% nos municípios com mais ou menos 500.000 habitantes, respectivamente. Já nas áreas não endêmicas foram respectivamente de 0,05% e 0,13%. Os estados que mostravam proporção de positivos acima de 1% foram, por ordem decrescente, Sergipe (8,19%), Minas Gerais (3,86%), Alagoas (2,31%), Bahia (2,19%), Pernambuco (2,14%) e Rio de Janeiro (1,65%). Abaixo de 1%, pela ordem, Espírito Santo (0,71%), Mato Grosso do Sul (0,19%), Paraíba (0,18%), Maranhão (0,13%), São Paulo (0,04%), sendo Pará, Rio Grande do Norte e Distrito Federal 0,02% cada (Katz 2018). Dados publicados pela Organização Mundial de Saúde indicam que o número anual estimado de indivíduos infectados e que requerem tratamento preventivo no Brasil é 1,6 milhões de pessoas, sendo que a grande parte destes indivíduos são crianças em idade escolar (WHO 2020). Entretanto, vale ressaltar que este inquérito foi realizado com a técnica de Kato-Katz, que apresenta baixa eficácia para identificação de pessoas com baixa carga parasitária (Oliveira *et al.* 2018). Apesar dos grandes avanços no controle da esquistossomose mansoni e na melhoria das condições de moradia e saneamento básico, esta é uma doença com transmissão ativa, não só em áreas de alta endemicidade, mas também em áreas anteriormente não endêmicas (King & Dangerfield-Cha 2008).

2.2.2 *S. mansoni*: desenvolvimento e resposta imune

Schistosoma mansoni possui ciclo heteroxênico, cujo desenvolvimento depende de um hospedeiro intermediário – moluscos do gênero *Biomphalaria* – e do hospedeiro definitivo, onde ocorre o ciclo de vida sexuado do parasito. No Brasil, três espécies de gastrópodos do gênero *Biomphalaria*, a citar: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, são encontradas naturalmente infectadas e podem funcionar como hospedeiros intermediários deste trematódeo, enquanto o homem tem sido considerado o hospedeiro definitivo que apresenta maior relevância epidemiológica no país (Paraense 2001; Gryseels *et al.* 2006). O desenvolvimento de *S. mansoni* foi inicialmente estudado por Pirajá da Silva (1908) e Lutz (1919). Como mostra a **figura 4**, os ovos do parasito eliminados nas fezes do hospedeiro infectado entram em contato

com a água e liberam o miracídio, larva ciliada que penetra no hospedeiro intermediário, molusco *Biomphalaria* sp. Durante a penetração, miracídios perdem as placas ciliadas e se transformam em esporócitos, que após gerações de multiplicações assexuadas formam milhares de cercárias, que são liberadas no meio aquático, e constitui a forma infectante para o hospedeiro definitivo (Souza *et al.* 2011; Gryseels 2012; Colley *et al.* 2014). As cercárias penetram ativamente através da pele do hospedeiro e se transformam em esquistossômulos, após 5-7 dias eles migram preferencialmente através da circulação sanguínea para os pulmões e daí até o sistema porta hepático, onde os vermes se desenvolvem, acasalam e migram para as veias mesentéricas para iniciar a postura de ovos e a eliminação nas fezes é visto a partir do 35º dia de infecção (Coelho *et al.* 1995; Siqueira- Batista *et al.* 1998; Lenzi *et al.* 2008; Souza *et al.* 2011; Colley *et al.* 2014; Schwartz & Fallon 2018).

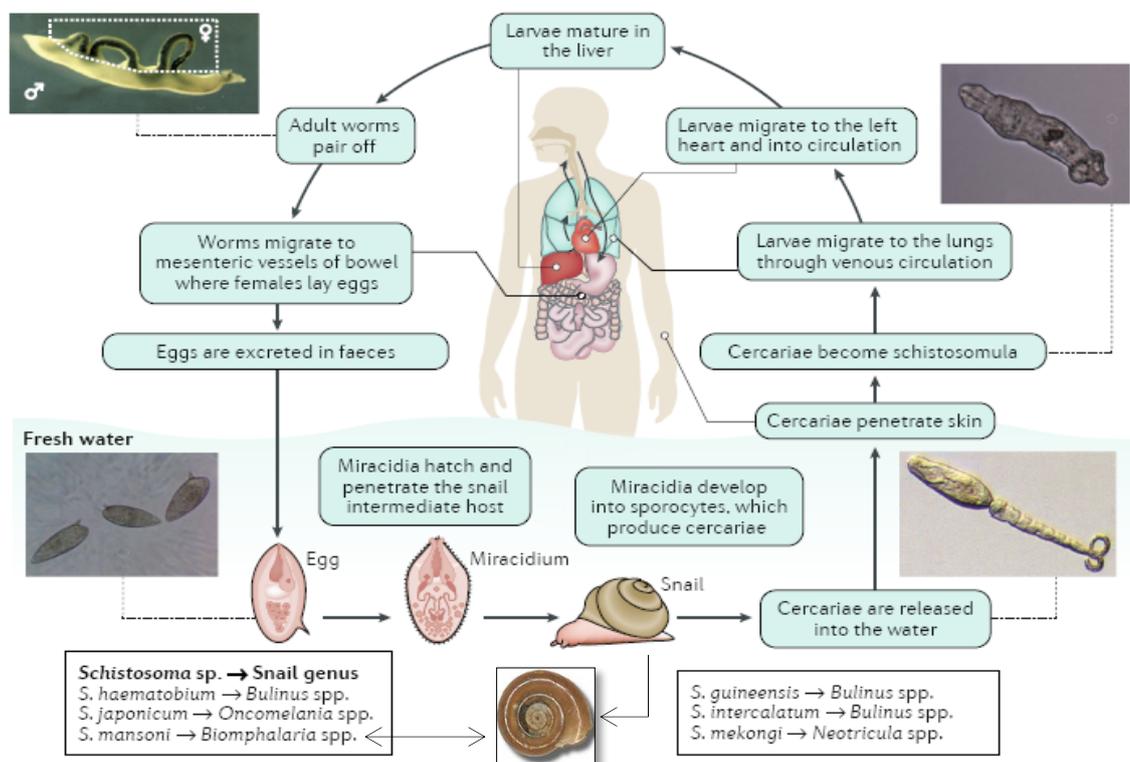


Figura 4. Ciclo biológico de *S. mansoni*. (FONTE modificado de McManus *et al.* 2018).

Durante as primeiras cinco semanas, período pré-patente da esquistossomose, há a migração dos esquistossômulos e maturação dos vermes adultos. Nesta fase, desenvolve-se uma resposta imune de perfil predominantemente Th1, caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ), interleucinas 2 (IL-2), IL-1, IL-6, IL-12, e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Mosmann *et al.* 1986; Pearce *et al.* 1991; Pearce & Macdonald 2002; Wynn *et al.* 2004; Wilson *et al.* 2007; Schwartz *et al.* 2014; Schwartz &

Fallon 2018), induzida principalmente por antígenos de esquistossomulos e vermes (Grzych *et al.* 1991; Pearce *et al.* 1991). Na infecção humana, o período pré-patente da esquistossomose pode resultar em aumento das citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 (Côrrea-Oliveira *et al.* 2000; De Jesus *et al.* 2002; Pearce & MacDonald 2002). Nesta fase, o paciente é geralmente assintomático, especialmente os residentes em áreas endêmicas que são sensibilizados por produtos do parasito ainda “*in útero*”, como consequência da infecção materna. Esta exposição precoce possibilita que estes indivíduos, quando infectados, respondam de forma mais modulada em relação a indivíduos de áreas não endêmicas (Novato-Silva *et al.* 1992; Andrade 2008). Entretanto, alguns indivíduos, especialmente os não residentes em áreas endêmicas, podem apresentar um quadro febril, acompanhado de mal-estar com extrema prostração, calafrios, sudorese, fadiga, mialgia, dores de cabeça, náuseas, vômitos, anorexia, tosse não produtiva, eventualmente com crise asmátiforme (Hiatt *et al.* 1979; Coura *et al.* 1970; Ross *et al.* 2002; Schwartz & Fallon 2018). Os pacientes também podem apresentar um quadro inicial de hipersensibilidade em resposta à penetração da cercaria, conhecida como dermatite cercariana, que geralmente acontece em indivíduos previamente expostos a antígenos de cercária (Lambertucci *et al.* 2005; Gryseels *et al.* 2006; Caldas *et al.* 2008).

Sintomas abdominais, como diarreia com numerosas evacuações e eosinofilia, aparecem depois devido à migração dos vermes e início da postura dos ovos (Gryseels *et al.* 2006). Os vermes adultos (macho e fêmea) acasalados habitam as veias mesentéricas inferiores, onde iniciam a ovipostura a partir de 30-35 dias após a infecção; estima-se que os vermes adultos vivem em média 5,7 a 10,5 anos e produzem 150-400 ovos por dia (Fulford *et al.* 1995; Prata 2007; Lenzi *et al.* 2008; Souza *et al.* 2011; Gryseels 2012). Aproximadamente $\frac{1}{3}$ dos ovos são eliminados pelas fezes, mas a grande maioria deles fica retida na mucosa intestinal ou permanecem na circulação mesentérica, sendo carregados e acumulam-se em alguns órgãos, principalmente no fígado (Boros & Warren 1970; Cheever *et al.* 1994; Colley *et al.* 2014).

Com o início da ovipostura, entre a 4^a e a 5^a semana da infecção e a contenção de uma parte dos ovos, ocorre uma mudança no perfil das citocinas circulantes e a resposta imune torna-se predominantemente Th2 (Grzych *et al.* 1991; Pearce *et al.* 1991). A resposta Th2 é induzida por antígenos secretados pelo ovo do parasito, e o seu desenvolvimento é acompanhado pela diminuição da resposta Th1, induzida predominantemente por antígenos específicos das larvas e vermes (Pearce *et al.* 1991).

A resposta Th2 é responsável pela formação de granulomas, processo inflamatório que gera estruturas organizadas ao redor dos ovos que permitem a contenção de enzimas, como ω -1, IPSE/ α -1, lacto-*N*-fucopentaose III secretadas pelos ovos do parasito em desenvolvimento,

que são lesivas aos tecidos do hospedeiro (Boros & Warren 1970; Dunne *et al.* 1991; Wang *et al.* 2010; Hams *et al.* 2013; Colley *et al.* 2014; Costain *et al.* 2018). Além disso, a formação do granuloma auxilia na preservação da parede intestinal, prevenindo uma subsequente invasão bacteriana durante a infecção (Fallon *et al.* 2000; Schwartz & Fallon 2018). Nesta fase ocorre expansão de células Th2, eosinófilos e basófilos, e aumento na produção das interleucinas 4 e 5 (IL-4, IL-5), que reflete na estimulação da produção de IgE (imunoglobulina E), IgG1, como também na polarização de macrófagos M2 (Mosmann 1992; Schwartz *et al.* 2014). Além destas citocinas há também um aumento na produção de IL-10 e IL-13 (Pearce *et al.* 1991; Pearce & Macdonald 2002; Bartley *et al.* 2006). A produção de IL-4 é determinante na estimulação da produção de outras citocinas da resposta Th2, como IL-5 e IL-13, e na definição da infiltração celular, da organização do granuloma e do desenvolvimento de fibrose (Cheever *et al.* 1998; Yamashita & Boros 1992; Kaviratne *et al.* 2004). IL-4, IL-5 e IL-13 estimulam a multiplicação dos fibroblastos e a diferenciação de miofibroblastos, que produzem componentes da matriz extracelular (ECM) essenciais para a remodelação tecidual nas áreas lesadas (Tiggelman *et al.* 1995; Burke *et al.* 2009; Hams *et al.* 2013). Por outro lado, a resposta inflamatória formada ao redor dos ovos disseminados do parasito é fator determinante no desenvolvimento da patologia durante a fase crônica da esquistossomose, já que uma resposta Th2 intensa e prolongada pode contribuir para o desenvolvimento da fibrose hepática e evolução do quadro hepatoesplênico (Cheever *et al.* 2000; Hams *et al.* 2013; Schwartz & Fallon 2018). Assim, o granuloma mediado pela resposta Th2 é um mal necessário para a sobrevivência do hospedeiro, uma vez que se os ovos não são confinados de forma eficaz, os antígenos secretados podem provocar danos extensos nos tecidos do hospedeiro ainda na fase aguda da esquistossomose; entretanto, granulomas não modulados podem agravar o quadro da esquistossomose crônica. Portanto, é imprescindível manter o equilíbrio adequado das respostas Th1/Th2 para controlar as lesões excessiva da esquistossomose (Zheng *et al.* 2020).

O desenvolvimento da resposta imune durante a infecção aguda e crônica por *S.mansoni* está associada também a ativação das células Th17. Durante a infecção aguda, é visto que a indução das células Th17 é especificamente através dos antígenos liberados pelos vermes adultos (Soloviova *et al.* 2019). Quando há início da deposição dos ovos e formação dos granulomas, é sabido que os antígenos liberados pelos ovos induzem principalmente a resposta Th2, entretanto, este processo também está associado a resposta Th17 e aos altos níveis de uma das principais citocinas produzidas pelas células Th17, a IL-17 que contribue para o agravamento da resposta imunopatológica associada à esquistossomose (Grzych *et al.* 1991; Rutitzky *et al.* 2005; Harrington *et al.* 2005; Kalantari *et al.* 2019; Zheng *et al.* 2020). Na

infecção experimental por *S.mansoni* em camundongos deficientes para IL-17 ou IFN- γ foi demonstrado uma estreita associação destas duas citocinas; na ausência de IL-17 a infecção pelo parasito resultou em aumento dos níveis de IFN- γ mas com redução na imunopatologia da esquistossomose, enquanto que em camundongos deficientes em IFN- γ a infecção experimental resultou em uma severa imunopatologia associada aos níveis elevados de IL-17. Estes dados indicam que IL-17 desempenha um papel patogênico poderoso na imunopatologia grave na esquistossomose murina que normalmente é restringido pela produção de IFN- γ (Rutitzky & Stadecker 2011). A citocina IL-17 está relacionada a modelos de fibrose hepática, por aumentar a expressão de TGF- β 1, citocina pró-fibrótica, que induz diretamente a produção de colágeno do tipo I pelas células estreladas hepáticas pela via de ativação de STAT3, o que pode estar intimamente associada à severidade da esquistossomose (Meng *et al.* 2012).

Posteriormente, após 10-12 semanas de infecção, ocorre uma gradual regulação da função das células T CD4⁺ resultando na redução do tamanho do granuloma ao redor dos ovos, caracterizando o início da fase crônica de esquistossomose (Andrade & Warren 1964; Schwartz & Fallon 2018). A modulação da resposta imune em infecções por *S. mansoni* é consequência da ativação de diversos mecanismos reguladores, muitos dos quais mediados pela produção de IL-10, que resulta na redução da imunopatologia associada à esquistossomose e pode favorecer a sobrevivência do hospedeiro (Chuah *et al.* 2014). Desta forma, a maioria dos pacientes evolui para fase crônica leve ou intestinal; entretanto, alguns pacientes podem apresentar a forma grave da doença.

Os fatores que levam alguns pacientes a desenvolverem a forma grave da doença ainda não estão totalmente esclarecidos e o aprimoramento deste conhecimento é primordial para o desenvolvimento de métodos eficientes de tratamento da esquistossomose. Segundo Abath *et al.* (2006), múltiplos fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento de formas graves. A carga parasitária e a exposição às re-infecções estão entre as principais causas da evolução para forma grave (Bina & Prata 2003; Carvalho & Andrade 2005; Andrade 2008), porém outros fatores genéticos e imunológicos também são determinantes na gravidade da esquistossomose, salientando a importância do equilíbrio entre as respostas imunes Th1/Th2/Th17 e regulatória para que o granuloma desempenhe um papel protetor ao hospedeiro definitivo (Butterworth *et al.* 1985; Cheever *et al.* 1987; Dessein *et al.* 1999; Dunne & Pearce 1999). Assim, torna-se evidente a necessidade de estudar os mecanismos locais que induzem a resposta imune e contribuem para diferenciação da resposta Th2 e, posteriormente, para sua modulação e resolução.

2.2.3 Granuloma esquistossomótico

Os ovos de *Schistosoma mansoni* são estruturas rígidas, envoltas por uma rede de proteínas reticuladas, e possuem um espículo lateral protuberante, que ainda não apresenta funções esclarecidas durante o processo de migração (Costain *et al.* 2018). Funcionalmente, os ovos são estruturas metabolicamente ativas e altamente antigênicas que constitutivamente secretam uma variedade de substâncias tóxicas e glicoproteínas, como ômega-1, IPSE/alpha-1 e kappa-5, que facilitam a passagem dos ovos pelas vênulas e tecidos para alcançar o lúmen intestinal e serem eliminados nas fezes (Ashton *et al.* 2001). Entretanto, a lesão do endotélio dos vasos e do epitélio intestinal permite a liberação de citocinas denominadas alarminas, como IL-33, que estimulam células da resposta imune inata à produzirem precocemente citocinas do tipo-2, como IL-13 e IL-5. Com isso, aumentam a expressão de moléculas de adesão (denominadas de CAM- moléculas de adesão celular) em leucócitos e células endoteliais, além de recrutarem uma variedade de outras células imunes, como linfócitos T CD4+, eosinófilos, macrófagos, células dendríticas, mastócitos, e também ativarem células dos órgãos afetados, como as células do estroma e fibroblastos (Teixeira *et al.* 2001; Hams *et al.* 2013; Costain *et al.* 2018; McManus *et al.* 2018; Figliuolo da Paz *et al.* 2019). Este conjunto de células juntamente com o acúmulo de citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) induzem a produção e deposição de uma matriz extracelular heterogênea, formando uma estrutura esférica e compacta que conterà a ação tóxica e lesiva dos ovos de *S. mansoni*, denominado de granulomas (Boros & Warren 1970; Lenzi *et al.* 2008; Costain *et al.* 2018).

A formação do granuloma envolve interações dinâmicas e intrincadas entre célula-célula e célula-matriz, que sofrem profundas modificações no decorrer da infecção. Os granulomas esquistossomóticos podem ser encontrados em diversos órgãos do hospedeiro, como fígado, intestinos, pulmões, bexiga, cérebro, pele, glândulas adrenais, músculos esqueléticos, linfonodos, baço, rins e estômago (Cheng 1993; Ross *et al.* 2002). Como a grande parte dos ovos são embolizados no sistema porta, um dos principais órgãos afetados na esquistossomose é o fígado, conseqüentemente as células residentes deste órgão apresentam importantes funções frente à doença (Cheng 1993; Ross *et al.* 2002). As células estreladas hepáticas (HSC) são o principal tipo de célula responsável pela deposição de colágeno e formação de fibrose no tecido hepático (Carson *et al.* 2018). Elas compõem 5-8% das células do fígado (Geerts 2001), sendo que na forma quiescentes (qHSC) estocam aproximadamente 80% de toda a vitamina A produzida pelo corpo (Hendriks *et al.* 1985; Hendriks *et al.* 1988),

além de secretarem eritropoietina que é o primeiro fator de crescimento envolvido na geração de células sanguíneas (Maxwell *et al.* 1994). Após estimulação, as células qHSC sofrem processo de transdiferenciação em miofibroblastos e iniciam a produção de colágeno no fígado. HSCs ativadas perdem a capacidade de estocarem vitamina A, desenvolvem um citoplasma mais amplo e alongado, aumentam a expressão de α SMA (α -smooth muscle actin) e de outros genes profibróticos (Bachem *et al.* 1992).

A ativação de HSC é influenciada por uma variedade de sinais derivados das células residentes do fígado e de células recrutadas para o tecido, como também sinais autócrinos e parácrino de outras HSC. Algumas citocinas profibróticas liberados por vários tipos de células, como TGF- β 1, CTGF (connective tissue growth factor), IL-33 e IL-13, são ativadores de HSC, desencadeando a produção de colágeno e a expressão e liberação de outras citocinas e quimiocinas como CCL5, CCL11, CCL2. TGF- β 1 ativa HSC pela interação com o receptor de superfície celular T β RI e T β RII, após a ativação esses receptores facilitam o recrutamento e ativação de Smad2 e Smad3 que formam um complexo chamado de Smad4 e migram para o núcleo induzindo a expressão de genes fibróticos (Carson *et al.* 2018). Entretanto, as HSC podem expressar esses genes profibróticos por ativação de uma via independente de TGF- β 1 (Kaviratne *et al.* 2004). Ao serem lesionados os hepatócitos liberam IL-33 que ativa as células linfóides inatas (ILC2) a produzirem IL-13, esta citocina por sua vez, interage com seu receptor IL-13R α 2 ativando um complexo de receptores ERK1- ERK2 e ALK que então ativará o Smad2 e Smad3 e sinaliza a expressão de genes prófibróticos como colágeno I e III, metaloproteinases de matriz (Liu *et al.* 2011; Mchedlidze *et al.* 2013; Carson *et al.* 2018). Chang e colaboradores (2006) mostraram evidências da influência das HSC na esquistossomose hepática e formação do granuloma pela demonstração do aumento das HSCs presentes no fígado murino e humanos infectados com *S.mansoni* comparado aos camundongos e humanos saudáveis. As interações entre HSCs e os ovos de *S.mansoni* são complexas e diversas e a melhor compreensão destas interações leva a melhora da resolução desta doença.

Além das células residentes, os granulomas esquistossomóticos são compostos por diversas células imunes inatas e adaptativas que são recrutadas e/ou ativadas no decorrer do processo de formação e modulação do granuloma esquistossomótico, como células dendríticas, células linfóides inatas do tipo 2 (ILC-2), basófilos, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e macrófagos.

As células dendríticas desempenham um papel fundamental para a associação da resposta imune inata com a adaptativa (Yamazaki *et al.* 2003). Na esquistossomose, estas células são de fundamental importância devido a sua eficiência na detecção, captura e

processamento dos antígenos de ovos de *S.mansoni* para apresentação para células T virgens, resultando na capacidade de polarização da resposta Th2 tanto *in vivo* como *in vitro* (MacDonald *et al.* 2001; de Jong *et al.* 2002; Lopes *et al.* 2019). Estas células respondem principalmente a proteína Ômega-1 (ω 1), α 1/IPSE e Lewis(X)- containing lacto-N-fucopentaose III (LNFPIII), liberada pelos ovos para ativação da resposta Th2, ou seja, quando há uma diminuição destas células durante o decorrer da infecção acarreta na deficiência da polarização da resposta Th2 e conseqüentemente maiores danos ao hospedeiro infectado (Everts *et al.* 2009; Steinfelder *et al.* 2009; Hams *et al.* 2013; Hams *et al.* 2016; Schwartz & Fallon 2018).

As células linfóides inatas tem sido separadas funcionalmente em três grupos, as ILC1, que participam na indução e amplificação da resposta do tipo 1 via liberação de IFN- γ e TNF- α (Klose & Artis 2016; Ebbo *et al.* 2017), as ILC2 que tem papel fundamental na indução da resposta Th2 durante a infecção por nematódeos e em quadros alérgicos (Klose & Artis 2016, Moro *et al.* 2010; Kubo 2017; Kato 2019) e as ILC3 estão relacionadas a resposta Th17 e são essenciais para manutenção da homeostase intestinal (Klose & Artis 2016; Ebbo *et al.* 2017; Kato 2019). Na ausência combinada de IL-25 e IL-33, a ativação das ILC2 não é eficiente e camundongos experimentalmente infectados são incapazes de produzir a resposta protetora responsável pela expulsão de *Nippostrongylus brasiliensis*, demonstrando a importância desta via no desenvolvimento da resposta do tipo 2 (Neil *et al.* 2010). As ILC2 quando ativadas pelas alarminas IL-25, IL-33 e TSLP produzem IL-5 e IL-13, citocinas determinantes no desenvolvimento da infecção por *S.mansoni* (Schwartz & Fallon 2018).

Evidências experimentais indicam que a deleção individual de cada uma dessas alarminas não altera significativamente a formação de granuloma hepático na esquistossomose crônica, quando se administrou anticorpo neutralizante para bloquear IL-25 em camundongos DKO (duplo knockout de TSLP^{-/-} e IL-33^{-/-}), a ausência destas três citocinas combinadas levou à redução da fibrose hepática, diminuição do recrutamento de eosinófilos e da produção de IL-13 pelas ILC2 (Vannella *et al.* 2016). Dados apresentados por Hams e colaboradores (2014) demonstram a participação de IL-25 na ativação de ILC2 e produção de IL-13 no pulmão, resultando no desenvolvimento de fibrose pulmonar murina (Hams *et al.* 2014). Estudo semelhante em modelo experimental de fibrose hepática induzida pela administração de CCL4 ou por BDL (ligação do ducto biliar) demonstrou que a ativação de ILC2 pela interação com IL-33 resultou em aumento de IL-13 e indução de fibrose hepática murina (Mchedlidze *et al.* 2013). Entretanto, ainda são necessários mais estudos para elucidar o papel da produção de IL-

33 e da ativação de populações de ILC na formação do granuloma hepático e da fibrose induzida pela infecção por *S. mansoni*.

Entre as células que são recrutadas durante a formação do granuloma, eosinófilos e macrófagos são predominantes na reação e que também merecem ser melhor investigadas. Os eosinófilos são células do sistema imune inato, produzidas e diferenciadas na medula óssea, e que se encontram amplamente distribuídos nos tecidos. O número de eosinófilos no sangue e nos tecidos aumenta especialmente em respostas às infecções helmínticas e doenças alérgicas, incluindo a asma (Huang *et al.* 2014). O recrutamento destas células para o sítio da infecção é mediado principalmente pela quimiocina CCL11 (Chuah *et al.* 2014). A eosinofilia está associada a respostas imunes mediadas por células Th2, onde citocinas como IL-4 e especialmente IL-5, estimulam a proliferação e a ativação de eosinófilos. Com base em sua capacidade de degranular e liberar proteínas de grânulos catiônicos verificou-se que os eosinófilos podem exercer funções helmintotóxicas e contribuir no controle de algumas helmintoses (Weller & Spencer 2017). Quando estimuladas, além de degranulação exocitótica de proteases e mediadores imunológicos, os eosinófilos são fontes de uma ampla variedade de citocinas que alteram o processo inflamatório local (Weller & Spencer 2017).

Nas últimas décadas, dados obtidos *in vivo* e *in vitro* indicam que eosinófilos também podem atuar como células apresentadoras de antígenos em algumas situações particulares (Hansel *et al.* 1992; Mawhorter *et al.* 1994; Del Pozo *et al.* 1992, Padigel *et al.* 2007). As APCs são classificadas como APCs profissionais e APCs não profissionais, os eosinófilos enquadram-se nas APCs não profissionais, que são aquelas que só expressam MHC II e moléculas co-estimulatórias após ativação por citocinas, como GM-CSF, IL-4, IFN- γ e IL-5, que então permite o processamento e apresentação de antígenos por estas células (Hansel *et al.* 1992; Mawhorter *et al.* 1994; Long *et al.* 2016). Sabin e colaboradores (1996) demonstraram que os eosinófilos ativados por IL-5 migram para o sítio de liberação dos antígenos e ativam a produção de IL-4 que participam no desenvolvimento de células Th2 pela interação com antígenos específicos dos ovos de *S.mansoni*.

No modelo de inoculação intravenosa de ovos de *S.mansoni*, os eosinófilos contribuem com aproximadamente 70% da celularidade presente no granuloma pulmonar após 16 dias da inoculação (Moore *et al.* 1977; Chuah *et al.* 2014). Na esquistossomose, é visto um pico de eosinófilos na 8ª semana de infecção e o declínio inicia a partir da 10ª semana (Colley *et al.* 1975). Há diversos debates em relação ao papel destas células, pois alguns estudos sugerem que os eosinófilos atuam como células efetoras no controle de *S.mansoni*, outros indicam seu papel como imunomoduladores da resposta imune, ou ainda com uma importante função na

remodelação tecidual ou remoção de detritos após a lesão devido ao encalhamento dos ovos (Meeusen & Balic 2000; Cadman & Lawrence *et al.* 2010; Huang & Appleton 2016; Tweyongyere *et al.* 2016). Outra possível função dos eosinófilos presentes nos granulomas é a destruição dos miracídios presentes dentro dos ovos que ficaram retidos (Hsu *et al.* 1980), o que explicaria a grande abundância destas células nos granulomas hepáticos e intestinais (Moore *et al.* 1977; Weinstock & Boros 1983; Amaral *et al.* 2017). Swartz e colaboradores (2006) utilizando camundongos Δ dblGATA e TgPHIL infectados com *S.mansoni*, indicaram que a ausência de eosinófilos não altera significativamente a recuperação de vermes adultos e ovos retidos no fígado, nem o tamanho e o número de granulomas hepáticos e as transaminases hepáticas ALT e AST mantiveram-se semelhantes bem como as marcas medidas de fibrose. Em relação à carga parasitária, dados semelhantes foram observados em trabalhos desenvolvidos em nosso laboratório utilizando camundongos Δ dblGATA infectados com *S.mansoni*. Estes dados confirmam que os eosinófilos não são essenciais no controle da carga parasitária; entretanto, a ausência destas células resultou em alterações na modulação do granuloma e na evolução da doença (Oliveira 2016).

Finalmente, diferentes estudos demonstram que macrófagos são células que podem adotar um perfil pró- ou anti-inflamatório, dependendo do microambiente em que se encontram. No contexto da esquistossomose, estas células tem papel fundamental na formação e modulação dos granulomas. Os macrófagos residentes são estimulados pelos antígenos liberados pelos ovos (SEA) a secretarem citocinas inflamatórias e quimiocinas que estimulam o influxo de linfócitos, neutrófilos e monócitos, iniciando assim, a inflamação granulomatosa circunvalente (Burke *et al.* 2010). Portanto, são células que participam do início ao fim da resposta imune desenvolvida durante a esquistossomose, sendo fundamentais para evolução da doença. Vale também salientar que alguns subtipos de macrófagos M2, expressam o receptor ST2 e respondem a IL-33. Na esquistossomose, os macrófagos são pontos chave para regular a fibrogênese pela secreção de quimiocinas que recrutam fibroblastos estimulando a sua ativação e diferenciação, participando no processo de reparação tecidual (Wynn & Barron 2010; Wynn & Vanella 2016). Desta forma, a interação dos macrófagos com a esquistossomose é um dos focos deste trabalho.

2.2.4 Macrófagos e o granuloma

Os macrófagos são as células encontradas nos granulomas intestinais e constituem cerca de 30% das células que compõem o granuloma hepático (Weinstock *et al.* 1983; Ragheb & Boros 1989; Hesse *et al.* 2000). São células hematopoiéticas especializadas que estão distribuídas por diferentes tecidos e órgãos, onde desempenham papel importante na homeostase, remodelação de tecido e na defesa contra patógenos (Kurowska-Stolarska *et al.* 2009; Bonnardel & Williams 2018).

Dependendo do tipo de citocinas produzida no microambiente em que os macrófagos se encontram, eles podem ser diferencialmente ativados em M1 ou CAM ϕ s (ou classicamente ativado) e M2 ou AAM ϕ s (alternativamente ativados), conforme ilustra a **figura 5** (Strauss-Ayali *et al.* 2007). A exposição de monócitos naïve ou macrófagos a citocinas do perfil Th1, como IFN- γ , TNF, ou a lipopolissacarídeos (LPS) promove o desenvolvimento de M1. Esta população de macrófagos ativados secreta citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 e algumas quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8, CCL9 e CCL10 que promovem o recrutamento de células NK e a amplificação do recrutamento e ativação de linfócitos Th1. Além disso, os M1 produzem óxido nítrico sintase (iNOS) que participa do metabolismo de arginina em óxido nítrico e citrulina, e conseqüentemente, liberação de altos níveis de espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Duque & Descoteaux 2014). Portanto, os macrófagos M1 estão associados a quadros inflamatórios desencadeados pela resposta imune tipo 1, criando um ambiente altamente microbicida o que os torna potentes células efectoras contra patógenos intracelulares e células tumorais (Kurowska-Stolarska *et al.* 2009; Duque & Descoteaux 2014; Shapouri-Moghaddam *et al.* 2018). Em geral, os M2 (AAM ϕ s) são ativados pela exposição a citocinas de perfil Th2, IL-4 e IL-13, e podem desencadear a liberação de diferentes quimiocinas como CCL17, CCL22, CCL24 e CCL1 que por sua vez promovem um processo inflamatório propício à reparação e remodelação tecidual (Mantovani *et al.* 2004; Duque & Descoteaux 2014; Shapouri-Moghaddam *et al.* 2018).

Estes macrófagos são caracterizados pela expressão de receptores de manose (CD206), pela produção de citocinas como IL-10 e TGF- β (Duque & Descoteaux 2014) e pela produção de arginase 1 (Arg1), enzima que participa do ciclo da uréia, convertendo a L-arginina em L-ornitina, sendo a L-ornitina descarboxilase (ODC) responsável pela produção de poliaminas importantes na divisão celular e a L-ornitina aminotransferase (OAT) para o fornecimento de prolina para a síntese de colágeno, que posteriormente pode contribuir para evolução da fibrose (Hesse *et al.* 2001; Kurowska-Stolarska *et al.* 2009; Munder 2009; Röszer 2015). Estudos mais recentes revelam que macrófagos M2 podem ser divididos em três grupos: M2a são macrófagos ativados por IL-4, IL-13 ou IL-21 (Gordon 2003; Biswas & Mantovani 2010; Gundra *et al.*

2014) e expressam uma série de quimiocinas que promovem o recrutamento de células Th2, eosinófilos e basófilos (Duque & Descoteaux 2014); M2b são macrófagos ativados por uma combinação de LPS, imuno complexos, células apoptóticas e IL-1Ra (Gordon 2003; Benoit *et al.* 2008; Duque & Descoteaux 2014) e expressam altos níveis de IL-10, bem como citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-6, e iNOS. Os M2c são ativados por IL-10, TGF- β ou glucocorticóides (Gordon 2003; Benoit *et al.* 2008), e secretam IL-10 e TGF- β , citocinas imunossupressoras que permitem o desenvolvimento de linfócitos Th2 e Tregs (Duque & Descoteaux 2014). As funções de M2c estão relacionadas ao reparo tecidual e angiogênese, devido à expressão de altos níveis de arginase (Arg-1), de mediadores anti-inflamatórios, como IL-10 e glucocorticóides, em resposta a liberação IL-33, IL-25, adenosina e pelo fator de crescimento (GM-CSF) causada por danos teciduais (Gordon 2003; Lang *et al.* 2002; Mosser & Edward 2008; Martinez *et al.* 2009; Biswas & Mantovani 2010; Zhang *et al.* 2010). A capacidade dos M2c de induzirem Tregs os fazem mais eficazes do que os M2a para a proteção dos órgãos contra danos causados por infiltrados inflamatórios (Lu *et al.* 2013).

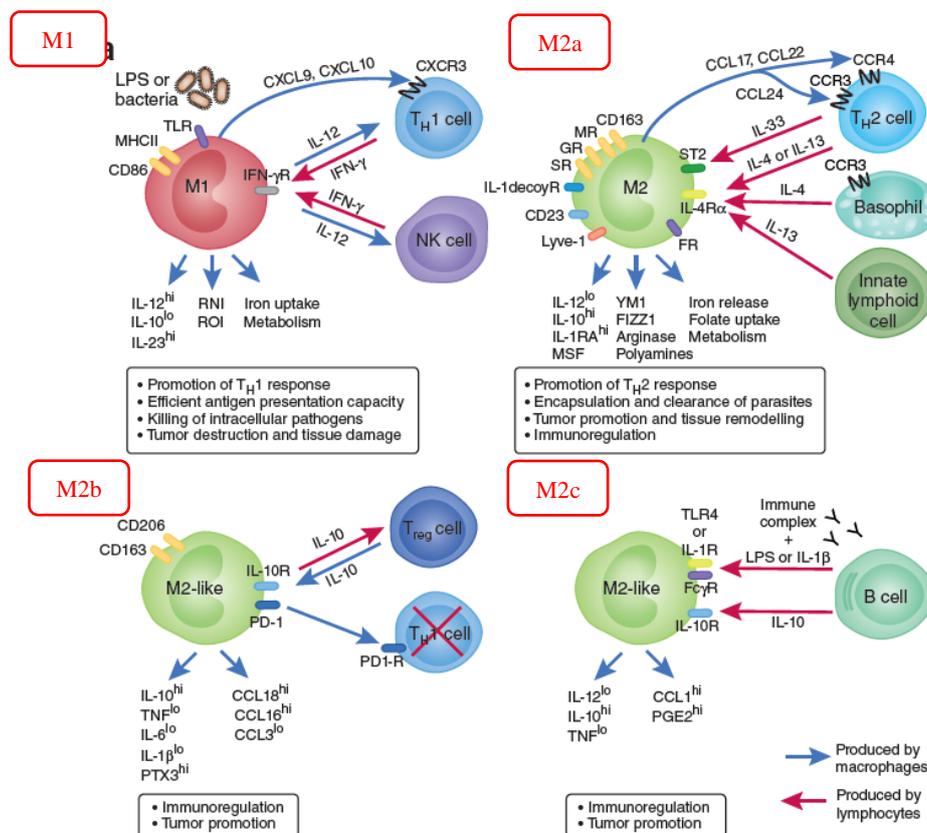


Figura 5. Diferenciação dos subtipos de macrófagos. Conforme o microambiente em que se encontram os macrófagos são diferenciados entre M1 ou M2a, b ou c. Os diferentes tipos de macrófagos liberam uma grande variedade de citocinas e quimiocinas que promovem a inflamação e muitas vezes a destruição tecidual ou a cicatrização de feridas e reparação do tecido lesionado. (FONTE: Biswas & Mantovani 2010).

Macrófagos alternativamente ativados participam em vários processos patofisiológicos (Mosser & Edward 2008; Allen & Wynn 2011), mas são particularmente essenciais na resposta contra danos teciduais causados por helmintos, como *S. mansoni* (Herbert *et al.* 2004), *Heligmosomoides polygyrus* (Anthony *et al.* 2006), *Nippostrongylus brasiliensis* (Reece *et al.* 2006), *Taenia crassiceps* (Rodriguez-Sosa *et al.* 2002), *Trichinella spiralis* (Dzik *et al.* 2004), *Fasciola hepatica* (Donnelly *et al.* 2005), *Ascaris suum* (Oshiro *et al.* 2005) e filárias (Nair *et al.* 2003).

Na infecção por *S.mansoni*, os ovos induzem granulomas ricos em macrófagos alternativamente ativados (M2) que, juntamente com outros elementos da resposta Th2, previnem a mortalidade do hospedeiro durante a fase aguda da esquistossomose; entretanto, a ativação excessiva da resposta Th2, com consequente diferenciação de M2, é capaz de levar a quadros de fibrose na fase crônica da esquistossomose, podendo evoluir para formas graves de hepatoesplenomegalia (Pearce & MacDonald 2002; Wynn *et al.* 2004; Knuhr *et al.* 2015).

Camundongos deficientes em IL-4, IL-4/13, IL-4/10, ou IL-4R α morrem durante a fase aguda da infecção por *S.mansoni*, pois desenvolvem uma severa patologia intestinal e hepática. Os AAM ϕ s são necessários para sobrevivência e proteção do hospedeiro durante a fase aguda da infecção, pois a falta da sua ativação pode levar a redução da integridade da barreira intestinal causando endotoxemia, além de causar a exacerbação da resposta do tipo Th1, aumentando a ativação de CAM ϕ s. Os AAM ϕ s também participam na redução da morbidade e mortalidade durante a fase crônica da infecção, pois apesar de ativarem Arg-1 que pode desencadear quadros de fibrose hepática, essa expressão de Arg-1 atua também em um feedback negativo nas células Th2 e nos fibroblastos, reduzindo a cicatrização e a patologia tecidual (Barron & Wynn 2011).

Infecções experimentais com *S. mansoni* mostraram que ao deletarem Arg-1 dos macrófagos, os camundongos apresentaram alta taxa de mortalidade, devido ao aumento da proliferação de linfócitos T que levou à exacerbação da resposta Th2, consequentemente um aumento da inflamação granulomatosa, da fibrose hepática e da hipertensão portal e baixa diferenciação dos AAM ϕ s. Indicando que macrófagos que expressam Arg-1 também funcionam como moduladores de inflamação e fibrose em infecções de perfil Th2, como por exemplo, a esquistossomose (Pesce *et al.* 2009).

Dados semelhantes foram observados por Nair e colaboradores (2009) no modelo de esquistossomose pulmonar em camundongos deficientes na expressão de *Relm-a* (Retnla^{-/-}), outra marca característica da ativação de AAM ϕ s. A inoculação intravenosa de 5.000 ovos de *S.mansoni* nestes animais resultou na exacerbação da inflamação dos pulmões caracterizada pelo aumento da vascularização pulmonar, dos granulomas e da fibrose. Além disso, estes

animais apresentaram um aumento de linfócitos T CD4⁺ que resultou na produção de níveis elevados de citocinas Th2. Mais uma vez, os dados sugerem que a ativação de AAMφs tem importante papel na regulação da resposta de linfócitos T e limitação da patogenicidade da doença. Estes estudos, portanto, indicam que ativação de AAMφs são importantes para formação do granuloma esquistossomótico, mas também essenciais para sua modulação e sobrevivência do hospedeiro.

Desta forma, tem-se demonstrado que macrófagos, fibroblastos, HSCs têm papel fundamental na evolução da fibrose esquistossomótica (Ragheb & Boros 1989; Hesse *et al.* 2000; Carson *et al.* 2018). A fibrose é definida pelo crescimento excessivo e rigidez e/ou cicatrização de vários tecidos e é atribuída ao excesso de deposição de componentes da matriz extracelular, incluindo colágeno (Wynn *et al.* 2004). No caso da esquistossomose, os quadros de fibrose são inicialmente representados por áreas focais pequenas associadas à inflamação crônica induzida pelos ovos do parasito, distribuídos em grande quantidade pela periferia do sistema da veia portal (Andrade 2009). A formação do granuloma hepático e a intensidade da reação, bem como a extensão da fibrose hepática são elementos associados à gravidade da esquistossomose crônica (Teixeira-Carvalho *et al.* 2008). Portanto, as diferentes células que compõe o granuloma periovular e as citocinas produzidas neste ambiente são elementos determinantes na indução da produção de colágeno e nos quadros de fibrose, sendo IL-4, IL-5, IL-13 e TGF-β as citocinas pró-fibróticas mais importantes (Jacobs *et al.* 1998; De Jesus *et al.* 2004; Farah *et al.* 2000). Alguns elementos da resposta imune inata, como a produção de IL-33 e ativação da via IL-33/ST2 também participam deste processo, pois ativam a produção de citocinas como IL-13 responsáveis pela formação dos quadros de fibrose. Como visto, vários estudos têm demonstrado a participação de elementos da resposta imune adquirida na formação e modulação do granuloma, contudo, o papel da resposta imune inata, hepática ou intestinal, neste processo não foi totalmente esclarecido.

2.2.5 IL-33 e a esquistossomose

Uma citocina que vem sendo estudada devido a sua grande importância na resposta imune inata é IL-33. Esta citocina é produzida e se deposita no núcleo de células endoteliais (intestinais e respiratórias), células epiteliais, fibroblastos e miofibroblastos frente a inflamações (Müller *et al.* 2005; Carriere *et al.* 2007; Moussion *et al.* 2008; Kuchler *et al.* 2008;

Pastorelli *et al.* 2010). IL-33 tem sido classificada como uma “alarmina”, ou seja, esta proteína só é liberada no espaço extracelular durante danos celulares, sendo um sinal de alerta de lesão tecidual para outras células e tecidos adjacentes (Liew *et al.* 2010). Durante a apoptose celular, IL-33 intracelular é clivado e inativado por caspases 3 e 7; processo de fundamental importância, pois a inativação de IL-33 durante o processo de apoptose evita a estimulação do sistema imunológico após um processo fisiológico programado (Nunes *et al.* 2014; Cayrol & Girard 2009; Luthi *et al.* 2009).

Para exercer suas funções biológicas, IL-33 liga-se ao seu receptor IL1RL1, também conhecido como ST2 expresso principalmente em mastócitos, ILC2, eosinófilos, basófilos, macrófagos alternativamente ativados, linfócitos Treg, linfócitos Th2, células dendríticas, células natural killer, neutrófilos, linfócitos Th1 e linfócitos T CD8, e desencadeia a resposta imunológica (Schmitz *et al.* 2005; Pastorelli *et al.* 2011; Cayrol & Girard 2018). A via de ativação desta citocina é iniciada quando IL-33 liga-se ao ST2 pareando com o co-receptor IL-1RAcP, permitindo a interação do domínio TIR com MyD88 que pode levar a ativação de duas vias de ativação independentes; uma dependente de cálcio e que resulta na ativação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), e conseqüentemente, na produção de quimiocinas (CXCL2, CCL2, CCL3) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-3, IL-6, TNF), degranulação de mastócitos, produção de prostaglandina D₂ (PGD₂) e leucotrienos B₄ (LTB₄). A outra via é dependente da ativação de proteínas MAP-quinases (MAPK) que estimula a síntese das quimiocinas CCL5, CCL17 e CCL24 e de citocinas do tipo-2, como IL-5 e IL-13 (Liew *et al.* 2010; Liew *et al.* 2016).

A participação da ativação da via IL-33/ST2 tem sido avaliada em diversos modelos de infecções e doenças inflamatórias. Em infecções provocadas por protozoários foi verificado que crianças infectadas com *Plasmodium falciparum* apresentam níveis séricos elevados de IL-33 (Ayimba *et al.* 2011); entretanto, sua participação no controle da infecção ainda é pouco conhecida. Em modelos experimentais, foi verificado que camundongos deficientes no receptor de IL-33 (ST2^{-/-}) se mostram resistentes à infecção por *Leishmania donovani* (Rostan *et al.* 2013); entretanto, estes animais mostram aumento de quadros de encefalite durante a infecção por *Toxoplasma gondii* (Jones *et al.* 2010). A importância da produção de IL-33 também já foi estudada em doenças fúngicas (Le *et al.* 2012; Piehler *et al.* 2013), bacterianas (Alves-Filho *et al.* 2010), virais (Chang *et al.* 2011; Aoki *et al.* 2013), bem como em doenças inflamatórias crônicas, como alergia (Schmitz *et al.* 2005; Prefontaine *et al.* 2009; Barlow *et al.* 2012; Salimi *et al.* 2013), doenças cardiovasculares (Sanada *et al.* 2007) e doença inflamatória intestinal (Oboki *et al.* 2010b; Sedhom *et al.* 2013).

Em infecções helmínticas, a produção de IL-33 estimula a produção de IL-4, IL-5 e IL-13, contribuindo com a polarização e a intensificação da resposta Th2 no local da reação inflamatória (Akiho *et al.* 2002; Nunes *et al.* 2014), facilitando o desenvolvimento da imunidade protetora. Assim, a produção de IL-33 durante a infecção de camundongos por *Trichuris muris* foi associada com a expulsão deste parasito (Humphreys *et al.* 2008), enquanto que a ausência desta citocina resultou em dificuldade de camundongos eliminarem *Strongyloides venezuelensis* e *Nippostrongylus brasiliensis* (Yasuda *et al.* 2012; Hung *et al.* 2013). Outros estudos mostraram a importância da interação de IL-33 com mastócitos e ILC2 na expulsão de *Nippostrongylus brasiliensis* (Price *et al.* 2010; Neill *et al.* 2010).

Por outro lado, a produção de IL-13, estimulada pela produção de IL-33, desempenha um papel relevante para o desenvolvimento de fibrose, pois estimula os fibroblastos e macrófagos a produzirem colágeno por meio da indução da produção de TGF- β (Liu *et al.* 2012). A participação de IL-13 na fibrose hepática induzida pela infecção por *S. mansoni* foi experimentalmente confirmada em camundongos deficientes na produção de IL-13 ou do seu receptor IL-13R α 1, onde a infecção experimental resultou em redução na fibrose e aumento da taxa de sobrevivência em comparação a camundongos não deficientes (Fallon *et al.* 2000; Ramalingam *et al.* 2008). Mchedlidze e colaboradores (2013) ao estudarem o modelo de fibrose hepática através da indução por tioacetamida (TAA) e pela infecção com *S. mansoni*, observaram que a citocina IL-33 é um mediador chave neste processo. Esta citocina leva ao acúmulo e ativação de células ILC2 no fígado que produzem IL-13 e por sua vez, desencadeiam a ativação e transdiferenciação das células estreladas hepática que acarretam o desenvolvimento dos quadros de fibrose. Na falta da ativação de IL-33, é visto uma redução nos quadros de fibrose. Também foi verificado que moléculas derivadas das formas evolutivas de *Schistosoma*, como os antígenos derivados dos ovos (SEA), peroxiredoxina, lisofosfatidilcolina e hemozoína, podem contribuir para a ativação dos macrófagos M2 (Oliveira *et al.* 2000; Donnelly *et al.* 2008; Truscott *et al.* 2013; Zhu *et al.* 2014; Assunção *et al.* 2017). Os antígenos dos ovos, por exemplo, parecem ser capazes de interagir diretamente com macrófagos induzindo a transformação para o perfil M2 ou induzem indiretamente através da via IL-33/ST2 (Zhu *et al.* 2014; Peng *et al.* 2016). Devido ao seu papel de ativação de citocinas do perfil Th2, a citocina IL-33 parece ser um potencial ativador de macrófagos M2 durante a resposta imune inata e adaptativa. Kurowska-Stolarska e colaboradores (2009) relatam que IL-33 amplifica fortemente a expressão de arginase I e Ym1, como também a produção das quimiocinas CCL24 e CCL17 que recrutaram eosinófilos, mastócitos e células T no modelo murino de inflamação

respiratória, resultando em intensificação de quadros de asma devido ao excesso da resposta Th2.

Apesar de estudos recentes terem levado ao melhor entendimento do papel da produção de IL-33 na indução e amplificação da resposta Th2 em infecções helmínticas (Pastorelli *et al.* 2013), e da potencial participação desta via na ativação de macrófagos alternativamente ativados durante a resposta imune inata e adaptativa (Kurowska-Stolarska *et al.* 2009), ainda é pouco esclarecido a ação desta citocina na ativação e diferenciação dos macrófagos, linfócitos efetores e reguladores durante a formação e modulação dos granulomas induzidos pelos ovos de *Schistosoma mansoni*. Estudos prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que a infecção por *S. mansoni* em camundongos deficientes para o receptor de IL-33 (ST2^{-/-}) não altera a carga parasitária; entretanto os animais infectados apresentam elevada taxa de mortalidade em comparação aos selvagens (Rocha 2015; Fernandes 2016). Estes dados indicam a participação fundamental da via IL-33/ST2 na formação do granuloma esquistossomótico; entretanto, os possíveis mecanismos pelos quais a ativação da via IL-33/ST2 afeta a resposta imune local e a fibrose hepática, e conseqüentemente definem a patologia da esquistossomose, devem ser melhor elucidados e constitui o principal interesse deste projeto.

3. JUSTIFICATIVA

A morbidade da esquistossomose humana tem sido associada ao tipo e intensidade da resposta imunológica do hospedeiro e sua participação na formação do granuloma e desenvolvimento da fibrose hepática (Abath *et al.* 2006; De Jesus *et al.* 2002; Hiatt *et al.* 1980; Teixeira-Carvalho *et al.* 2008).

As lesões geradas pelos ovos de *S. mansoni* que ficam retidos nas vênulas da circulação mesentérica e hepática, induzem a liberação de citocinas da resposta imune inata, como IL-33, e a diferenciação da resposta Th2, essencial para formação do granuloma esquistossomótico. Em modelos de infecção por nematódeos, foi verificado que a produção de IL-33 e sua ligação ao receptor ST2 induzem a produção precoce de IL-5 e IL-13 por células inatas como ILC2, mastócitos, basófilos e eosinófilos, que auxilia a diferenciação da resposta Th2. Além disto, IL-33 também participa do recrutamento e ativação de eosinófilo, macrófagos e células hepáticas estreladas, que são componentes essenciais na organização do granuloma esquistossomótico (Schimtz *et al.* 2005; Kurowska-Stolarska *et al.* 2009; Oboki *et al.* 2010; Sattler *et al.* 2013; Nunes *et al.* 2014; Tan *et al.* 2017). Resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa (Rocha 2015; Fernandes 2016) mostraram que camundongos geneticamente deficientes na produção do receptor ST2 (ST2^{-/-}) experimentalmente infectados com *S. mansoni* apresentaram aumento significativo da taxa de mortalidade e alterações no aspecto do granuloma esquistossomótico. Desta forma, nossa hipótese de estudo é que a via IL-33/ST2 pode afetar a resposta imune e a formação do granuloma induzido pela infecção por *S.mansoni*, contribuindo na modulação da gravidade das lesões detectadas na esquistossomose. Assim, torna-se de fundamental importância avaliar os possíveis mecanismos envolvidos neste processo.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Analisar a participação da ativação da via IL-33/ST2 no estabelecimento da resposta imune e das alterações patológicas induzidas pela infecção experimental de *S. mansoni* em camundongos, caracterizando possíveis mecanismos celulares envolvidos no processo.

4.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar a morbidade da infecção por *S.mansoni* em camundongos selvagens e deficientes no receptor de IL-33, o ST2;
- b) Verificar a participação da via IL-33/ST2 na indução da resposta Th2 durante infecção por *S.mansoni* em camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-};
- c) Avaliar alterações no perfil da resposta Th1, Th17 e regulatória durante a infecção experimental em camundongos deficientes ou não no receptor ST2;
- d) Avaliar o desenvolvimento da fibrose hepática através da quantificação da deposição de colágeno e os tipos de fibras de colágeno induzidas pela esquistossomose aguda e crônica em camundongos WT e ST2^{-/-};
- e) Avaliar a participação da ativação da via IL-33/ST2 no perfil de ativação de macrófagos e células hepáticas esteladas (HSC) durante a infecção experimental por *S. mansoni*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais experimentais

Neste projeto utilizaram-se camundongos com 6 a 8 semanas de vida, fêmeas das linhagens BALB/c não deficientes fornecidos pelo Biotério Central da UFMG e camundongos BALB/c geneticamente deficientes na produção de ST2 (ST2^{-/-}), receptor da citocina IL-33, gentilmente cedidos pelo Dr. João Santana da Silva da USP de Ribeirão Preto e criados no biotério de Imunohelmintologia do Departamento de Parasitologia. Todos os animais utilizados para realização desse trabalho foram mantidos em racks ventiladas apropriadas e alimentados com ração granulada para camundongos (Presence, Paulinia, SP, Brasil) e água potável *ad libitum*. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal – UFMG protocolo N°159/2012 e N°368/2018.

5.2 *S.mansoni*: obtenção de antígenos e infecção experimental

A cepa LE de *S. mansoni* foi isolada de um paciente (Luís Evangelista de Belo Horizonte – MG) (Valadares *et al.* 1981) e vem sendo mantida através de sucessivas infecções em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e caramujos *Biomphalaria glabrata*, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968). Cercárias de *S. mansoni* recuperadas de *B. glabrata* infectados (45-60 dias após infecção) foram lavadas, concentradas e quantificadas como descrito por Pellegrino & Macedo (1955) e utilizadas para as infecções experimentais. Para obtenção de antígenos solúveis dos ovos de *S.mansoni* (SEA), foram obtidos ovos a partir do fígado dos camundongos após 45-60 dias da infecção por *S. mansoni*, baseado no procedimento descrito por Dunne e colaboradores (1981). Sucintamente, fígados de animais infectados foram coletados e homogeneizados em salina gelada e concentrada (2 % de NaCl). Após sucessivas decantações e lavagens, os ovos foram separados do sedimento por filtração sequencial em peneiras. Os ovos retidos na peneira (Tyler 400 de abertura 38 mm/μm) foram recuperados lavados e processados em homogeneizador tipo Virtiz[®]s por cerca de 40 minutos em banho de gelo. A destruição completa dos ovos foi confirmada após um exame ao microscópio óptico. O homogenato foi transferido para tubos de 1,5 ml, centrifugados a 4000 x g por 1 h e o sobrenadante recolhido, filtrado em membrana esterilizante de 0,22 μm. As proteínas solúveis da solução de SEA foram quantificadas através da técnica de Lowry *et al.* (1951), alíquotadas e armazenadas a -20 °C para posterior estimulação celular.

5.3 Delineamento experimental

Para avaliar a participação da ativação da via IL-33/ST2 no desenvolvimento da infecção e fibrose hepática induzida durante a *S. mansoni*, os camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} foram infectados com 25 ou 50 cercárias (conforme especificado em cada experimento) e acompanhados por até 14 semanas. Durante esse período, eventuais óbitos e eutanásia realizada em animais que apresentavam sinais clínicos graves de esquistossomose, como acentuada perda de peso e apatia, foram adicionados para cálculo da taxa de mortalidade. Nas semanas 8 e 12 ou 14 pós-infecção (fases aguda e crônica, respectivamente), 6-10 camundongos foram eutanasiados por exsanguinação via plexo braquial sob anestesia por injeção intraperitoneal de cetamina (80 mg / kg - Dopalen - Sespo Industry and Commerce Ltda, Jacaré, Brasil) e xilazina (10 mg / kg - Kensol - Köing Laboratories S/A, Avellaneda, Argentina). Para cada grupo de animais infectados BALB/c WT e ST2^{-/-}, utilizou-se um grupo da mesma idade e linhagem, como controle, ou seja, não infectados. Após este procedimento, os animais de cada grupo experimental (WT e ST2^{-/-}) foram submetidos a análises parasitológicas e imunopatológicas, como descritas a seguir nos itens das partes 1, 2 e 3.

5.3.1 Delineamento experimental - Capítulo 1 – Morbidade, Carga parasitária e Resposta imune

Após serem anestesiados, o sangue dos animais BALB/c WT e ST2^{-/-} foi coletado do plexo braquial e o soro utilizado para dosagem de IL-5, concentração total de IgE e níveis de IgG1 reativa ao parasita, além da quantificação da atividade da enzima hepática alanina aminotransferase (ALT). A carga parasitária foi avaliada através da contagem de vermes adultos recuperados do sistema portal hepático, ovos presentes nas fezes e retidos no fígado. Devido à técnica de perfusão para avaliação parasitológica, o fígado e o baço desses camundongos tornam-se inviáveis para medir a resposta imune. Portanto, um segundo grupo experimental foi realizado em paralelo para análise imunopatológica. Deste segundo grupo, os camundongos tiveram seus baços colhidos para cultura celular, enquanto os fígados foram separados em lobos: o lobo direito foi prontamente fixado e processado para análise histopatológica; os lobos esquerdo e caudado foram congelados e utilizados para medir os níveis de citocinas e quimiocinas (IFN- γ , IL-4, IL-5, IL-13, IL-33, IL-17, IL-10, TGF- β , CCL24 e CXCL2) e as atividades de eosinófilos peroxidase (EPO) e mieloperoxidase (MPO) (**figura**

6). Os experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes para cada análise para confirmação de dados.

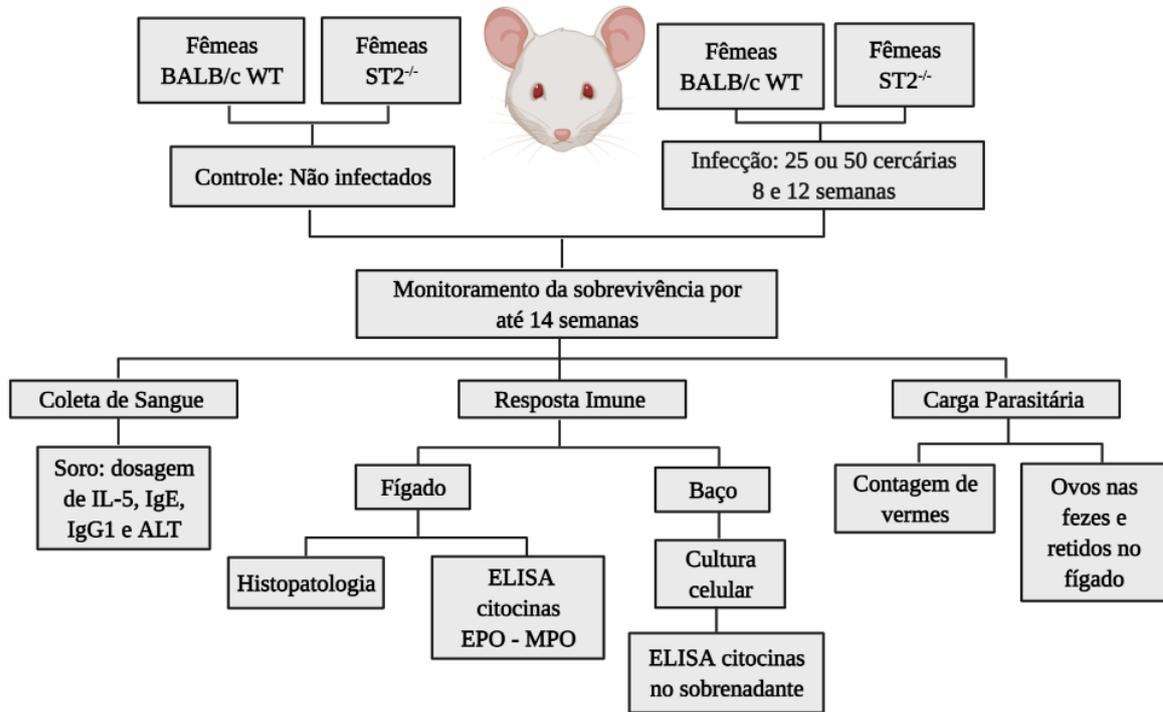


Figura 6. Delineamento experimental capítulo 1. Técnicas realizadas com os camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} para avaliação do papel da ativação da via IL-33/ST2 na indução resposta Th2 e formação do granuloma hepático durante a evolução da infecção por *S.mansoni*.

5.3.2 Delineamento experimental – Capítulo 2 – Evolução da Fibrose Hepática

Posteriormente, foi avaliado, com maior detalhamento, o papel da ativação da via IL-33/ST2 no desenvolvimento da fibrose hepática induzida pela infecção experimental por *S. mansoni*. Devido à maior mortalidade dos animais com um inóculo de 50 cercárias, as avaliações patológicas apresentadas nesta parte foram realizadas em experimentos com 25 cercárias. Desta forma, animais BALB/c WT e ST2^{-/-} com 8 e 14 semanas após a infecção, foram eutanasiados e o lobo quadrado do fígado foi processado para estimativa do conteúdo de hidroxiprolina e o lobo direito prontamente fixado e processado para análise histopatológica, com as colorações de tricrômico de Masson, Picrosirius Red, Prata Amoniacal de Gomori ou destinados à imunohistoquímica para quantificação de α -smooth muscle actin (α -SMA). Em paralelo, um segundo grupo de BALB/c WT e ST2^{-/-} foram infectados com 50 cercárias, e eutanasiados durante a fase aguda (8 semanas) e crônica (12 semanas), e o lobo direito do fígado

foi coletado e processado para verificação da expressão da quantificação dos genes de colágenos do tipo I, III e VI e TGF- β usando a técnica de RT-qPCR (**figura 7**).

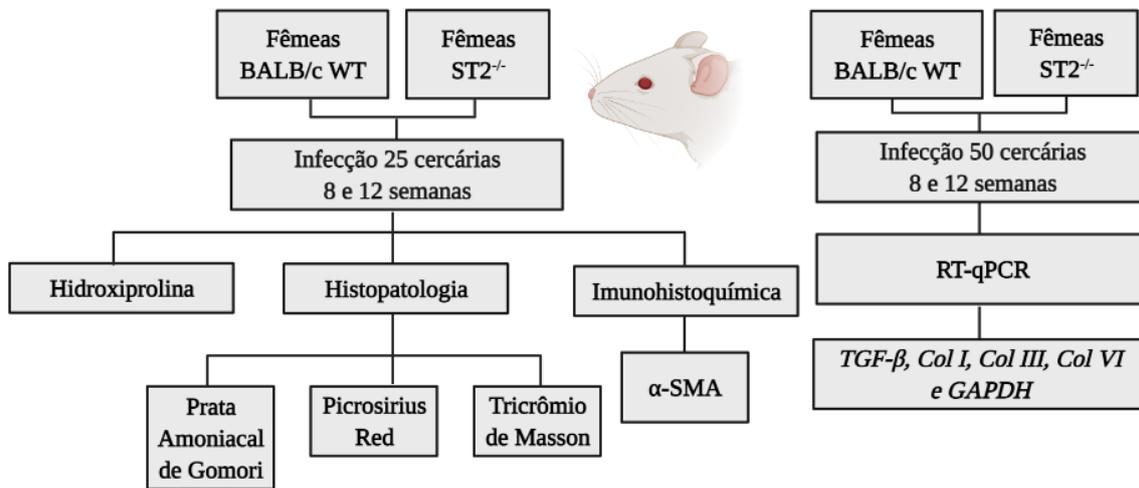


Figura 7. Delineamento experimental capítulo 2. Técnicas realizadas para avaliação da fibrose hepática induzida pela infecção por *S. mansoni* em camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-}.

5.3.3 Delineamento experimental - Capítulo 3 – Perfil de ativação de Macrófagos

Finalmente, foi avaliado a participação da ativação da via IL-33/ST2 na infiltração e ativação de macrófagos no granuloma hepático. Animais BALB/c WT e ST2^{-/-} foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados na 8^a e 12^a semana de infecção. Posteriormente, o lobo direito do fígado destes animais foi coletado e processado para quantificação da expressão dos genes característicos da ativação de macrófagos M1 (*NOS-2*) e M2 (*Arg-1*, *IL-10*, *Relm- α* , *MgL2*, *Chi3l3*) através da técnica de RT-qPCR. Os lobos esquerdo e caudado foram coletados e utilizados para a dosagem de N-acetilglicosamidase (NAG), uma quantificação indireta do recrutamento de macrófagos. Além disso, extraímos o fêmur destes animais infectados ou não, para recuperação de células da medula óssea para cultivo e diferenciação dos macrófagos. O sobrenadante de cultura de macrófagos já diferenciados foi utilizado para quantificação dos níveis de arginase e óxido nítrico (**figura 8**).

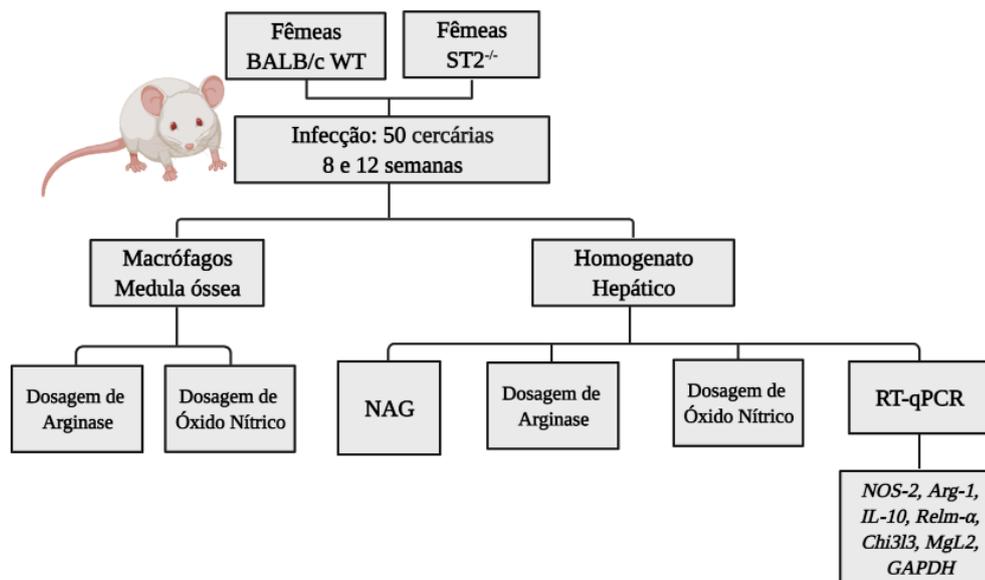


Figura 8. Delineamento experimental capítulo 3. Técnicas realizadas para avaliação da presença e ativação de macrófagos M1 e M2 em camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} durante a infecção experimental por *S. mansoni*.

5.4 Avaliação da infecção

5.4.1 Quantificação dos ovos de *S.mansoni* nas fezes

Os animais foram colocados em caixas individuais na noite anterior a eutanásia (8 e 12 semanas após a infecção por *S. mansoni*). No dia seguinte pela manhã, as fezes foram recolhidas, pesadas, homogeneizadas com solução salina e mantidas em 2mL de solução salina contendo 10% de formol. Para estimar a quantidade de ovos, fez-se a contagem com duas alíquotas de 100 μ l da suspensão de fezes colocadas em lâminas de vidro e todos os campos foram analisados ao microscópio óptico. Todos os ovos presentes nas alíquotas foram contados e extrapolados para o número total de ovos na amostra. O número de ovos foi expresso por grama de fezes.

5.4.2 Recuperação dos vermes adultos do sistema porta hepático

Os vermes adultos presentes no sistema porta hepático dos camundongos infectados dos diferentes grupos experimentais foram recuperados e contados após perfusão do sistema circulatório, conforme descrito por Pellegrino & Siqueira (1956). Para isto, a cavidade abdominal dos animais eutanaziados foi exposta e no final do reto uma ligadura foi feita com linha cirúrgica para evitar contaminação do material perfundido do sistema circulatório com o

conteúdo do sistema digestório. Em seguida, a veia porta foi seccionada na região em que se seguem seus aferentes mesentéricos. Uma agulha acoplada a uma bomba de perfusão (Automatic Pippeting Brewer Machine, modelo 60453, B.D) foi introduzida na aorta torácica para a inoculação de solução salina a 0,85% contendo 80 unidades/L de heparina. O líquido contendo os vermes adultos extravasa pela veia porta rompida de cada animal, e o conteúdo foi recolhido em béquer individual. Esperou-se 30 minutos até os vermes decantarem. O sobrenadante foi descartado e sedimento foi submetido a sucessivas lavagens (três vezes ou até que o sobrenadante se apresentasse completamente límpido) em solução salina. O material recuperado de cada animal foi analisado em uma lupa para a contagem dos vermes adultos, sendo estes diferenciados entre machos e fêmeas.

5.4.3 Quantificação de ovos no tecido

Após realizar a perfusão, o lobo direito do fígado de cada camundongo foi recolhido e digerido conforme descrito por Cheveer (1968). Inicialmente o órgão foi armazenado em tubo de poliestireno de 15 mL e picotados, em seguida os tubos foram incubados em solução de KOH a 5% por 3-4 horas em banho-maria a 37°C, ou até que não mais se observassem a presença de fragmentos de tecido. O tecido digerido foi centrifugado (1.000 rpm durante 3 minutos) e o sedimento contendo os ovos foi lavado 5 vezes com solução salina (NaCl 0,85%). Ao final das lavagens, o material foi ressuspensionado em 4mL de formalina tamponada 10% e armazenado a 4°C para contagens. Para a contagem, duas alíquotas de 100 µl da suspensão total de tecido digerido foram colocadas em uma lâmina de vidro e observadas em todos os campos ao microscópio óptico. Todos os ovos na alíquota foram contados e o valor foi calculado para o lobo direito do órgão.

5.5 Curva de sobrevivência

Para a realização da curva de sobrevivência os grupos de camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} infectados com 25 e 50 cercárias de *S.mansoni* foram observados semanalmente durante 14 semanas, e animais com sinais graves da infecção (apatia e perda acentuada de peso) foram eutanaziados. Estas eutanásias bem como eventuais casos de óbitos foram contabilizados na taxa de mortalidade. A análise estatística realizada para comparação da curva de sobrevivência dos grupos experimentais foi Kaplan-Meier, post-test Logrank.

5.6 Avaliação da resposta imunológica

5.6.1 Obtenção do soro

O sangue recolhido de cada animal experimental 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, a amostra foi centrifugada (1500 xg a 4 °C por 10 minutos) e o soro retirado, aliquotado e mantido a – 20°C. Com o soro coletado foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para estimar a concentração de citocinas e de IgE, bem como avaliar a reatividade de IgG do subtipo IgG1 e estimar função hepática, através da quantificação da atividade de alanina aminotransferase (ALT).

5.6.2 Imunoglobulinas IgE e IgG1

Para medir a concentração de IgE total no soro dos animais infectados por *S. mansoni* e dos animais não infectados, foi utilizado um kit comercialmente disponível (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX). De acordo com as instruções do fabricante, placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nalgel Nunc International, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com anticorpo purificado anti-IgE de camundongo. Entre cada etapa de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com tampão Tris-NaCl (Tris 50 mM, NaCl 0,14M). Após bloqueio da placa com tampão Tris-NaCl acrescido de 1% de albumina bovina (BSA- Sigma), amostras de soro obtidas dos animais experimentais diluídas 1:200 em tampão Tris-NaCl contendo 0,1% BSA foram aplicadas à placa e incubadas por 1 h a temperatura ambiente. Em paralelo, amostras deste tampão com concentrações conhecidas de IgE purificada também foram adicionadas às placas para a construção da curva padrão. Após incubação com as amostras de soro e da lavagem da placa, foi adicionado tampão Tris contendo o anticorpo de detecção (anti-IgE de camundongos, obtida de cabra, conjugada a HRP) na diluição definida pelo fabricante, e em seguida, foi feita a aplicação do substrato (tampão citrato a 0,05mM, pH 5, contendo 4mM de o-fenilenodiamina (OPD) e 0,05mM de peróxido de hidrogênio). A reação foi interrompida com 2N H₂SO₄ e a leitura realizada em leitor de micro-placas (VersaMax Molecular Devices, San José, CA, EUA) no comprimento de onda de 492 nm. A concentração de IgE nas amostras foi calculada pela interpolação do resultado da leitura de absorbância das amostras na curva padrão, e a sensibilidade do teste é de aproximadamente 4 ng/mL.

A reatividade de IgG1 aos antígenos solúveis do ovo (SEA) foi estimada utilizando placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nalgel Nunc International, Rochester, NY, USA)

sensibilizadas com 100 µL antígeno solúvel de SEA (10 µg/mL) diluídos em tampão de Carbonato-Bicarbonato (Na₂CO₃ 0,5 M, NaHCO₃ 0,5M, pH 9,6). Após a sensibilização da placa e entre cada etapa de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com tampão fosfato (PBS – 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4.3 mM Na₂HPO₄.7H₂O, 1.4 mM KH₂PO₄) contendo 0,05 % de Tween 20. Em seguida, as placas foram bloqueadas com PBS contendo 1% de BSA (BSA, Sigma, EUA). Posteriormente, as amostras de soro dos animais dos diferentes grupos experimentais e tempos de infecção foram diluídas 1:100 em PBS 0,1% de BSA e adicionadas às placas para incubação por 1h em temperatura ambiente. A presença de anticorpo parasito-específico foi detectada pela adição de anticorpo anti-IgG1 (Goat anti-mouse IgG1 affinity purified, Bethyl) na diluição de 1:1000 em PBS, seguido pela adição de anticorpo anti-IgG de cabra conjugado a peroxidase diluído 1:5000 em PBS (Goat antimouse IgG affinity purified, Bethyl) e incubado por 1h à temperatura ambiente. A revelação da cor foi feita pela adição de substrato (Tampão Citrato pH5 contendo 4 mM de o-fenilenodiamina (OPD) e 0,05 M peróxido de oxigênio), sendo que a reação foi interrompida após 30 min com adição de solução 4N de H₂SO₄ e a leitura realizada em leitor de microplacas (VersaMax, Molecular Devices, San José, CA, EUA) a 492nm.

5.6.3 Obtenção e ativação de células do baço

Para obter as células do baço, o órgão foi coletado inteiro e cortado ao meio com auxílio de uma lâmina de bisturi, em seguida, macerados com duas lâminas de vidro com extremidade fosca. O macerado foi filtrado em peneira de 40µm e lavado com RPMI 1640 (RPMI 1640, Sigma, St. Louis MO, USA) contendo 15 mM de Hepes, 24 mM NaHCO₃, 60 mg/L de gentamicina, 100 U/ml penicilina e 100µ/ml estreptomicina. Após a centrifugação (300 g por 5min a 4°C), o pellet contendo as células foi ressuscitado em água destilada para lise de hemácias e a osmolaridade foi rapidamente restabelecida com solução concentrada de PBS. A solução celular foi novamente centrifugada e as células foram lavadas e ressuscitadas em 1 mL de meio RPMI completo, contendo 15 mM de Hepes e 24 mM NaHCO₃, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 60 mg/L de gentamicina, 100 U/ml penicilina e 100µ/ml estreptomicina. Uma alíquota da suspensão celular foi recolhida para contagem de células em câmara de Neubauer e o volume foi ajustado para densidade final de 5x10⁶ células/mL de meio RPMI completo (Reyes *et al.* 2016; González *et al.* 2018). Em seguida, 100µL/poço da solução das células isoladas do baço foram plaqueadas em placas de 96 poços de cultura celular Costar

(Corning, NY) e cultivadas por 72h a 37°C e 5% de CO₂ juntamente com meio RPMI completo ou meio RPMI completo contendo 10µg/mL de SEA. O sobrenadante foi coletado após as 72h para posterior quantificação de citocinas e quimiocinas por ensaios imunoenzimáticos (ELISA), utilizando kit comercialmente disponível (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN).

5.6.4 Quantificação de citocinas e quimiocinas no fígado e sobrenadante da cultura de baço

Para estimar a produção de citocinas no fígado, 100 mg do tecido hepático de cada camundongo BALB/c WT e ST2^{-/-}, infectados e não infectados, foram processados em um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) na presença de 1mL de tampão de extração (PBS contendo 0,5 % Tween 20; 0,5% de albumina bovina (BSA); 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsufonila; 0,1mM de cloreto benzetônico; 10 mM de EDTA e 20UI de aprotinina). O homogenato resultante foi centrifugado por 10 min a 4000 g a 4°C e o sobrenadante foi recolhido, aliquoteado e imediatamente congelado a -20°C para dosagem de citocinas. O precipitado foi processado para a determinação da atividade de EPO e MPO, conforme descrição posterior.

A quantificação de citocinas no homogenato de fígado e no sobrenadante de cultura de células do baço foi realizada através da técnica de ELISA Sanduíche, utilizando kits comercialmente disponíveis para quantificar CXCL2, CCL24, TNF- α , IFN- γ , IL-33, IL-5, IL-4, IL-13, IL-17, TGF- β e IL-10 de camundongos (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN), seguindo as instruções do fabricante.

Inicialmente sensibilizou-se uma placa de 96 poços “Half Area” (Costar Corning, York County, Maine, EUA) com 25 µl/poço de PBS contendo concentração adequada do anticorpo de captura, anti-citocina de interesse. Esta solução permaneceu em contato com a placa por 24h e, após este período, esta foi lavada 3 vezes com tampão de lavagem (PBS contendo 0,05% Tween 20). Logo em seguida, adicionou-se 25 µl/poço de tampão de bloqueio (PBS com 1% de albumina de soro bovino – BSA) e incubou-se por 40 minutos em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas com tampão de lavagem e as amostras de homogenato de fígado ou sobrenadante de baço de cada animal foram adicionadas às placas após diluição em tampão diluente (PBS/Tween contendo 0,1% de BSA) na concentração de 1:5 e 1:2, respectivamente. Amostras de concentrações conhecidas da citocina/quimiocina a ser determinada também foram adicionadas à placa e incubadas por 2h em temperatura ambiente para construção da curva padrão. Após novo ciclo de lavagem, as microplacas foram incubadas

por mais 2h com tampão diluente contendo o anticorpo de detecção conjugado à biotina na diluição determinada pelo fabricante. Novamente, as microplacas foram lavadas e incubadas por 30 minutos com PBS/BSA 0,1% contendo Streptoavidina conjugada à peroxidase, na diluição de 1:200. Após novo ciclo de lavagem, a reação foi revelada pela adição do substrato de tetrametilbenzidina (TMB - R&D Systems). Após 20 min de incubação a reação foi interrompida pela adição de solução 4N de H₂SO₄ e a absorbância foi medida em leitor de ELISA (VersaMax, Molecular Devices), com comprimento de onda de 450nm. Para inferir a quantidade de citocinas e quimiocinas presentes nas amostras, os resultados das leituras de absorbância foram plotados como ng/mL.

5.7 Alterações hepáticas induzidas pela infecção por *S.mansoni*

As amostras de fígado, coletadas de camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} com 8 e 12 semanas de infecção por *S. mansoni* e seus controles foram processadas e utilizadas para avaliação das alterações hepáticas decorrentes da esquistossomose. Para isso, realizou-se avaliação histopatológica através das colorações de hematoxilina-eosina (HE), Tricrômio de Masson, Picrosirius Red e Prata Amoniacal de Gomori para análise dos granulomas e deposição de colágenos. A deposição de colágenos foi indiretamente estimada pela quantificação de hidroxiprolina no tecido. A infiltração/ativação celular no fígado foi avaliada através da dosagem de EPO, MPO e NAG, e a ativação de HSC foi realizada pela demonstração da presença de α -SMA em células presentes nos granulomas, através da técnica de imunohistoquímica. Os níveis de atividade de alanina aminotransferase (ALT) no soro dos animais dos diferentes grupos experimentais também foram mensuradas como medida indireta de lesão hepática.

5.7.1 Análises histopatológicas e morfométricas

As análises histopatológicas foram realizadas com o lobo direito do fígado de cada camundongo. Após a coleta, o órgão foi fixado em formalina tamponada a 10%, embebido em parafina e seccionados com 5 μ m de espessura. Os cortes de fígado foram corados por diferentes métodos histológicos para avaliar o processo inflamatório e a deposição de colágeno e a composição das fibras. Especificamente, usamos a coloração com Hematoxilina-Eosina para averiguar a inflamação e o volume da área do granuloma; a coloração de tricrômico de Masson e Picrosirius Red para ilustrar a deposição de colágeno extracelular ao redor dos ovos do

parasita e a coloração com prata amoniacal de Gomori para caracterizar a organização das fibras de colágeno (Junqueira & Junqueira 1983; Junqueira *et al.* 1979; Melo *et al.* 2008; Alves *et al.* 2019). Além disso, o tecido com coloração de Picrosirius também foi examinado em microscopia de luz polarizada para caracterizar a composição do colágeno; o colágeno tipo I aparece como fibras vermelhas, e o colágeno tipo III aparece como fibras verdes sob luz polarizada (Junqueira *et al.* 1979). As lâminas de fígado coradas com prata amoniacal de Gomori foram usadas para análise morfométrica das fibras reticulares. De cada camundongo, 20 campos microscópicos foram selecionados aleatoriamente e as imagens foram obtidas com microscópio Olympus Bx40 com uma câmera Qcolor 3 acoplada (Olympus, Japão). A quantidade de fibras reticulares foi quantificada por meio do software Ks400 (Caliari, 1997).

5.7.2 Imunohistoquímica

A imunohistoquímica foi realizada em lâminas com cortes de 5 μ m do fígado de camundongos de diferentes grupos experimentais para avaliar a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA). Para tanto, cada lâmina contendo amostra de fígado foi desparafinada, reidratada e submetida à recuperação do antígeno utilizando uma solução de citrato de sódio 0,01M, pH 6,0 e aquecimento em micro-ondas na potência de 80% durante 10 min. Em seguida, as lâminas foram incubadas com o anticorpo anti- α -SMA (Abcam 32575- Cambridge, MA) na diluição de 1:800 por 24 horas a 4° C. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas e a expressão de α -SMA nas células dos granulomas hepáticos foi revelada com a utilização do kit EnVision+ Dual Link System-HRP (Agilent Dako, Santa Clara, CA), onde o anticorpo secundário é associado à polímeros marcado com HRP e a atividade de peroxidase é revelada pelo cromógeno 3,3'-Diaminobenzidina (DAB - Agilent Dako, Santa Clara, CA). Todas as lâminas foram contrastadas com hematoxilina modificada por Harris (Sigma-Aldrich, San Luis, EUA) durante 2 minutos e com reagente Bluing (Thermo Fisher Scientific, Massachussets, EUA) durante 1 minuto. Posteriormente, as amostras foram analisadas em microscópio óptico. Para a análise morfométrica da expressão de α -SMA em células de granuloma, imagens foram obtidas de granulomas exsudativos contendo miracídios viáveis de camundongos infectados crônicos de ambas as linhagens (3 camundongos/grupo), usando o microscópio Olympus Bx41TF acoplado a uma câmera DP12-2 (Olympus Optical, Japão). A expressão de α -SMA foi estimada comparativamente usando o software ImageJ.

5.7.3 Hidroxiprolina

Para a determinação indireta da deposição de colágeno, dosou-se hidroxiprolina, como descrito por Reddy & Enwemeka (1996). Amostra de 200 mg do lobo bilobado do fígado de cada animal experimental foi homogeneizada em solução salina a 0,9%, congelada a -80°C, e posteriormente o material foi liofilizado (Liotop K105, Brasil). O ensaio foi conduzido com 20 mg do liofilizado, esta amostra foi submetida a hidrólise alcalina (1ml de NaOH à 2N) e autoclavada a 120°C por 20 minutos. Logo em seguida, uma alíquota de 50 µl do hidrolisado foi adicionado a 450µl do reagente oxidante de cloramina T (cloramina T 0,056 M, N-propanol 10% em tampão acetato/citrato pH 6,5) e incubado por 20 minutos para que a oxidação se totalizasse. Uma curva padrão com concentração inicial de 400µg de hidroxiprolina foi preparada em diluição seriada. A reação colorimétrica foi iniciada pela adição do reagente de Ehrlich (1M de pdimetilaminobenzaldeído diluído em N-propanol/ácido perclórico 2:1 v/v). As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 1500 g a 4°C. O ensaio foi feito com 200 µl do sobrenadante de cada amostra em uma placa de 96 poços (Plate Flat Bottom – Sarstedt, Inc. USA) e lida a absorbância no comprimento de onda de 550 nm em leitor para microplacas (VersaMax, Molecular Devices).

5.7.4 Determinação da atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO)

O ensaio da atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO) é uma forma indireta de medir a eosinofilia tecidual, conforme originalmente descrito por Strah *et al.* (1985) e detalhado em Silveira *et al.* (2002). A atividade enzimática foi estimada no precipitado da amostra de homogenato hepático obtido após homogeneização de 100 mg de fígado em tampão de extração, conforme descrito anteriormente. Eventuais eritrócitos presentes no precipitado foram lisados pela adição de 1,5 ml de NaCl a 0,2% e a osmolaridade foi restabelecida pela adição de 1,5ml de NaCl a 1,6% contendo 5% de glicose. As amostras foram homogeneizadas e o homogenato dividido em 2 partes iguais, sendo uma processada para quantificar a atividade de EPO e outra para MPO.

As amostras destinadas a quantificação de EPO foram centrifugadas a 4000 g a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi re-suspenso e homogeneizado em 950 µl de PBS 1x pH 7,4 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB - Sigma). As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas a 4000 g a 4°C por 10 min. e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático. Para tanto, 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 será lida a 492 nm em leitor para microplacas (VersaMax, Molecular Devices).

5.7.5 Determinação da atividade de mieloperoxidase (MPO)

O ensaio de quantificação de mieloperoxidase (MPO) tem o objetivo de medir de forma indireta a infiltração e/ou ativação de neutrófilos no tecido, conforme descrito pela primeira vez por Bailey (1988) e detalhado por Barcelos *et al.* (2005). O tecido foi processado como descrito anteriormente no ensaio de EPO. As amostras destinadas a este ensaio foram centrifugadas a 4000 g a 4°C por 10 min. e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi ressuspenso em 200 µl de tampão contendo 0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA, pH 4,7. A solução foi homogeneizada e centrifugada a 4000 g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi homogeneizado novamente em tampão (0,05 M NaPO₄ acrescido de 0,5 % HTAB, pH 5,4), seguido de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, assim como para o ensaio de EPO. Em seguida, a solução foi centrifugada a 4°C por 15 min. a 4000 g e o sobrenadante utilizado para realização do método colorimétrico. Para o método colorimétrico 25 µL da amostra foram acrescentados a 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). Posteriormente, foi feita a incubação a 37 °C por cinco min. em estufa seca. Em seguida, 100µl da solução contendo 0,5 mM de H₂O₂ diluído em tampão contendo 0,05 M de Na₃PO₄, 0,5% de HTAB, pH 5,4) foram adicionados e incubados a 37°C por mais cinco minutos. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de solução 1M de H₂SO₄ e quantificada através da absorbância em leitor para microplacas (VersaMax, Molecular Devices) em comprimento de onda 450nm.

5.7.6 Determinação da atividade de N-acetilglicosamidase (NAG)

A atividade da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) é uma estimativa indireta do recrutamento de macrófagos para um dado órgão que apresenta baixa contaminação cruzada com enzimas de neutrófilos, conforme descrição de Barcelos *et al.* (2005). Para isto, 50 mg de fígado foram pesados e processados em um homogeneizador de tecidos em 950µl de tampão contendo 0,1 M NaCl, 0,02 M Na₃PO₄ e 0,015M Na₂EDTA, pH 4,7. O homogenato foi

centrifugado a 4000 g a 4°C por 10 min., o sobrenadante foi descartado e eventuais eritrócitos presentes no precipitado foram lisados pela adição de 750 µl solução hipotônica (0,2%) de NaCl e após 30 s, a osmolaridade foi restabelecida pela adição de mais 750 µl de solução hipertônica (1,6%) de NaCl contendo 5% glicose. As amostras foram mais uma vez centrifugadas (4000 g a 4°C por 10 min) e o sobrenadante descartado. Para liberação do conteúdo das vesículas, o precipitado foi ressuspensão em 1,0 ml de solução salina 0,9% contendo Triton x-100, a suspensão resultante foi centrifugada a 4° C por 10 min 4000 g e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático.

Em uma placa de 96 poços (Plate Flat Bottom Sarstedt, Inc. USA), adicionou-se um volume de 100 µl de amostra obtida e diluída (1:5) em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 4,5) contendo 0,767 g/ml de p-nitrofenil-N-acetil-β-glicosamina (Sigma, EUA), posteriormente 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 absorbância foi quantificada em leitor de ELISA (VersaMax, Molecular Devices), em comprimento de onda igual a 400 nm.

5.7.7 Determinação sérica da atividade de alanina aminotransferase ALT

Para caracterização das lesões hepáticas ocasionadas pela esquistossomose, amostras de soro dos animais WT e ST2^{-/-} durante a fase aguda e crônica foram utilizadas para detecção de alanina aminotransferase (ALT), conforme as instruções do fabricante (LABTEST®). Em uma placa de 96 poços foram plaqueados 25µl de substrato de ALT (tampão 67 mmol/L, pH 7,4; ácido α-cetoglutarato 2,0 mmol/L; ácido L-alanina, 100 mmol/L, e azida sódica 15,4 mmol/L) e incubados a 37°C por 3 minutos. Posteriormente, 5 µl de soro foi então adicionado a placa, homogeneizado e incubado a 37°C por 30 minutos. Em seguida, acrescentou-se 25µl do reagente de cor de ALT (2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0 mmol/L e ácido clorídrico 1,0 mol/L) à mistura, homogeneizou-se e permaneceu em temperatura ambiente por 20 minutos. Por último, acrescentou-se 250µl de hidróxido de sódio e a solução foi incubada por 5 minutos em temperatura ambiente. A curva padrão foi preparada utilizando piruvato de sódio (2 mmol/L) como padrão enzimático, resultando em uma curva variando de 0-150 U/mL. A leitura de absorbância das amostras foi realizada no comprimento de onda de 505 nm, utilizando-se o leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices). A atividade de transaminase nas amostras foi obtida pela interpolação dos dados da curva padrão e plotado como U/mL.

5.8 Expressão dos genes associados à fibroses e ativação de macrófagos no tecido hepático - RT-qPCR

Com intuito de caracterizar o perfil de ativação de macrófagos e o nível de expressão de genes associados a fibrose, o nível de expressão dos genes *NOS-2*, *Arg-1*, *TGF- β* , *IL-10*, *Relm- α* , *Chi3l3*, *MgI2*, *Colágeno I*, *Colágeno III* e *Colágeno VI* foi quantificado no tecido hepático de animais BALB/c WT e ST2^{-/-} infectados ou não com *S.mansoni*, usando RT-qPCR (quantitative reverse transcription polymerase chain reaction).

Para isso, a extração de RNA e síntese de cDNA foi feita a partir de fragmentos de fígado coletados e armazenados em RNAlater™ Stabilization Solution (Invitrogen™), e processados usando homogeneizador Omni TH e o kit TRIzol (Invitrogen™), conforme as recomendações do fabricante. Após a quantificação do RNA realizada em espectrofotômetro Epoch™ Microplate Spectrophotometer (Biotek), as amostras foram tratadas com DNase (Enzima Turbo DNA-free kit- Ambion – Life Technologies), seguida da síntese de cDNA realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA reverse Transcription (Life Technologies), comercialmente disponível. As reações de PCR foram realizadas em triplicatas em um volume de reação de 10 μ L: 5 μ L SYBER Green Master Mix (Ambion- Life Technologies), 0,3 μ L de cada primer alvo (forward e reverse), 2,4 μ L de água Milli-Q e 2,0 μ L cDNA (valores dados para uma reação). Para estimar a ativação de macrófagos M1 foi utilizado o primer para gene *NOS-2*, para ativação de M2 primers de genes *Arg-1*, *TGF- β* , *IL-10*, *Relm- α* , *Chi3l3* e *MgI2* e para a quantificação dos colágenos relacionados a fibrose os primers para genes *Colágeno I*, *Colágeno III* e *Colágeno VI*, previamente descritos na literatura conforme detalhado na tabela 1. Para os genes de *IL-10* e *Relm- α* , os iniciadores foram desenhados usando o programa Primer3Input (version 0.40). A RT-qPCR foi realizada em equipamento StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystem) e as condições da reação foram as seguintes: 95°C durante 10 minutos, seguido por 40 ciclos (95°C durante 15 segundos para desnaturação e 60°C durante 60 segundos para anelamento dos iniciadores e extensão). A quantificação relativa do mRNA dos genes estudados foi determinada através do método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, usando como controle endógeno o gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Schwartz *et al.* 2014a). Os dados foram analisados pelo StepOne Software 2.3 (Life Technologies) e os gráficos plotados no GraphPad Prism Software 4.0.

Tabela 1. Relação de primers utilizados

<i>NOS-2</i> (Schwartz <i>et al.</i> 2014)	F:5'-CAG AAG AAT GGA AGA GTC AG-3' R:5'-CAG ATA TGC AGG GAG TCA CC-3'
<i>Arg-1</i> (Liu <i>et al.</i> 2015)	F:5'-CTC CAA GCC AAA GTC CTT AGA G-3' R:5'-AGG AGC TGT CAT TAG GGA CA-3'
<i>TGF-β</i> (Singh <i>et al.</i> 2004)	F:5'-CTC CAC CTG CAA GAC CAT-3' R:5'-CTT AGT TTG GAC AGG ATC TGG-3'
<i>IL-10</i> (Sequência desenhada)	F:5'- CCAGGGAGATCCTTTGATGA-3' R:5'-AACTGGCCACAGTTTTTCAGG-3'
<i>Relm-α</i> (Sequência desenhada)	F:5'-CCA TAG AGA GAT TAT CGT GGA-3' R:5'-TGG TCG AGT CAA CGA GTA AG-3'
<i>Chi3l3</i> (Liu <i>et al.</i> 2015)	F: 5'-CCA GCA GAA GCT CTC CAG AAG CA-3' R:5'-TGG TAG GAA GAT CCC AGC TGT ACG-3'
<i>MgI2</i> (Liu <i>et al.</i> 2015)	F:5'-TGG AGC GGG AAG AGA AAA ACC AGG-3' R:5'-TCG AAG TTG TCA GCC CTG GAG TC-3'
<i>Colágeno I</i> (Schwartz <i>et al.</i> 2014)	F:5'-ACT GGA CTG TCC CAA CCC C-3' R:5'-TCC CTC GAC TCC TAC ATC TTC TG-3'
<i>Colágeno III</i> (Schwartz <i>et al.</i> 2014)	F:5'-AAC CTG GTT TCT TCT CAC CCT TC-3' R:5'-ACT CAT AGG ACT GAC CAA GGT GG-3'
<i>Colágeno VI</i> (Wilson <i>et al.</i> 2007b)	F:5'-CGC CCT TCC CAC TGA CAA-3' R:5'-GCG TTC CCT TTA AGA CAG TTG AG-3'
<i>GAPDH</i> (Liu <i>et al.</i> 2015)	F: 5'-AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG-3' R:5'-TGT AGA CCA TGT AGT TGA GGT CA-3'

5.9 Perfil de ativação de macrófagos derivados da medula ossea de camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} infectados por *S. mansoni*

5.9.1 Obtenção e diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea

Os fêmures dos camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} infectados ou não foram coletados na fase aguda e crônica da infecção e rapidamente lavados em placas de petri contendo álcool 70% em PBS. Em seguida, com auxílio de uma seringa de 1 mL acoplada a uma agulha de insulina de 13x0,45mm- 26 G^{1/2} (Descarpack Descartáveis do Brasil Ltda) em um tubo de 50mL estéril fez-se a lavagem no canal medular com 2-5mL de meio RPMI-1640 incompleto gelado (LCG biotecnologia, Brasil) até a total retirada da medula óssea (osso fica totalmente branco). As células recuperadas da medula ossea de cada animal foram ressuspensas em 30mL de meio RPMI-1640 (LCG biotecnologia), centrifugadas (300xg por 10 min. a 4°C) e o precipitado com as células foi novamente ressuspensado em 20mL de meio R20/30, que consiste de meio RPMI contendo 20% soro inativado (Gibco, Grand Island, NY, USA), 30% sobrenadante de cultura de células L929, 1% L-glutamina, 1% penicilina e streptomomicina (Gibco, Grand Island, NY, USA), 0,0035% β-mercaptoetanol (Sigma-Aldrich). O sobrenadante de células L929 foi

obtido pelo cultivo dessa linhagem celular em placas de cultura (Corning, NY, EUA) por sete dias, em 50 ml de meio RPMI completo, contendo RPMI 1640 (LGC Biotecnologia) suplementado com 10% de soro bovino fetal (LGC Biotecnologia). O meio de cultura foi retirado, filtrado com filtros de seringa esterilizantes (Corning). O sobrenadante de cultura de células L929 serviu como fonte de fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), que estimula a diferenciação de monócitos em macrófagos (Joshi *et al.*, 2008; Lutz *et al.*, 2017).

Posteriormente, as células recuperadas da medula óssea foram contadas em câmara de Neubauer após adição de azul de tripan (Gibco) para determinar o número de células obtido e sua viabilidade. Após contagem, as amostras foram plaqueadas em placa de Petri (J. Prolab, São José dos Pinhais, PR, Brasil), na concentração de 7×10^5 células/ml em volume final de 10 ml, e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ em 10 ml de meio R20/30. O meio foi renovado ao quarto dia para retirada de células não aderentes. As células aderentes foram consideradas monócitos em processo de diferenciação. Após 7 dias de incubação a 37°C, 5% CO₂, as células presentes no sobrenadante da cultura foram descartadas e as células aderidas foram destacadas das placas de petri utilizando solução PBS contendo 0,5% Tripsina e 5,3mM EDTA (Atlanta biologicals, Norcross GA). As células recuperadas foram lavadas e plaqueadas em placas de 24 poços Costar (Corning, NY) na concentração de 5×10^5 /poço em 500µL de meio R20/30 e incubadas a 37°C, 5% CO₂ por 48h para garantir a aderência das células. Ao final das 48horas, as células aderidas foram estimuladas com SEA (5µg/mL), e/ou IFN-γ e TNF- α recombinante (1ng/mL; R&D System) para diferenciação dos macrófagos M1 ou com IL-4 (1ng/mL), IL-13 (1ng/mL), IL-33 (1ng/mL) (R&D Systems) para diferenciação dos macrofágos M2. As culturas foram mantidas por mais 48h a 37°C, 5% CO₂. Ao fim desse período, os monócitos já diferenciados em macrófagos foram utilizados para quantificação de arginase e óxido nítrico.

5.9.2 Quantificação da atividade de arginase

Macrófagos alternativamente ativados expressam arginase-1(ARG1) e a atividade desta enzima está relacionada à proliferação de células e a síntese de colágeno (Baron & Wynn 2011). Desta forma, para avaliar a ativação de M2 no sobrenadante de células da medula óssea e no homogenato hepático, mensuramos o nível atividade de arginase por teste colorimétrico a partir da produção de ureia pela degradação enzimática de L-arginina (Hesse *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2017). Para tanto, 50 µl da amostra de cada animal infectado ou não infectado foram adicionados em uma microplaca de 96 poços (Sarstedt) e ativados pela adição de 50 µl

de 10 mM $MnCl_2$ e 50 μ l de 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 e incubação por 10 minutos a 55° C. Em seguida, foram adicionados 25 μ l de L-arginina 0,5 M (Sigma-Aldrich) a 25 μ l das amostras ativadas, incubando a 37° C por 1 hora. A reação foi interrompida com 200 μ l de mistura ácida, contendo H_2SO_4 a 96%, H_3PO_4 a 85% e H_2O (1:3:7, v/v/v). Em seguida, foi adicionado etanol contendo 9% de α -isonitrosopropiophenone (Sigma-Aldrich), passando por aquecimento a 95 °C por 45 minutos, seguido de incubação à temperatura ambiente por 10 minutos. A leitura das placas foi realizada em leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices) a 540 nm. As concentrações das amostras foram obtidas pela interpolação das absorbâncias em gráfico obtido a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de ureia (1000 mM – 1 mM) no *software* SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices).

5.9.3 Quantificação de óxido nítrico

O sobrenadante da cultura dos macrófagos isolados da medula óssea e o homogenato hepático também foram utilizados para mensurar a concentração de nitrito através da reação de Griess (Tsikas 2007) como medida indiretamente da produção de óxido nítrico. Sendo assim, 100 μ l da amostra foram adicionados a um volume igual de reagente de Griess [1% sulfanilamida, 0,1% de N-(1-naftil) etilenodiamina e 2,5% de H_3PO_4] em uma placa de microtitulação de 96 poços (Sartedt®) e incubados durante 10 min à temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada em um leitor de microplacas VersaMax (Molecular Devices) no comprimento de onda 540nm. A concentração de nitrito foi obtida comparando a absorbância de cada amostra com a curva padrão estabelecida por uma diluição seriada das concentrações conhecidas de nitrito (1000 μ M- 1 μ M).

5.10 Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada usando GraphPad Prism 8.0.2. Os dados foram submetidos a testes de ROUT para identificação e remoção de outliers, e sua distribuição normal foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para análise da curva de sobrevivência, foi utilizada a estimativa de Kaplan-Meier, seguida do pós-teste de Longrank. As comparações entre os grupos experimentais normalmente distribuídos em diferentes momentos de infecção foram realizadas por Two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni, enquanto Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn ou Mann-Whitney foram realizados para os dados que não segue uma distribuição normal. Os

conjuntos de dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média em gráficos de plotagem e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos.

6. CAPÍTULO 1

A VIA IL-33/ST2 NÃO É ESSENCIAL PARA A **ESTIMULAÇÃO TH2**, MAS É A CHAVE PARA A MODULAÇÃO DO GRANULOMA E SOBREVIVÊNCIA DO HOSPEDEIRO DURANTE A INFECÇÃO CRÔNICA POR *SCHISTOSOMA MANSONI* EM CAMUNDONGOS

Publicado: Maggi *et al.* 2021. The IL-33/ST2 pathway is not essential to Th2 stimulation but is key for modulation and survival during chronic infection with *Schistosoma mansoni* in mice. *Cytokine* v. 138 155390. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155390>

A morbidade durante a esquistossomose crônica tem sido associada à indução e modulação da resposta inflamatória granulomatosa do tipo 2 (Th2) induzida por antígenos secretados pelos ovos, que ficam aprisionados nas vênulas dos tecidos do hospedeiro, especialmente no fígado e intestinos. IL-33, uma alarmina liberada após dano celular, liga-se ao seu receptor ST2 (supressor de tumorigenicidade 2), expresso em células imunes inatas, como ILC2, eosinófilos e macrófagos, e estimula a produção precoce de IL-5 e IL-13. Em infecções por Nematodeos intestinais, a ativação de IL-33/ST2 leva à infiltração de eosinófilos e ativação de uma resposta Th2; entretanto, a participação desta via de ativação na indução da resposta Th2 e na formação e modulação do granuloma durante a esquistossomose ainda é pouco conhecida. Na primeira parte deste trabalho, avaliamos comparativamente a resposta imune e a formação de granuloma em camundongos selvagens BALB/c (WT) e BALB/c geneticamente deficientes no receptor de IL-33 (ST2^{-/-}) experimentalmente infectados com *Schistosoma mansoni*. Os camundongos foram infectados com 25 ou 50 cercárias de *S. mansoni* e acompanhados por até 14 semanas para avaliar a mortalidade. Os camundongos de cada grupo experimental foram avaliados comparativamente quanto à carga parasitária, resposta imune do fígado e evolução do granuloma durante a esquistossomose aguda e crônica. Nossos dados mostraram que o número de vermes circulantes e ovos retidos no fígado e eliminados nas fezes foi semelhante em camundongos WT e ST2^{-/-} infectados, mas camundongos ST2^{-/-} infectados apresentaram um aumento na taxa de mortalidade. Curiosamente, a produção de citocinas do tipo 2 por células do baço estimuladas por antígenos de ovo solúveis (SEA), as concentrações séricas de IL-5 e imunoglobulina (Ig)-E, e o nível de IgG1 reativa ao parasita foram semelhantes em camundongos infectados de ambos os grupos experimentais. Além disso, as concentrações de IL-5 e IL-13 no homogenato de fígado de camundongos na fase aguda da esquistossomose não diferiram entre os grupos. Entretanto, os camundongos ST2^{-/-} infectados mostraram um aumento significativo nos níveis de IL-17 durante a fase aguda, enquanto as concentrações de IL-4, IL-13, IL-10, IL-17 e IFN- γ foram reduzidas no homogenato de fígado de camundongos cronicamente infectados. Entretanto, camundongos ST2^{-/-} infectados apresentaram as razões IL-4/IFN- γ e IL-17/IFN- γ maiores que em WT, sugerindo um predomínio de respostas Th2 e Th17. Os granulomas hepáticos de ST2^{-/-} foram maiores e desorganizados, apresentando intenso infiltrado celular, rico em eosinófilos e neutrófilos. Nossos resultados sugerem que a ausência da via IL-33/ST2 não é essencial para a indução da resposta Th2 presente em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*, mas é necessária para modular a lesão hepática e reduzir a mortalidade do hospedeiro.

Palavras chave: esquistossomose, fígado, modulação, granuloma, resposta Th2

6.1 RESULTADOS - Capítulo 1

6.1.1 Avaliações parasitológicas e mortalidade de camundongos WT e ST2^{-/-}

Confirmando dados anteriores do nosso grupo, a carga parasitária, avaliada pela contagem de vermes adultos recuperados da veia porta e ovos retidos no fígado ou eliminados nas fezes, mostrou que o número de vermes (fig. 9A e fig. 9B) e o número de ovos excretados nas fezes (fig. 9C e fig. 9D) recuperados de camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} foram estatisticamente semelhantes, independentemente do inóculo do parasita (25 ou 50 cercárias/camundongo) ou da fase de infecção. Em relação aos ovos retidos no fígado, a evolução da infecção leva a um aumento progressivo dos ovos no tecido, sendo que camundongos infectados cronicamente apresentaram retenção significativamente maior de ovos em comparação com a infecção aguda. Entretanto, não foi observada diferença no número de ovos recuperados no fígado entre os camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-}, também independentemente do inóculo do parasita e da fase de infecção (fig. 9E e fig. 9F).

Camundongos infectados e não infectados de ambos os grupos foram acompanhados por 14 semanas para avaliar a mortalidade. Entre os camundongos infectados com 25 cercárias, a taxa de sobrevivência foi de 89,3% em camundongos BALB/c WT, enquanto apenas 34,3% dos camundongos ST2^{-/-} sobreviveram, com mortes começando nas semanas 11 e 12 pós-infecção, respectivamente (fig. 9G). No grupo infectado com 50 cercárias, a taxa de sobrevivência foi de 25,9% entre os camundongos ST2^{-/-}, com mortes iniciando na semana 8 pós-infecção, que foi significativamente menor em comparação com a taxa de sobrevivência de 52,7% entre os camundongos WT, com mortes começando a ser observado na semana 9 (fig. 9H). Assim, apesar dos parâmetros parasitológicos semelhantes entre os grupos, a falta do receptor ST2 levou a maior mortalidade em camundongos infectados. As análises a seguir foram conduzidas com camundongos infectados com 50 cercárias para que uma resposta imune mais intensa pudesse ser averiguada. Além disso, devido à alta taxa de mortalidade detectada em camundongos infectados com ST2^{-/-}, a análise imunopatológica de animais infectados cronicamente foi realizada 12 semanas após a infecção.

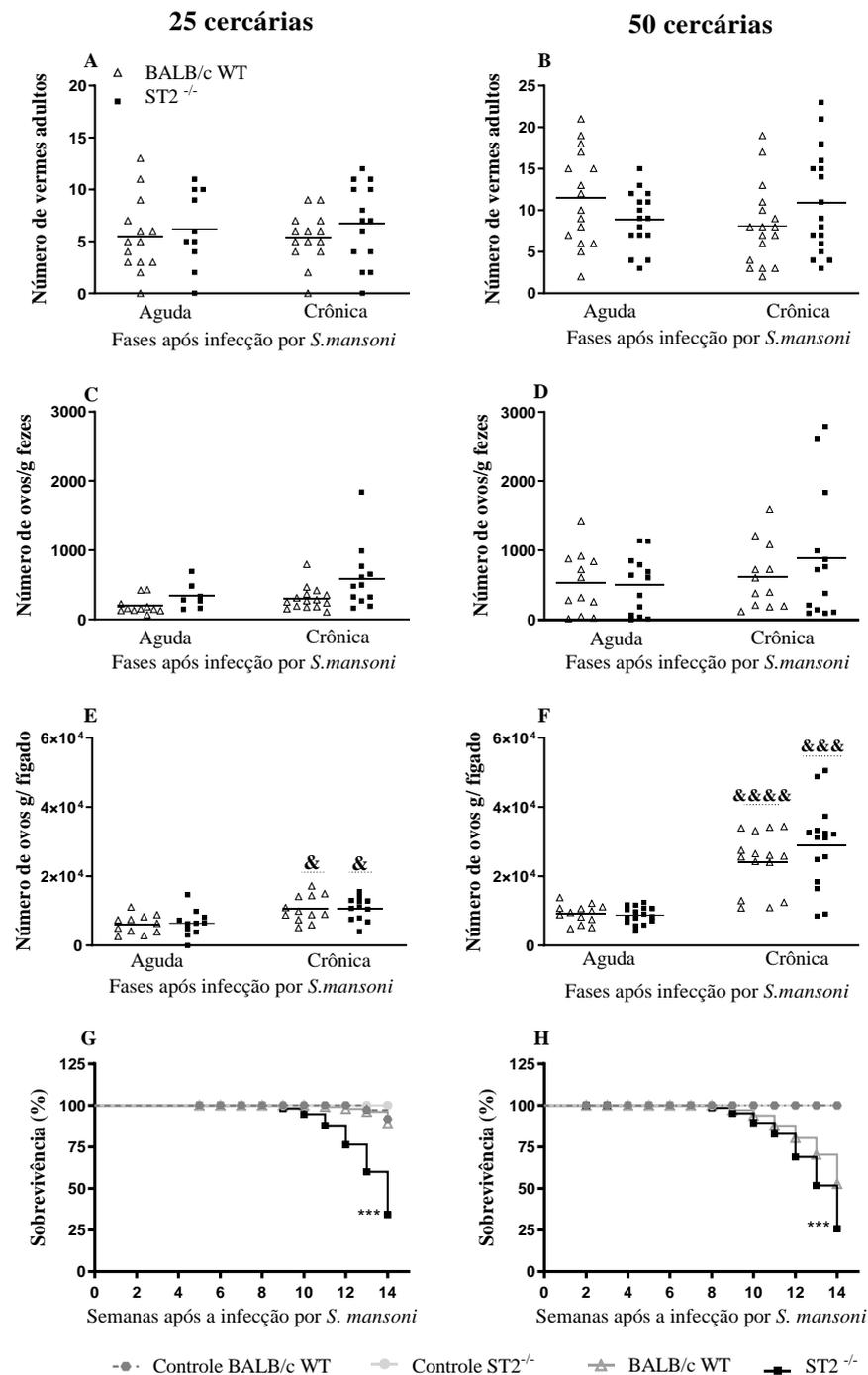


Figura 9. Avaliação da carga parasitária e taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-}. O número de vermes recuperados (A, B), ovos por grama de fezes (C, D), ovos retidos no fígado (E, F) e as curvas de sobrevivência (G, H) foram avaliados após 8 (fase aguda) ou 14 (fase crônica) semanas de infecção com 25 (A, C, E, G) ou 50 cercárias (B, D, F, H) em camundongos WT e ST2^{-/-}. Os dados compilam os resultados de dois experimentos independentes. Os dados são apresentados como um gráfico de pontos e média, cada ponto representando um animal. As comparações entre os grupos foram realizadas por Two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e o valor de p foi atribuído. As curvas de sobrevivência foram analisadas em camundongos WT e ST2^{-/-} infectados com 25 (G) ou 50 cercárias (H) por 14 semanas usando estimativa de Kaplan-Meier, seguido por pós-teste de Logrank. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de grupos diferentes; & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos na fase aguda infectados com o mesmo inóculo de ambos os grupos (& p < 0,05; && p < 0,01; &&& ou *** p < 0,001).

6.1.2 Resposta Th2 sistêmica

Para confirmar a indução sistêmica da resposta imune em camundongos $ST2^{-/}$ infectados com *S. mansoni*, a concentração de citocinas (IFN- γ , IL-5, IL-4, TNF- α e IL-33) e a produção de anticorpos (IgE total e IgG1 reativa ao parasita) foram medidas no soro dos animais dos diferentes grupos experimentais. Em relação a citocina característica da resposta Th1, foi verificado que a concentração sérica de IFN- γ foi baixa e permaneceu semelhante, independentemente da fase de infecção ou linhagem de camundongo (fig. 10A). As concentrações séricas de ambos os mediadores imunológicos dependentes de Th2, IL-5 (fig. 10B) e IgE (fig. 10C), aumentaram durante a infecção, e nenhuma diferença significativa foi detectada na resposta de camundongos BALB/c WT e $ST2^{-/}$. Em concordância com esses dados, a reatividade de IgG1 anti-SEA apresentou níveis mais elevados nos grupos infectados em comparação com os grupos controle não infectados (fig. 10D), embora sem diferença entre as linhagens. Resultados semelhantes também foram obtidos para reatividade de IgG1 anti-SWAP (dados não mostrados). Durante a fase aguda, os níveis séricos detectáveis de IL-4 estavam presentes apenas em camundongos $ST2^{-/}$, enquanto nenhuma diferença entre os camundongos WT e $ST2^{-/}$ foi encontrada na fase crônica (dados não mostrados). Os níveis séricos de TNF- α e IL-33 estavam abaixo da faixa de detecção (dados não mostrados).

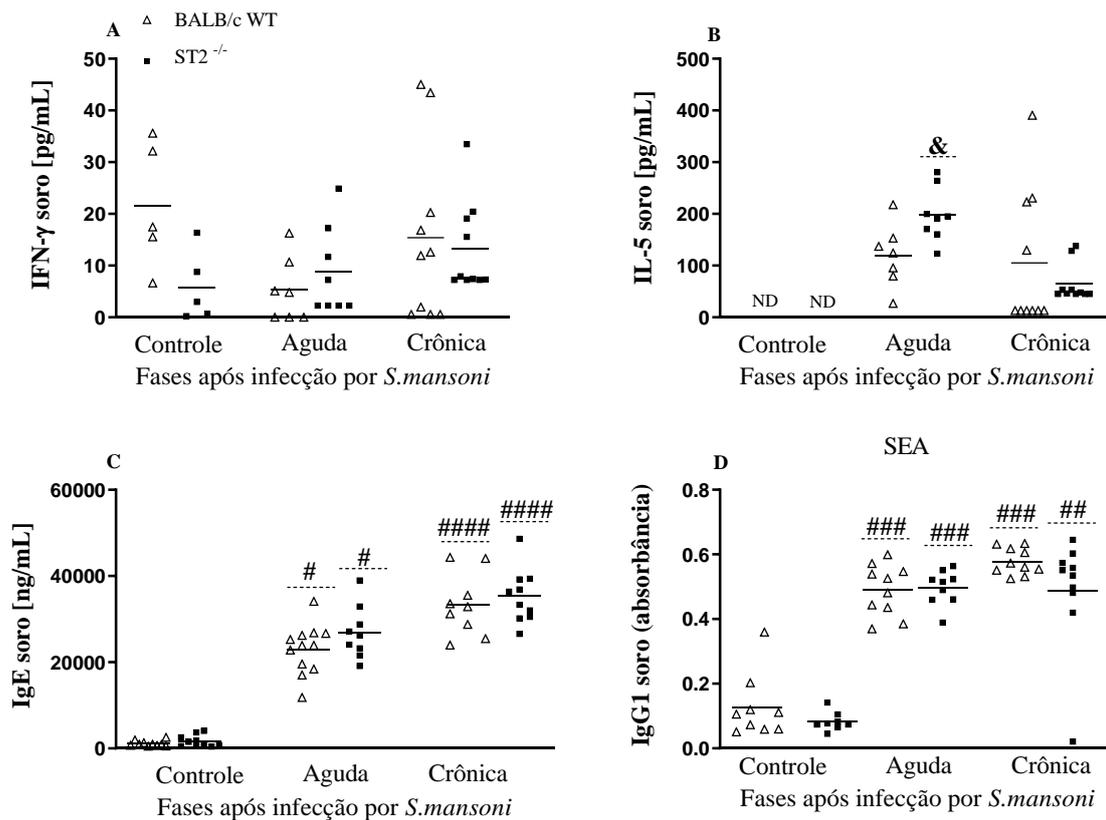


Figura 10. Níveis séricos de citocinas e imunoglobulinas. Avaliação das concentrações de citocinas em níveis séricos de IFN- γ , IL-5 e anticorpos estimados por ELISA em amostras de camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-}. Os camundongos foram infectados por via subcutânea com 50 cercárias de *S. mansoni* e sacrificados nas semanas 8 (fase aguda) ou 12 após a infecção (fase crônica). Os dados são representativos de duas experiências independentes e apresentados como um gráfico de pontos e média, cada ponto representando um animal, de IFN- γ (A), IL-5 (B), IgE (C) e IgG1 (D). As comparações entre os grupos foram realizadas por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Dunn, e o valor de *p* foi atribuído. & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos da mesma linhagem infectados na fase aguda; # representa diferenças significativas entre um grupo e seu grupo controle não infectado correspondente (# ou & *p* < 0,05; ## *p* < 0,01; ### *p* < 0,001). ND: não detectável.

Para melhor avaliar como a ausência da via de ativação de IL-33/ST2 afeta as resposta imune durante a infecção por *S. mansoni*, as concentrações de IL-4, IL-5, IL-13, IL-33, IL-10 e IL-17 foram quantificados no sobrenadante de culturas de células do baço estimuladas por SEA. Em camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-}, IL-4 não foi detectada em culturas de células do baço de camundongos não infectados, mas apresentou-se aumentada em grupos infectados com *S. mansoni*, especialmente durante a fase aguda, sem diferença significativa entre BALB/c WT e ST2^{-/-} (fig. 11A). A produção ligeiramente maior de IL-5 também estava presente durante a infecção e, novamente, sem diferenças entre os camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} (fig. 11B). A produção de IL-13 (fig. 11C) apresentou aumento da fase aguda para a fase crônica em ST2^{-/-}, mas também sem diferenças entre as diferentes linhagens. A produção de IL-33 (fig. 11D) e de IL-10 (fig. 11E) em células do baço estimuladas por SEA foram semelhantes entre os grupos

durante a esquistossomose aguda e crônica. IL-17 só pôde ser detectada na fase crônica, porém sem diferenças entre os camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} (fig. 11F).

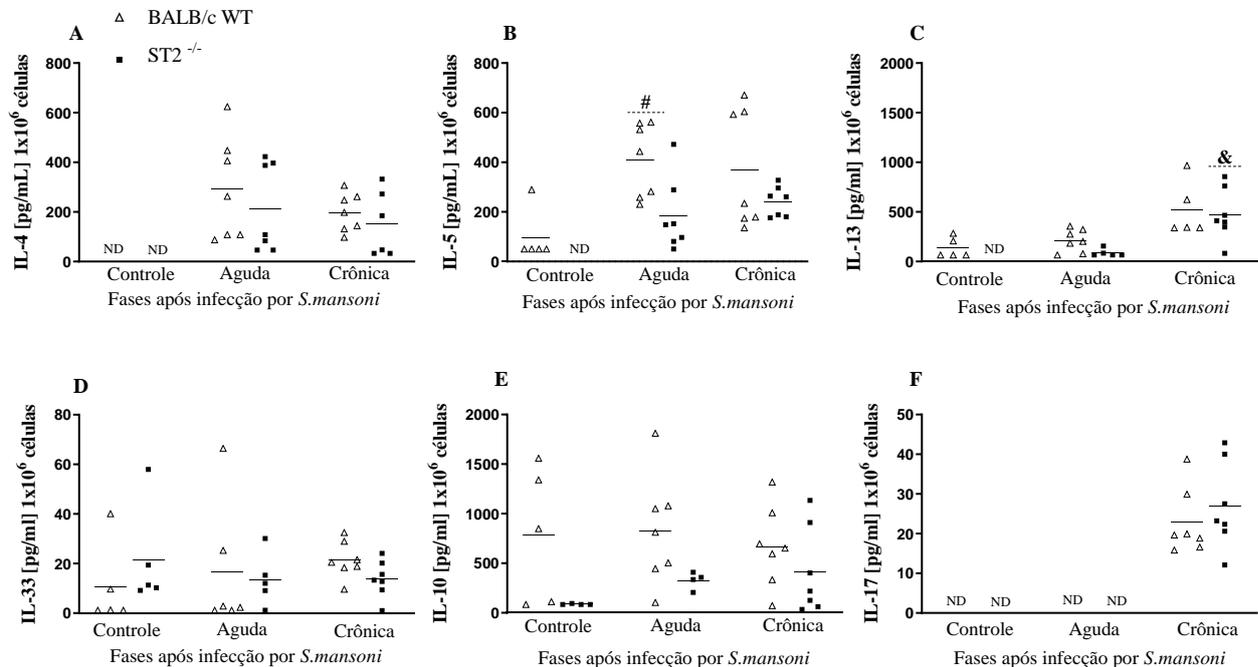


Figura 11. Resposta Th2 e regulatórias do baço. Avaliação das concentrações de citocinas em sobrenadantes de cultura de células do baço estimadas por ELISA em amostras de camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-}. Os camundongos foram infectados por via subcutânea com 50 cercárias de *S. mansoni* e sacrificados nas semanas 8 (fase aguda) ou 12 após a infecção (fase crônica). As células do baço foram cultivadas a 1x10⁶ células/ml em RPMI-1640 na presença de 5 µg/ml de SEA por 72h durante infecções agudas e crônicas. Os dados são representativos de dois experimentos independentes e apresentados como um gráfico de pontos e média, cada ponto representando as concentrações, de IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C), IL-33 (D), de IL-10 (E), IL-17 (F) em sobrenadantes de cultura de células de baço de um animal. As comparações entre os grupos foram realizadas por Kruskal-Wallis seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Em F, as comparações entre os grupos em uma única fase da infecção foram feitas pelo teste de Mann-Whitney, e o valor de *p* foi atribuído. & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos da mesma linhagem infectados na fase aguda; # representa diferenças significativas entre um grupo e seu grupo de controle não infectado correspondente (# ou & *p* < 0,05). ND: não detectável.

6.1.3 Resposta imune do fígado

O fígado é o principal órgão de retenção de ovos na esquistossomose (Gryseels 2012; McManus 2018), portanto, os níveis de citocinas de perfis Th1, Th17, Th2 e regulatórias foram avaliados no homogenato hepático de BALB/c WT e ST2^{-/-} após 8 e 12 semanas de infecção. Em relação ao perfil Th2, altas concentrações de IL-4 (fig. 12A), IL-5 (fig. 12B) e IL-13 (fig. 12C) foram detectadas em homogenatos de fígado de camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} infectados, mas sem diferenças significativas entre os grupos durante a esquistossomose aguda. No entanto, as concentrações de IL-4 e IL-13 reduziram significativamente no homogenatos de fígado de camundongos ST2^{-/-} infectados cronicamente, resultando em níveis mais baixos

dessas citocinas em comparação com BALB/c WT. Camundongos ST2^{-/-} também mostraram uma redução significativa dos níveis hepáticos de IL-5 durante a esquistossomose crônica, mas sem diferenças entre as linhagens (fig. 12B). Da mesma forma, camundongos ST2^{-/-} também apresentaram uma redução significativa nas concentrações hepáticas de IL-17 (fig. 12D) e IFN- γ (fig. 12E) da fase aguda para a fase crônica, sendo menor do que em camundongos BALB/c WT durante infecção crônica. Por outro lado, os níveis de IL-17 foram aumentados em camundongos ST2^{-/-} durante a fase aguda em comparação com camundongos BALB/c WT (fig.12D).

Os níveis de TNF- α (fig. 12F) permaneceram os mesmos, independentemente da fase de infecção ou linhagem de camundongo. Entre as citocinas com perfil regulatório, os níveis de TGF- β nos homogenatos hepáticos foram semelhantes entre as duas fases da infecção, sem diferenças significativas entre os grupos (fig. 12G). Os camundongos BALB/c WT mostraram níveis semelhantes de IL-10 durante a infecção. No entanto, as concentrações de IL-10 no homogenato hepático reduziram significativamente da fase aguda para a crônica da esquistossomose em camundongos ST2^{-/-} (fig. 12H).

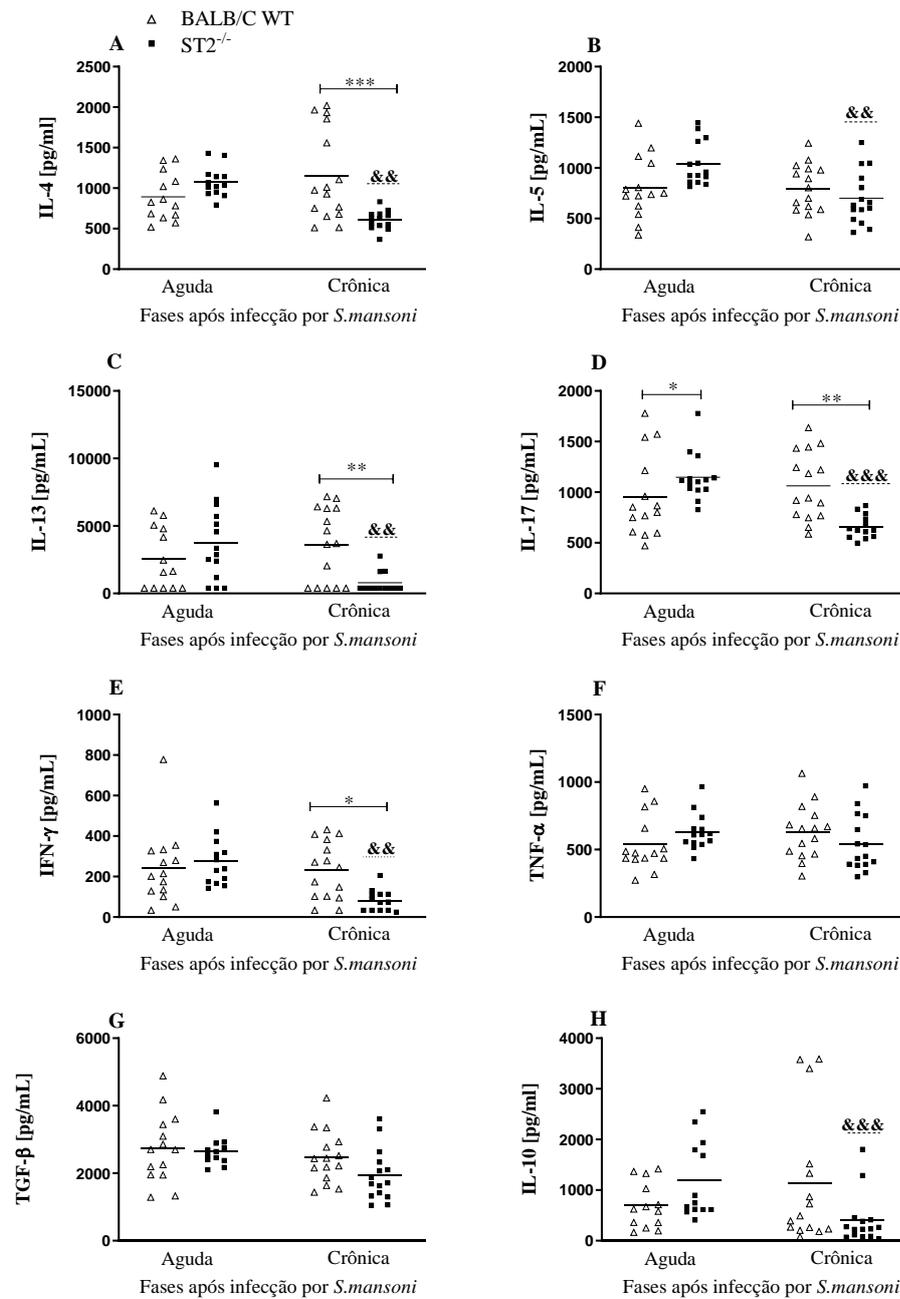


Figura 12. Resposta imune no fígado. Quantificação de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras no homogenato hepático de camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} durante infecção aguda e crônica. Os camundongos foram infectados por via subcutânea com 50 cercárias de *S. mansoni* e sacrificados nas semanas 8 (fase aguda) ou 12 após a infecção (fase crônica). Os dados são representativos de dois experimentos independentes e apresentados como um gráfico de pontos e média, cada ponto representando um animal, de IL-4 (A), IL-5 (B), IL-13 (C), IL-17 (D), Concentrações de IFN- γ (E), TNF- α (F), TGF- β (G) e IL-10 (H) estimadas por ELISA sanduíche. As comparações entre os grupos com distribuição normal foram realizadas por Two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni, enquanto o teste de Mann-Whitney foi realizado para distribuições não paramétricas, e o valor p foi atribuído. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de grupos diferentes; & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos da mesma cepa infectados na fase aguda. (* ou && p <0,05; ** ou &&& p <0,01; &&& p <0,001).

Como um parâmetro para analisar o equilíbrio entre as respostas Th2, Th1, Th17 e regulatórias, as razões entre IL-4 e IFN- γ , IL-4 e IL-10, IL-4 e IL-17 e IL-17 e IFN- γ foram calculadas. Nenhuma das proporções mudou significativamente nos camundongos BALB/c WT durante a infecção, e nenhuma diferença foi encontrada entre as linhagens durante a infecção aguda. Embora camundongos deficientes para ST2 tenham apresentado diminuição dos níveis de IL-4 no homogenato hepático durante a esquistossomose crônica, um aumento significativo na razão IL-4/IFN- γ foi observado em camundongos ST2^{-/-} em comparação com camundongos WT (fig. 13A), indicando a predominância da resposta Th2. Da mesma forma, a redução significativa da concentração de IL-10 em homogenatos hepáticos de camundongos ST2^{-/-} infectados cronicamente também resultou em um aumento da razão IL-4/IL-10 nesses animais em comparação com a fase aguda da esquistossomose, mas sem diferenças estatísticas entre as linhagens estudadas (fig. 13B). Ambos os camundongos WT e ST2^{-/-} apresentaram relações IL-4/IL-17 semelhantes, que persistiram durante a fase crônica (fig. 13C). Por outro lado, camundongos knockout apresentaram um aumento de duas vezes na razão IL-17/IFN- γ média entre as fases e uma razão 1,49 vezes maior quando comparados aos camundongos BALB/c WT durante a esquistossomose crônica, sugerindo uma resposta Th17 mais forte durante esta fase. (fig. 13D).

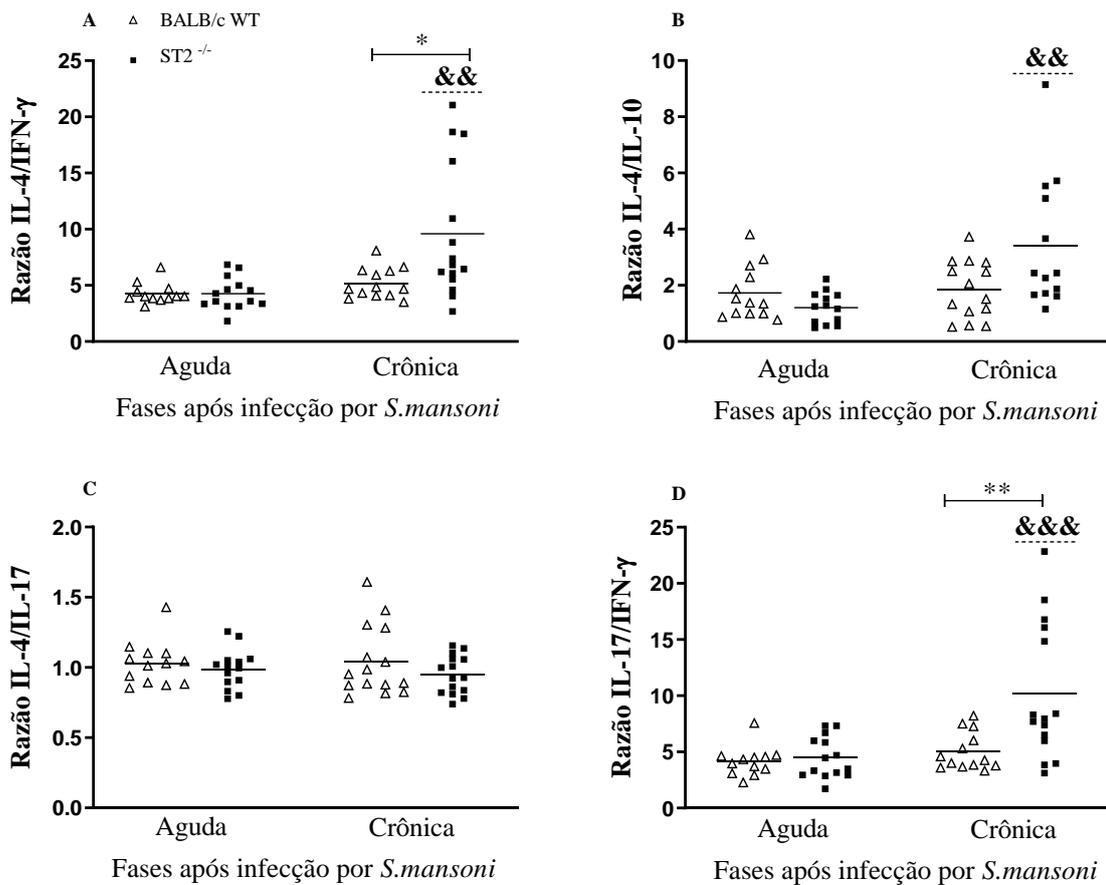
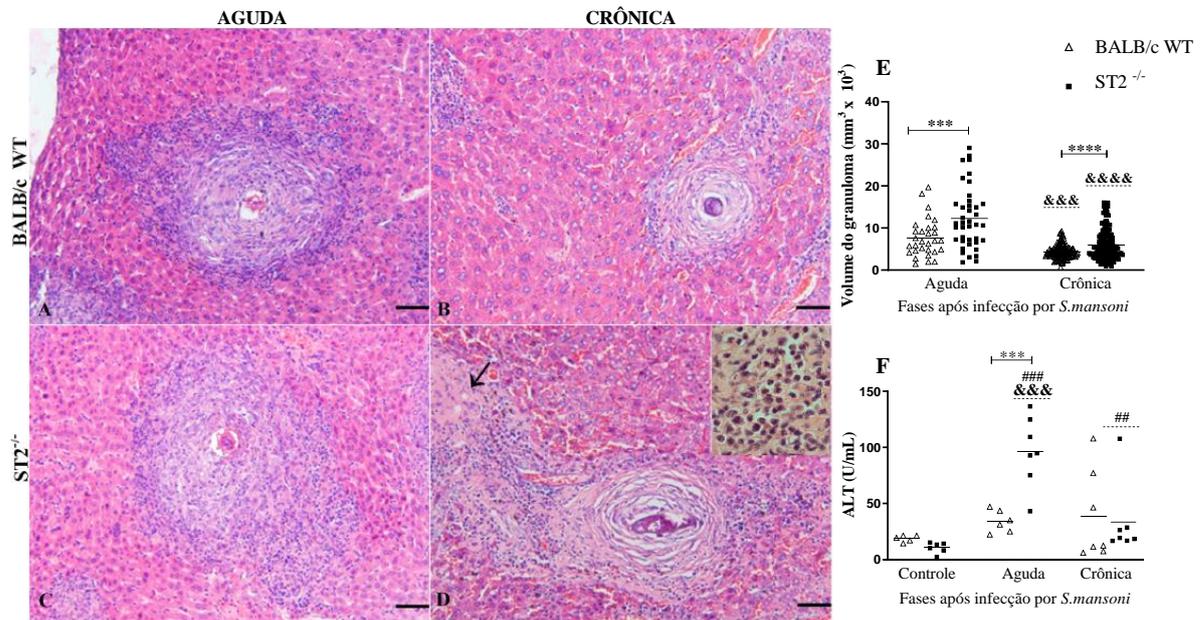


Figura 13. Equilíbrio entre as respostas imune Th2, Th1, Th17 e regulatória no fígado de camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} durante a infecção por *S. mansoni*. Os camundongos foram infectados por via subcutânea com 50 cercárias de *S. mansoni* e sacrificados nas semanas 8 (fase aguda) ou 12 após a infecção (fase crônica). Os dados compilam os resultados de dois experimentos independentes. Os dados são apresentados como um gráfico de pontos e média, cada ponto representando as razões de concentração de IL-4/IFN- γ (A), IL-4/IL-10 (B), IL-4/IL-17 (C) e de IL-17/IFN- γ (D) de um animal. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney, e o valor de p foi atribuído. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de diferentes cepas; & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos da mesma cepa infectados na fase aguda. (** $p < 0,01$; &&& $p < 0,001$; &&&& $p < 0,0001$).

6.1.4 Granulomas e lesões hepáticas

Durante a infecção por *S. mansoni*, foi possível observar diferenças cruciais na organização e tamanho do granuloma dos camundongos WT em comparação com ST2^{-/-} (fig. 13). Os granulomas hepáticos de fase aguda de camundongos BALB/c WT apresentam uma grande resposta inflamatória ao redor dos ovos, a intensa infiltração celular é predominantemente observada na periferia do granuloma (fig. 14A). Por outro lado, os granulomas hepáticos de camundongos ST2^{-/-} infectados afetaram áreas maiores de tecido e mostraram infiltração dispersa de células inflamatórias (fig. 14C). Durante a infecção crônica, camundongos WT conseguem modular a formação do granuloma diferente dos camundongos

deficientes (fig. 14B e 14D, respectivamente). Os granulomas de animais deficientes apresentam um intenso infiltrado de células polimorfonucleares, conforme ilustrado no insert (fig. 14D). São caracterizados por serem granulomas mais exsudativos, comparado com os granulomas de BALB/c WT (fig. 14B), embora menores em ambos os grupos quando comparados à fase aguda. Como consequência, os granulomas hepáticos em camundongos ST2^{-/-} apresentaram volumes maiores quando comparados aos granulomas de camundongos BALB/c WT, tanto na esquistossomose aguda quanto na crônica (fig. 14E). Nossa análise também revelou que o tecido hepático dos camundongos ST2^{-/-} durante a esquistossomose crônica apresentaram extensas áreas de necrose e infiltrado celular fora da região dos granulomas (indicado pela seta da fig. 14D), que não foram comumente observadas nos camundongos WT infectados neste mesmo período. Além disso, a elevação da atividade de ALT no soro de camundongos infectados foi significativamente maior em camundongos ST2^{-/-} do que em WT durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni* (fig. 14F).



Conforme indicado na histopatologia, procuramos avaliar diferenças na infiltração de células polimorfonucleares nos granulomas. A migração de leucócitos para o local de retenção dos ovos para a formação de granuloma é dirigida por quimiocinas (Burke *et al.* 2009) como CCL24 e CXCL2. Embora as concentrações de CCL24 tenham sido semelhantes entre os grupos na fase aguda, a concentração dessa quimiocina foi significativamente maior no homogenato hepático de camundongos ST2^{-/-} em comparação com o BALB/c WT durante a fase crônica (fig. 15A). Os níveis de CXCL2 no homogenato hepáticos foram semelhantes nos camundongos ST2^{-/-} e WT independente da fase da infecção (fig. 15C). A infiltração de eosinófilos e neutrófilos também foi indiretamente avaliada através da quantificação das atividades de EPO e MPO, respectivamente. Confirmando os dados histológicos, maiores atividades de EPO (fig. 15B) e MPO (fig. 15D) foram encontradas em homogenatos de fígado

de camundongos ST2^{-/-} quando comparados com BALB/c WT durante esquistossomose crônica.

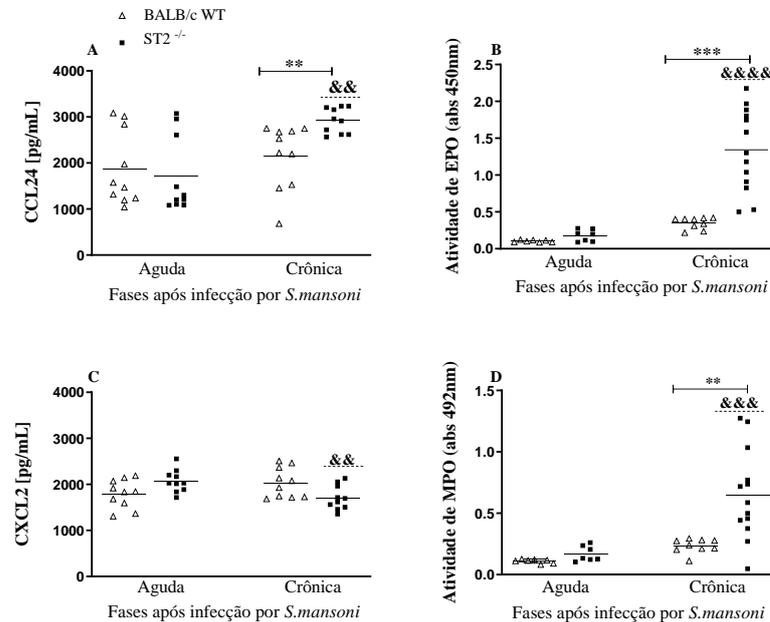


Figura 15. Infiltração celular no fígado. (A, C) Concentrações de CCL24 e CXCL2 no homogenato de tecido hepático estimadas por ELISA em sanduíche. (B, D) Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO), mieloperoxidase (MPO) em homogenato de tecido hepático. Os camundongos foram infectados por via subcutânea com 50 cercárias de *S. mansoni* e sacrificados nas semanas 8 (fase aguda) ou 12 após a infecção (fase crônica). Os dados compilam os resultados de dois experimentos independentes. Os dados são apresentados como um gráfico de pontos e média, cada ponto representando um animal. As comparações entre os grupos normalmente distribuídos foram realizadas por Two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni, enquanto o teste de Mann-Whitney foi realizado para distribuições não paramétricas, e o valor de *p* foi atribuído. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de diferentes linhagens; & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos da mesma linhagem infectados na fase aguda (* ou & *p* < 0,05; ** ou && *p* < 0,01; *** *p* < 0,001).

6.2 DISCUSSÃO - Capítulo 1

A esquistossomose é uma doença infecciosa que ainda afeta milhões de pessoas em todo o mundo, causando morbidade crônica que está principalmente associada à retenção de ovos do parasita e à resposta imune do hospedeiro, buscando conter toxinas e remodelar o tecido danificado por produtos excreto/secretados pelos ovos de *S. mansoni* (Hams *et al.* 2013; WHO 2020). Uma infinidade de citocinas e quimiocinas produzidas pelos mais diversos tipos de células, incluindo as do tecido afetado e células imunes inatas, estão envolvida na resposta imune induzida por *Schistosoma*, embora nem todas tenham tido suas funções bem descritas, como a alarmina IL-33 (Pearce & MacDonald 2002; Chuah *et al.* 2014; Costain *et al.* 2018). A via IL-33/ST2 tem forte potencial para induzir uma resposta Th2 e tem sido associada a vários modelos de doenças infecciosas e inflamatórias (Schmitz *et al.* 2005; Alves-Filho *et al.* 2010;

Rostan *et al.* 2013; Nunes *et al.* 2014). Neste capítulo, reunimos evidências de que a ausência da via IL-33/ST2 não afeta o estabelecimento da infecção por *S. mansoni*, nem compromete a indução da resposta Th2 na esquistossomose aguda. No entanto, a falta dessa via leva à polarização da resposta Th2/Th17 durante a fase crônica devido à redução da resposta Th1 e modulatória. Isso resulta na formação de granulomas hepáticos maiores, com intensa infiltração celular, causando lesão hepática mais extensa e maior taxa de mortalidade em camundongos infectados com ST2^{-/-}.

Os dados apresentados neste capítulo, mostram que independente da quantidade de cercárias utilizadas na infecção, o número de vermes adultos e ovos recuperados foi similar entre de camundongos ST2^{-/-} e WT. Em contraste, Yu e colaboradores (2015) ao bloquear a IL-33 usando anticorpos anti-IL-33, mostraram que o comprometimento da via da IL-33/ST2 foi associado a uma redução do número de vermes adultos de *S. japonicum* recuperados da veia mesentérica. Os dados controversos podem ser influenciados por diferenças importantes nas espécies de *Schistosoma* e nos mecanismos utilizados para bloquear a via de ativação da IL-33/ST2 empregada nos dois experimentos. Em relação ao número de ovos, outros modelos de supressão de IL-33/ST2 em infecções por *S. japonicum* (Yu *et al.* 2015; Li *et al.* 2019) também não mostraram alterações na contagem de ovos (no fígado ou nas fezes) ou na fertilidade quando a via de IL-33/ST2 foi de alguma forma prejudicada. Os dados indicam fortemente que os mecanismos imunes relacionados à eliminação dos ovos não são comprometidos pela falta da via IL-33/ST2, sugerindo assim que essa via não desempenha um papel significativo nesse processo. Apesar da ausência de variação no número de ovos, especialmente aqueles retidos no fígado, os camundongos ST2^{-/-} infectados apresentaram maior taxa de mortalidade quando comparados aos camundongos WT. Como a patologia da esquistossomose é associada aos granulomas que se formam ao redor dos ovos que ficam retidos nos tecidos (Wynn *et al.* 2004; Costain *et al.* 2018), e o número de ovos retidos no fígado de camundongos deficientes não foi diferente dos camundongos WT, a maior taxa de mortalidade detectada em camundongos ST2^{-/-} infectados provavelmente ocorreu devido as alterações na formação de seus granulomas.

A secreção de antígenos citotóxicos do ovo induz a ativação da resposta Th2, com produção local das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 e formação do granuloma, resposta importante para contensão do dado tecidual e para formação de fibrose (Okano *et al.* 1999; Pearce & MacDonald 2002; Herbert *et al.* 2004; Hesse *et al.* 2004; Everts *et al.* 2009). Dados publicados por Schmitz *et al.* (2005) relataram que a estimulação com IL-33 exógena em células do baço de camundongos C57BL/6 leva a um aumento nos níveis de citocinas tipo 2, como IL-5 e IL-13. Para investigar melhor a importância da via IL-33/ST2 na indução da resposta Th2 durante

a infecção por *S. mansoni* e como ela afeta a formação de granuloma e os danos no fígado, quantificamos citocinas tipo 2 e marcadores de sua atividade biológica no baço, fígado e soro de animais infectados. Nossos resultados mostraram que os níveis sistêmicos de IFN- γ , IL-4 e IL-5 durante a esquistossomose não são influenciados pela ausência da ativação da via IL-3/ST2, o que é reforçado pelos níveis semelhantes de IgE total e IgG1 específica para SEA entre camundongos ST2^{-/-} e WT, indicando uma atividade biológica sustentada destes marcadores.

No homogenato hepático dos camundongos infectados, os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 foram semelhantes entre as duas linhagens durante a fase aguda. As razões IL-4/IFN- γ e IL-4/IL-10 durante a fase aguda também revelam que o equilíbrio entre a resposta Th2 e a resposta Th1 e regulatória não é afetada em camundongos ST2^{-/-}. A ausência de alterações nas citocinas e imunoglobulinas de perfil tipo 2 indica que a via IL-33/ST2 não foi essencial para o início e manutenção de uma resposta Th2 na esquistossomose aguda, diferindo dos dados que demonstram a importância desta via para ativação da resposta Th2 em outros modelos inflamatórios (Schmitz *et al.* 2005; Price *et al.* 2010; Neill *et al.* 2010; Nunes *et al.* 2014). Estes dados sugerem que vias independentes da ativação IL-33/ST2 devem estar envolvidas na indução da resposta Th2 durante a infecção por *S. mansoni*. Já foi demonstrado que antígenos dos ovos de *S. mansoni*, como ômega-1 e LNFPIII, induzem a resposta Th2 por modulação funcional de células dendríticas ou servindo como adjuvantes (Okano *et al.* 2001; Thomas *et al.* 2003; Everts *et al.* 2009; Steinfeldt *et al.* 2009). De maneira semelhante, Massacand e colaboradores (2009) mostraram que antígenos de *Nippostrongylus brasiliensis* e *Heligmosomoides polygyrus* podem modular diretamente a produção de IL-12p40 de células dendríticas e a diferenciação de células Th2 ainda pode ocorrer em camundongos knockout para linfomaietina estromal tímica (TSLP). Além disso, Vannella *et al.* (2016) mostraram que a inibição individual da via IL-33/ST2, IL-25 ou TSLP por si só não pode interromper o início da resposta Th2 em infecções por *S. mansoni*, pois é necessária a ablação concomitante das três vias para que isso ocorra. Assim, nossos dados suportam que os antígenos de *S. mansoni* podem desencadear uma resposta Th2 durante a infecção aguda de um modo independente de IL-33/ST2. Embora não tenhamos detectado diferenças significativas na resposta imune hepática de camundongos ST2^{-/-} durante a esquistossomose aguda, um aumento significativo no nível de atividade de ALT sérica foi observado nesses camundongos em comparação com WT, indicando assim que estes animais foram menos eficientes na contenção de substâncias citotóxicas dos ovos, resultando em maior dano ao fígado. A importância do granuloma para contenção do dano tecidual produzido por antígenos do ovo de *S. mansoni* tem sido amplamente relatado na literatura (Reitman *et al.* 1957; Abdulla *et al.* 2011; Rezende *et al.* 2020).

Em contraste com a fase aguda da infecção, a resposta hepática de camundongos ST2^{-/-} infectados cronicamente mostrou diferenças importantes, principalmente com menor produção de IL-4, IL-13, IL-10, IL-17 e IFN- γ , acompanhada pelo aumento da infiltração de neutrófilos e eosinófilos. Em camundongos WT, os granulomas hepáticos formados na fase crônica da esquistossomose experimental são geralmente menores, com menor infiltração de células inflamatórias e maior deposição de colágeno que os formados durante a infecção aguda, causando uma patologia reduzida (McManus *et al.* 2018; Wynn *et al.* 2004). Essa redução de tamanho dos granulomas hepáticos durante a esquistossomose experimental crônica foi observada em ambos os grupos, mas os granulomas dos camundongos deficientes para ST2 ainda eram maiores do que os dos camundongos WT. Isso contrasta com trabalhos anteriores que usaram diferentes abordagens para inibir a via IL-33/ST2, nas quais os granulomas do fígado não mostraram diferença no tamanho ou eram menores quando comparados aos grupos de controle (Yu *et al.* 2015; Vanella *et al.* 2016; He *et al.* 2018). Embora tenha havido uma redução na concentração de IL-4 no fígado de camundongos ST2^{-/-} cronicamente infectados, a redução de IFN- γ e IL-10 foi maior; portanto, as razões IL-4/IFN- γ e IL-4/IL-10 indicam claramente uma maior polarização da resposta Th2 no fígado nestes camundongos em comparação as respostas Th1 e regulatórias. Essas citocinas têm um papel sinérgico na neutralização da patologia mediada por Th2 causada nas infecções por *S. mansoni* (Hoffmann *et al.* 2000; Hesse *et al.* 2004; Taylor *et al.* 2006; Haeberlein *et al.* 2017). A predominância de uma resposta Th2 também é apoiada pelo aumento da infiltração de eosinófilos e dos níveis de CCL24 (Hogan 2009; Ariyaratne & Finney 2019; Wen & Rothenberg 2016). Além disso, uma resposta Th17, principalmente via IL-17, também foi associada à patologia mais grave na esquistossomose (Rutitzky *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2012; Chen *et al.* 2013; Zhang *et al.* 2015). Como a IL-17 e o IFN- γ podem regular um ao outro (Rutitzky *et al.* 2011), a razão IL-17/IFN- γ na fase crônica também indica claramente uma predominância de IL-17 sobre IFN- γ , diferindo da fase aguda e da infecção crônica em camundongos WT. A maior infiltração de neutrófilos também é apoiada pelo aumento da razão IL-17/IFN- γ , visto que a resposta Th17 está relacionada à inflamação do granuloma nas infecções por *S. japonicum*, parcialmente devido ao recrutamento de neutrófilos (Zhang *et al.* 2012). Portanto, o aumento da mortalidade observada na ausência da via IL-33/ST2 é provavelmente devido a uma alteração nos mecanismos de modulação das respostas Th2 e Th17 durante a esquistossomose crônica, o que leva a um aumento da infiltração de granulócitos e desorganização da reação do granuloma.

A via IL-33/ST2 tem sido associada à gravidade em vários modelos de doenças cuja patologia envolve fibrose, como fibrose hepática induzida por tioacetamida e por CCL₄ (Liu *et*

al. 2012; Mchedlidze *et al.* 2013), fibrose pulmonar induzida por bleomicina (Luzina *et al.* 2013; Li *et al.* 2014), infecção por *Helicobacter hepaticus* (Cao *et al.* 2020) e a própria esquistossomose (Yu *et al.* 2015; Vanella *et al.* 2016; He *et al.* 2018; Li *et al.* 2019). No entanto, em alguns modelos experimentais de infecções, a exemplo da malária cerebral ocasionada pela infecção por *Plasmodium berghei*, IL-33 tem se mostrado uma citocina importante quando se trata de controle patológico, apesar de não estar envolvida no controle da parasitemia (Besnard *et al.* 2015). Em estudos com populações humanas, também há evidências de que os níveis plasmáticos de IL-33 não estão relacionados à gravidade da fibrose hepática na esquistossomose (Kamdem *et al.* 2019).

Neste capítulo, o uso de camundongos ST2^{-/-} mostrou que a ativação da via IL-33/ST2 durante a esquistossomose experimental tem fundamental importância para a modulação do granuloma e sobrevivência adequada durante a infecção crônica por *S. mansoni*, que vai além da fibrose hepática; no entanto, a participação da via IL-33/ST2 no mecanismo de fibrose associada à esquistossomose precisa ser melhor estudado.

7. CAPÍTULO 2

PAPÉL DA ATIVAÇÃO DA VIA IL-33/ST2 NO DESENVOLVIMENTO DA **FIBROSE HEPÁTICA INDUZIDA** POR GRANULOMAS DE *SCHISTOSOMA MANSONI* EM CAMUNDONGOS

Dados ainda não publicados

Os ovos de *Schistosoma mansoni* são frequentemente retidos em diferentes órgãos do hospedeiro, sendo o fígado o principal afetado, e este processo lesiona células endoteliais e hepáticas que resulta na liberação da alarmina IL-33. A participação da ativação da via IL-33/ST2 foi demonstrada em modelos de doenças inflamatórias que resultam em fibrose, como a fibrose pulmonar e hepática induzidas quimicamente; entretanto, na fibrose hepática em consequência da esquistossomose permanece pouco explorado, tornando-se o objetivo deste capítulo. Para isto, marcadores de fibrose foram avaliados no fígado de camundongos BALB/c WT e deficientes no receptor de IL-33 (ST2^{-/-}) infectados com *S. mansoni*. A carga parasitária foi inicialmente mensurada pela contagem de ovos no lobo esquerdo do fígado. Foram realizadas análises histopatológicas e morfométricas da inflamação hepática e fibrose induzida pelo trematódeo, utilizando as colorações de Tricrômio de Masson, Picrosirius e Prata Amoniacal de Gomori. Também foi quantificado a concentração tecidual hidroxiprolina e a expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) em células que compõem o granuloma hepático, através de análise imunohistoquímica. Nossos dados mostraram que a contagem de ovos e o conteúdo de hidroxiprolina no fígado dos animais infectados foram semelhantes nas duas linhagens. No entanto, a análise histopatológica revelou que a matriz extracelular nos granulomas de camundongos ST2^{-/-} apresenta-se desorganizada. Durante a esquistossomose aguda, o tecido hepático de camundongos ST2^{-/-}, apesar da expressão aumentada de mRNA para *TGF- β* , apresentou diminuição de α -SMA em células do granuloma hepático, indicando menor ativação de HSC e redução na diferenciação de miofibroblastos. A infecção por *S. mansoni* induziu aumento da expressão de *Col I* em ambas linhagens de camundongos, mas somente camundongos WT infectados mostraram aumento significativo da expressão de *Col III* e *Col VI*, resultando em diferença significativa entre camundongos WT e ST2^{-/-}. Acompanhando a expressão reduzida de *Col III* e *Col VI*, a presença de fibra reticular nos granulomas também foi diminuída nos camundongos deficientes, sugerindo que as diferenças na formação e deposição da matriz extracelular do granuloma hepático destes animais seria consequência das diferentes proporções nos tipos de colágeno encontrados. Os dados indicam que a ativação da via IL-33/ST2 é essencial para transdiferenciação de miofibroblastos e para produção de colágenos do tipo III e VI, resultando na redução de formação de fibras reticulares e desorganização do granuloma hepático de camundongos infectados por *S. mansoni*.

Palavras-chave: *S.mansoni*, colágeno, matriz extracelular, miofibroblastos, granuloma, fibras reticulares

7.1 RESULTADOS – Capítulo 2

7.1.1 Diferenciação de células estreladas hepáticas (HSC)

A transdiferenciação de HSC em miofibroblastos é parte importante na produção de matriz extracelular observada na fibrose hepática; e este processo é caracterizado pela expressão de α -actina de músculo liso (α -SMA) (Bachem *et al.* 1992; Carson *et al.* 2018). A análise imunohistoquímica do fígado de camundongos WT e ST2^{-/-} infectados revelou que muitas células de granulomas formados durante a esquistossomose aguda (fig. 16A) e crônica (fig. 16C) em camundongos WT expressaram α -SMA; entretanto, nos camundongos ST2^{-/-} infectados observamos poucas células na reação granulomatosa expressando α -SMA (fig. 16B e 16D). A análise morfométrica da área corada em marrom em camundongos infectados cronicamente confirmou a presença de menor quantidade de células α -SMA⁺ nos granulomas hepáticos na ausência da ativação da via IL-33/ST2 (fig. 16E).

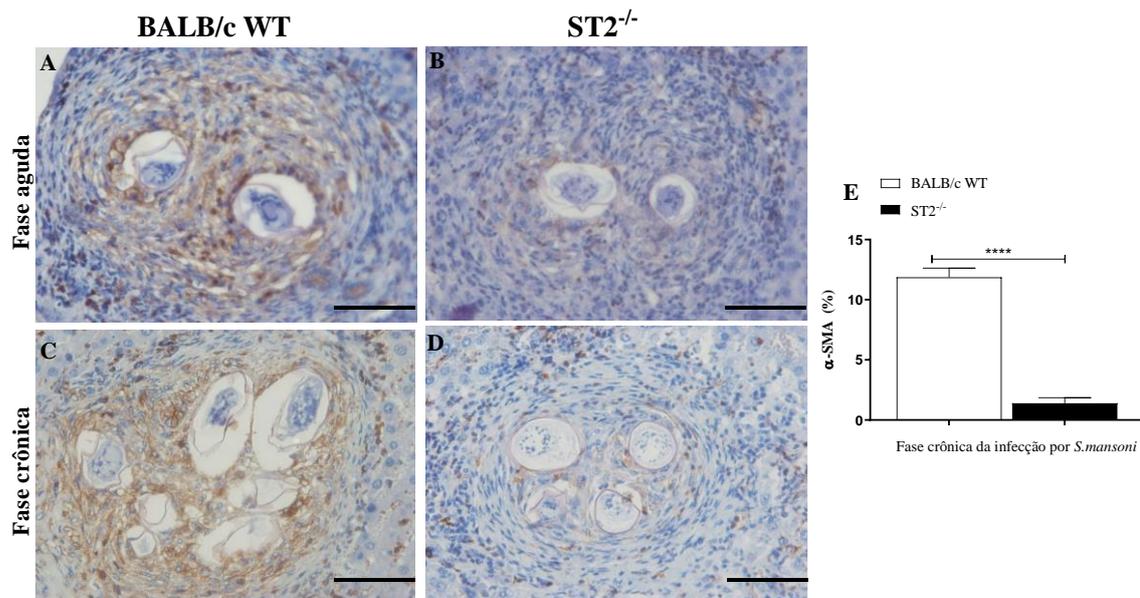


Figura 16. Análise imunohistoquímica da expressão de α -SMA em granulomas hepáticos induzidos por *S.mansoni*. (A-D) Fotomicrografias representativas do tecido hepático de camundongos WT e ST2^{-/-} após incubação com anticorpo anti- α -SMA infectados com *S. mansoni*. Escala de barra = 50 μ m. A presença de células α -SMA⁺ foi revelada com substrato para peroxidase e está representada em marrom. (A) Granuloma hepático de camundongo WT após 8 semanas da infecção por *S. mansoni* (fase aguda) (B) Granuloma hepático de camundongo ST2^{-/-} após 8 semanas da infecção por *S.mansoni* (fase aguda). (C) Granuloma hepático de camundongo WT após 14 semanas de infecção por *S.mansoni* (fase crônica). (D) Granuloma hepático de camundongo ST2^{-/-} após 14 semanas de infecção por *S.mansoni* (fase crônica). (E) Análise morfométrica mostrando a porcentagem de área marcada com α -SMA por campo nos granulomas hepáticos durante a fase crônica da infecção. Foram analisados 3 camundongos por grupo. As barras mostram a média \pm erro padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas pelo teste de Mann-Whitney e o valor de *p* foi atribuído. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de diferentes linhagens (**** *p* < 0,0001).

7.1.2 Deposição de colágeno

Para avaliação da produção e deposição de colágeno em granulomas hepáticos de camundongos WT e ST2^{-/-} os níveis de hidroxiprolina foram mensurados. Confirmando nossos dados anteriores (Maggi *et al.* 2021), o número de ovos de *S. mansoni* retidos no tecido hepático de ambas as linhagens foi estatisticamente semelhante no decorrer da infecção (fig. 17A). A concentração de hidroxiprolina no fígado aumentou significativamente durante a fase crônica da infecção, tanto em WT como em ST2^{-/-}, mas não houve diferenças entre as linhagens de camundongos (fig. 17B). A análise histopatológica do tecido hepático corado com Tricromio de Masson, coloração específica para deposição de colágeno, revelou que, embora o conteúdo hepático de hidroxiprolina em camundongos infectados de ambas as linhagens fosse semelhante, o padrão de deposição de colágeno nos granulomas mostrou diferenças marcantes entre os grupos, especialmente na fase crônica da infecção por *S. mansoni* (fig. 17C-D). Na fase crônica da esquistossomose, observou-se que em camundongos WT a deposição de colágeno no granuloma foi compacta e organizada em fibras bem delimitadas ao redor dos ovos (fig. 17C), porém em camundongos ST2^{-/-}, o colágeno apresenta-se desorganizado e distribuído livremente e amplamente ao redor dos ovos, além de mostrarem um infiltrado celular acentuado (fig 17D).

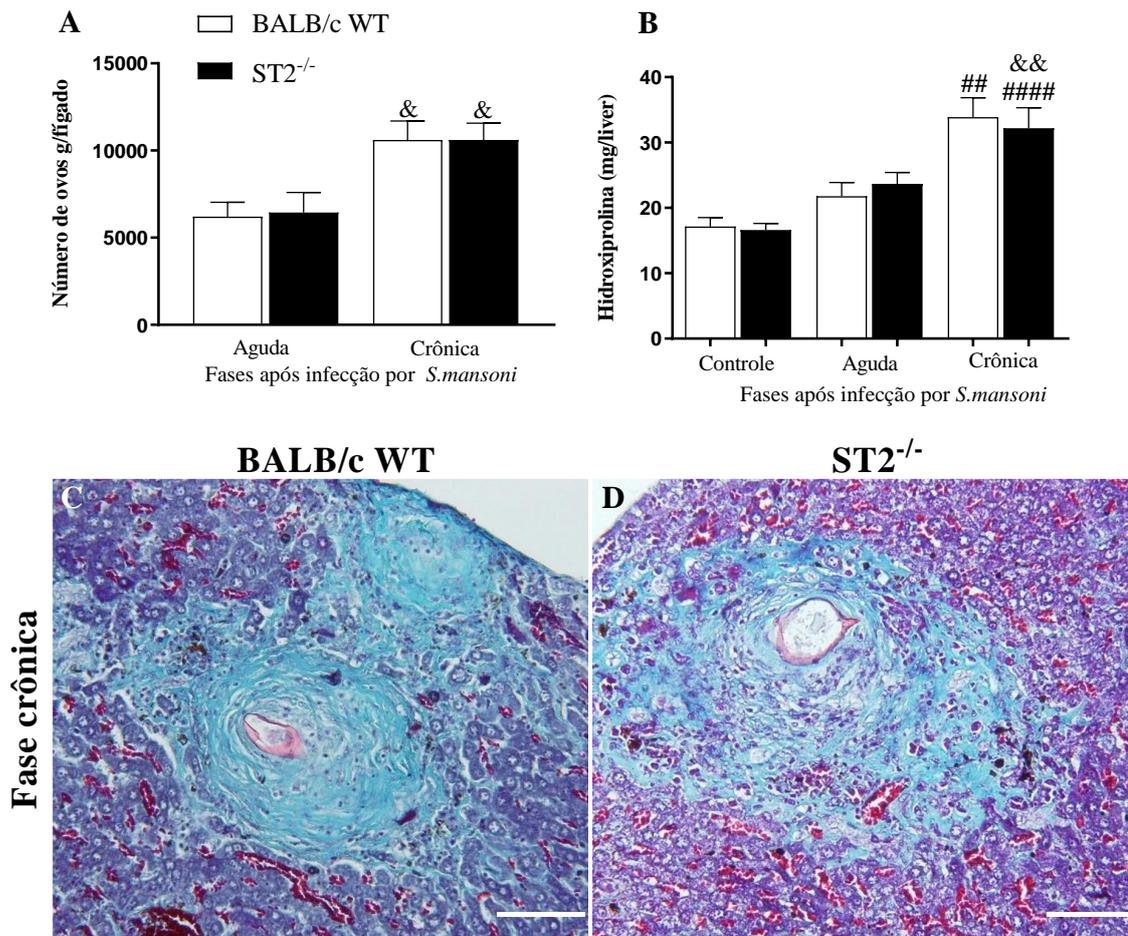


Figura 17. Avaliação da deposição de colágeno no fígado de camundongos WT e ST2^{-/-} infectados com *S.mansoni*. (A) Quantificação de ovos no fígado de camundongos WT e ST2^{-/-} na fase aguda e crônica. (B) Quantificação das concentrações de hidroxiprolina nos fígados de camundongos WT e ST2^{-/-} infectados e não infectados. Foram analisados 12 camundongos por grupo. As barras mostram a média \pm erro padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas por Two-Way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e o valor de *p* foi atribuído. # representa diferenças significativas entre camundongos infectados e o respectivo controle não infectado; & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos da mesma linhagem da fase aguda. (&& ou ## *p* <0,01; ##### *p* <0,0001). (C) Fotomicrografias coradas com Tricrômio de Masson de granuloma hepático de camundongo WT durante a fase crônica (14 semanas) de infecção por *S.mansoni*. (D) Fotomicrografias coradas com Tricrômio de Masson de granuloma hepático de camundongo ST2^{-/-} durante a fase crônica (14 semanas) de infecção por *S.mansoni*. Escala de barra = 50 μ m.

7.1.3 Expressão de genes pró-fibróticos e diversidade de tipos de fibras de colágeno no granuloma periovular hepático

Para avaliar como a ausência de ativação da via IL-33/ST2 afeta a expressão de genes associados à fibrose hepática em camundongos infectados, foi realizado uma RT-PCR (fig. 18). A infecção por *S. mansoni* aumentou significativamente os níveis de mRNA de *TGF- β* em camundongos ST2^{-/-} em comparação ao seu controle não infectado e aos camundongos infectados com WT na fase aguda. Durante a esquistossomose crônica, a expressão diminuiu

para níveis semelhantes aos dos camundongos WT, mas ainda significativamente maior do que o nível detectado em camundongos do grupo controle (fig. 18A). Em relação aos níveis de mRNA do *Col I* (fig. 18B), todos os camundongos infectados, na fase aguda e crônica, apresentaram aumento em relação aos seus respectivos controles não infectado. No entanto, não foram encontradas diferenças entre as linhagens avaliadas. Quanto a expressão de *Col III* (fig. 18C) e de *Col VI*, sua expressão foi significativamente alta nos camundongos WT comparado aos seus respectivos controles, tanto na fase aguda como crônica da esquistossomose experimental. Em contraste, nos camundongos *ST2^{-/-}* infectados a expressão de *Col III* (fig. 18C) e de *Col VI* (fig. 18D) foram estatisticamente semelhantes ao detectado nos animais não infectados (controle), tanto na fase aguda como na crônica da esquistossomose, resultando em diferença estatística em relação à expressão genica observada em camundongos WT em ambas as fases da infecção por *S. mansoni*.

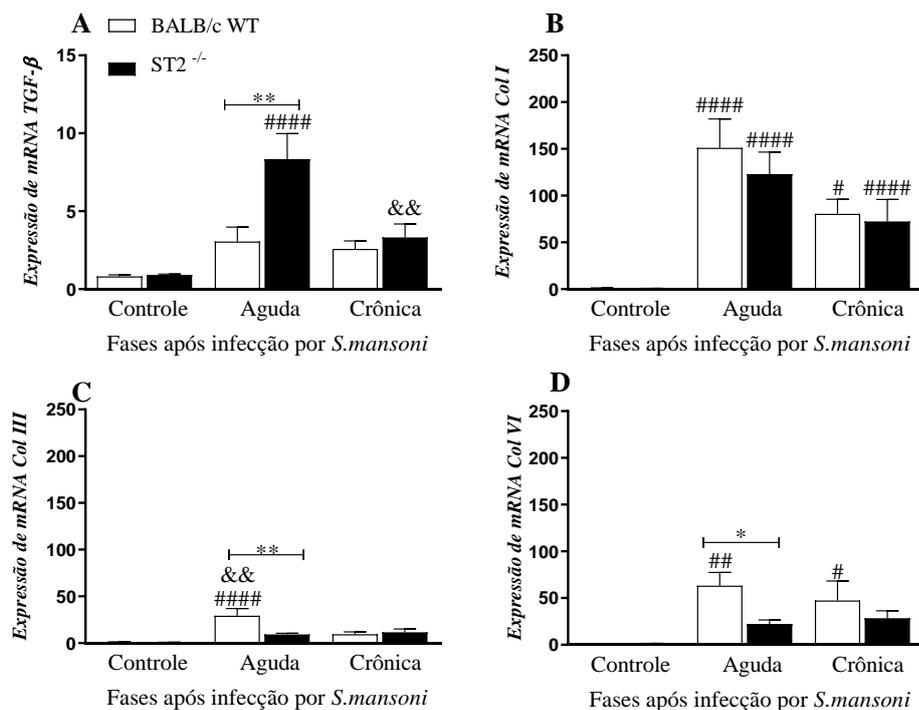


Figura 18. Expressão de genes pró-fibróticos no fígado de camundongos WT e *ST2^{-/-}* infectados. A RT-PCR foi realizada com a extração de mRNA do homogenato do fígado de camundongos WT e *ST2^{-/-}* infectados e não infectados com 8 e 12 semanas de infecção. Foram utilizados 5 camundongos por grupo. Quantificação relativa de mRNA de (A) *TGF-β*, (B) *Col I* (C) *Col III* e (D) *Col VI*. As barras mostram a média \pm erro padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas por Two-Way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e o valor de *p* foi atribuído. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de diferentes linhagens; # representa diferenças significativas entre camundongos infectados e o respectivo controle não infectado; & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos da mesma linhagem infectados na fase aguda. (*, # ou & *p* <0,05; **, ## ou && *p* <0,01; ##### *p* <0,0001).

Para uma melhor caracterização dos diferentes tipos de fibras de colágeno e como estão dispostos nos granulomas, utilizamos os cortes hepáticos corados com Picrosirius Red e analisamos sob luz normal e polarizada. Embora a coloração de Picrosirius tenha demonstrado a deposição de colágeno na reação granulomatosa em ambas as linhagens de camundongos (fig. 19A-D), a análise dos cortes hepáticos sob luz polarizada confirmou que granulomas de camundongos WT (fig. 19C) apresentaram fibras de colágeno vermelho e verde, que representam colágenos tipo I e III, respectivamente. Em contraste, as fibras presentes em camundongos $ST2^{-/-}$ eram quase todas vermelhas sob luz polarizada, indicando uma clara predominância de colágeno tipo I (fig. 19D), confirmando os dados de expressão de colágeno (fig. 18B e 18C). Padrão semelhante foi observado nas fases aguda e crônica da esquistossomose experimental.

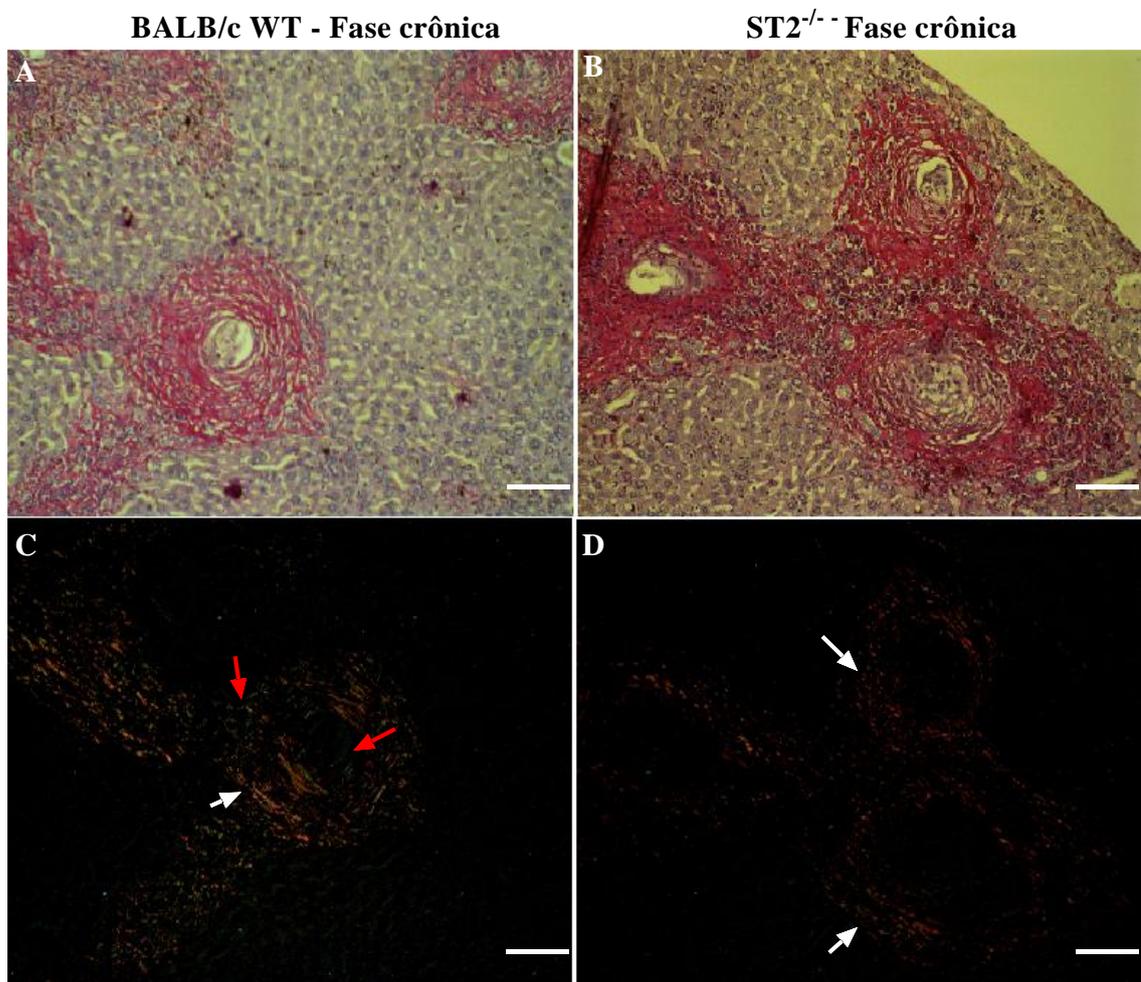


Figura 19. Deposição de fibras de colágeno na coloração de Picrosirius Red em granulomas hepáticos de camundongos WT e ST2^{-/-} infectados com *S.mansoni*. Fotomicrografias demonstrativas de cortes de fígado de camundongos WT e ST2^{-/-} infectados e coradas com Picrosirius Red. Escala de barra = 50µm. (A) Granuloma hepático de camundongo WT em fase crônica sob microscopia óptica (B) Granuloma hepático de camundongo ST2^{-/-} em fase crônica sob microscopia óptica (C) Granuloma hepático de camundongo WT em fase crônica sob luz polarizada (D) Granuloma hepático de camundongo ST2^{-/-} em fase crônica sob microscopia óptica. (→) setas vermelhas indicam a presença de colágeno I e III (coloração verde); (→) setas brancas indicam a presença de colágeno I (coloração avermelhada).

7.1.4 Presença de fibras reticulares

O efeito da redução da deposição de colágeno III e VI em granulomas hepáticos formados na ausência de ativação da via IL-33/ST2, e a presença e disposição de fibras reticulares na matriz extracelular de granulomas também foi avaliada para melhor compreensão em lâminas coradas com Prata Amoniacal de Gomori (fig. 20). As diferenças nas fibras de colágeno nos granulomas WT e ST2 foram mais evidentes na fase crônica. Conforme ilustrado na fig. 20B e confirmado com análise morfométrica, os granulomas formados na ausência de sinalização de IL-33/ST2 apresentam uma redução significativamente na formação e deposição de fibras reticulares (fig. 20B e 20C). Em contraste, camundongos WT desenvolveram granulomas com fibras reticulares bem organizadas ao redor dos ovos, como podemos observar a área preta na periferia do ovo (fig. 20A).

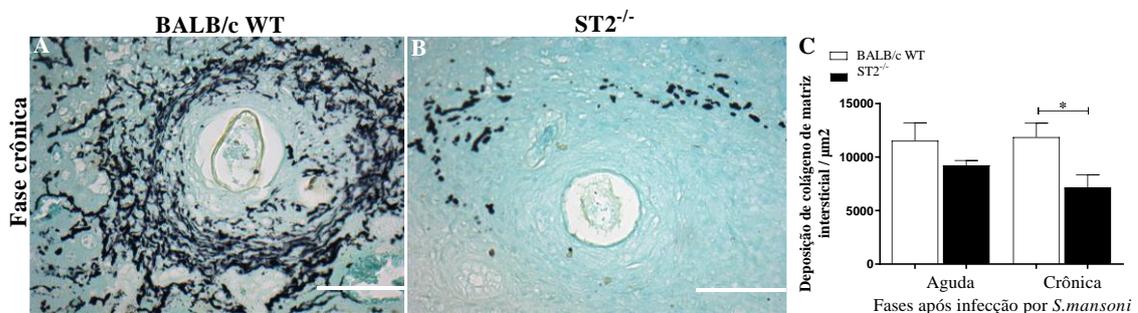


Figura 20. Deposição de colágeno intersticial em granulomas hepáticos. Fotomicrografias representativas de cortes de fígado coradas com Prata Amoniacal de Gomori de camundongos WT e ST2^{-/-} infectados com *S. mansoni* na fase aguda ou crônica. Escala de barra = 50µm. (A) Granuloma de camundongo WT após 14 semanas de infecção com *S. mansoni* (fase crônica) (B) Granuloma de camundongo ST2^{-/-} após 14 semanas de infecção com *S. mansoni* (fase crônica). (C) Análise morfométrica de fibras reticulares em cortes de fígado de camundongos infectados durante as fases aguda e crônica da infecção. Os dados são representados em média ± erro padrão. As comparações entre os grupos foram realizadas por Two-Way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e o valor *p* foi atribuído. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de diferentes linhagens (* *p* < 0,05).

7.2 DISCUSSÃO - Capítulo 2

A fibrose hepática é consequência de uma inflamação persistente e progressiva ocasionada pelo excesso de danos gerados ao fígado, que resulta em uma resposta anormal e

exacerbada de cicatrização deste tecido lesionado (Seki & Brenner 2015; Aydin & Akçalr 2018). Evidências experimentais sugerem que, quando ocorre dano hepático agudo, a liberação da alarmina IL-33 por células endoteliais e hepatócitos lesados pode contribuir para indução da resposta imune que leva a remodelação e proteção tecidual; entretanto, em lesões crônicas a liberação continuada desta alarmina torna-se um fator crucial de indução da fibrose hepática e precisa ser melhor investigada (Weiskirchen & Tacke 2017). Múltiplos fatores podem resultar em fibrose hepática, entre eles hepatites virais, consumo excessivo de álcool, e infecções parasitárias como a esquistossomose. A patologia crônica causada pela infecção por *S. mansoni* é iniciada pela retenção dos ovos nos capilares hepáticos, que ativam elementos das respostas imune inata, Th1, Th2, Th17 e regulatória, levando à formação de granulomas, processo que muitas vezes resulta em um quadro de fibrose hepática, que é uma das principais alterações associadas aos casos crônicos graves desta parasitose (Pearce & MacDonald 2002; Taylor *et al.* 2006; Smith *et al.* 2009; Carson *et al.* 2018; Yu *et al.* 2021). Neste capítulo, nós avaliamos a participação da ativação da via IL-33/ST2 no desenvolvimento da fibrose hepática ocasionada pela infecção experimental de *S. mansoni*. Nossos dados indicam que a ausência de ativação da via IL-33/ST2 durante a infecção experimental por *S. mansoni* não alterou significativamente o conteúdo hepático de hidroxiprolina, uma medida indireta de deposição de colágeno no tecido. Entretanto, os animais ST2^{-/-} apresentaram menor ativação de células estreladas hepáticas (HSC) e, conseqüentemente, menor diferenciação destas células em miofibroblastos. A menor diferenciação de miofibroblastos foi acompanhada por redução da expressão de colágeno do tipo III e do tipo VI e da formação de fibras reticulares de colágeno no granuloma esquistossomótico.

As HSC são células residentes no parênquima hepático, localizadas no espaço de Disse entre as células endoteliais sinusóidais e os hepatócitos, sendo demonstrado que a transdiferenciação destas células, do seu estado quiescente para estágio de miofibroblasto, com atividade pró-fibrótica e proliferativa, têm um papel central na patogênese da fibrose hepática induzida por diferentes agentes lesivos ou inflamatórios (Benyon & Arthur 2001; Seki & Brenner 2015; Tsuchida & Friedmann 2017). Dados da literatura indicam que a ativação de HSC e sua diferenciação em miofibroblasto é um processo complexo com a participação de múltiplos fatores produzidos por células residentes ou recrutadas, que atuam em diferentes momentos do processo de ativação, proliferação, fibrogenese e regulação dos miofibroblastos (Tsuchida & Friedmann 2017). Dentre as principais vias de ativação das HSC, podemos citar primeiramente, o dano epitelial hepático, como por exemplo, a morte de hepatócitos e de células biliares epiteliais, que induzem a ativação das HSCs diretamente ou através de citocinas

liberadas pelas células de Kupffer, monócitos derivados de medula óssea, células Th17 e/ou linfócitos inatos (ILC) (Seki & Brenner 2015). Citocinas e fatores de crescimento, como TGF- β , IL-13, IL-1 β , IL-17, PDGF (platelet-derived growth factor), CTGF (connective tissue growth factor) e VEGF (vascular endothelial growth factor), bem como presença de LPS, elementos da via Hedgehog (Hh) e interação da matrix extracelular com ligantes na superfície de HSC já foram descritas como determinantes na regulação do processo de ativação de HSC em resposta a diferentes mecanismos de indução de fibrose hepática (Lee *et al.* 2001; Seki & Brenner 2015; Higashi *et al.* 2017; Tsuchida & Friedmann 2017). Além dos fatores discutidos, Marvie *et al.* (2010) demonstraram que a liberação de IL-33 foi correlacionada com a expressão de ST2 e de colágenos no modelo de fibrose induzida por CCl₄ e na fibrose hepática humana. Nestes modelos, IL-33 ativa a produção precoce de IL-13 em linfócitos imune inatos do tipo 2 (ILC2) e macrófagos residentes do fígado, que por sua vez desencadeiam a ativação e transdiferenciação de HSCs de uma forma dependente do fator de transcrição STAT6 e da expressão do receptor de IL-4 tipo 2, ao qual IL-13 se liga, contribuindo para ativação celular e desencadeando assim o processo de fibrose (McHedlidze *et al.*, 2013).

Na esquistossomose, evidências experimentais indicam que HSCs ativadas também sejam uma das principais fontes de deposição de colágeno, sendo essencial na fibrose hepática e na remodelação da matriz extracelular (Benyon & Arthur 2001; Carson *et al.* 2018). O processo de fibrose hepática induzida na esquistossomose experimental pode ser dividido em quatro estágios: recrutamento de fibroblastos e/ou a diferenciação das HSC; a proliferação das HSC; produção de colágenos e formação da matriz extracelular seguida da sua remodelação (Grimaud 1987; Benyon & Arthur 2001; Booth *et al.* 2004; Anthony *et al.* 2010b). Entretanto, a participação de IL-33 no processo de ativação das HSCs e fibrose hepática induzida pela deposição de ovos de *Schistosoma* sp ainda é menos conhecida (Osman *et al.* 2006; McHedlidze *et al.* 2013; Carson *et al.* 2018). Nossos dados revelam que a infecção por *S. mansoni* em camundongos ST2^{-/-} resultou em redução significativa da expressão de α -SMA em células recrutadas para o granuloma esquistossomótico hepático, sugerindo que a ativação da via IL-33/ST2 é essencial para ativação, migração e/ou proliferação de HSCs em miofibroblastos neste modelo de fibrose hepática. Surpreendentemente, os níveis de expressão gênica de TGF- β , um dos principais ativadores de HSCs já descrito (Bachem *et al.* 1992; Carson *et al.* 2018), foram significativamente maiores em animais ST2^{-/-} comparado aos WT, durante a esquistossomose experimental aguda, sugerindo um problema na expressão da forma ativa desta citocina e/ou outras vias de ativação/proliferação de miofibroblastos na esquistossomose. Neste sentido, é importante salientar que a concentração de TGF- β no homogenato hepático de camundongos

ST2^{-/-} infectados foram semelhantes ao detectado em WT, enquanto que a concentração de IL-17 foi maior e de IL-13 foi menor nestes animais (Fig. 12 – capítulo 1: Maggi *et al.* 2021).

Kaviratne e colaboradores (2004), demonstraram que animais IL-13^{-/-} infectados com *S.mansoni* apresentaram a quase completa anulação do processo de fibrose apesar da produção contínua e inalterada de TGF- β . Estes autores demonstraram que ao inibir parte da cascata de sinalização de TGF- β durante a esquistossomose experimental não houve alteração no desenvolvimento da fibrose ou na produção de IL-13, comprovando que o processo de fibrose hepática induzida pela infecção por *S. mansoni* é dependente de IL-13, mas independente de TGF- β . Conforme demonstrado em outros modelos de fibrose hepática, IL-13 pode ser ativada pela via de IL-33, o que implica que o mecanismo de fibrose hepática durante a esquistossomose é impulsionado principalmente por um equilíbrio de IL-33 e IL-13, em vez de TGF- β (Carson *et al.* 2018). Outra possibilidade para explicar nossos dados em relação a menor ativação das HSC em animais ST2^{-/-} infectados apesar dos altos níveis de expressão de TGF- β pode estar relacionado a necessidade da ativação de IL-33/ST2 para a expressão dos receptores de TGF- β nas HSC, e assim possibilitar sua diferenciação em miofibroblastos.

Esta fraca ativação das HSCs em animais ST2^{-/-} também foi comprovada por Tan e colaboradores (2017) no modelo experimental de fibrose por ligação do ducto biliar (BDL). As HSC isoladas de animais ST2^{-/-} mesmo estimuladas com altas concentrações (100ng/mL) de IL-33 recombinante não conseguiram ser ativadas, como também não conseguiram ativar os fatores de transcrição JNK/ERK/p38 da via MAPK que são associadas a funcionalidade da via IL-33/ST2, mostrando que o efeito biológico de IL-33 é dependente da ativação da via MAPK e da sinalização de ST2 nas HSC. Ao inibirem a via JNK/ERK/p38-MAPK em HSCs isoladas de animais C57BL/6, uma diminuição drástica na produção de colágeno foi observada, indicando que a sinalização de IL-33/ST2 por esta via é essencial para ativação e funcionalidade das HSCs.

Diferentes populações de miofibroblastos são observados durante o desenvolvimento da fibrose ao redor dos granulomas. A deposição de colágeno na área mais interna do granuloma parece estar associada a miofibroblastos derivados de um capilar do sistema porta hepático localizado ao redor dos ovos apresionados, enquanto a deposição mais externa, geralmente em uma área de 100 μ m de distância dos ovos, surgem de células hepáticas estreladas ativadas (Lenzi *et al.* 2006). Como a diminuição da área de α -SMA foi generalizada em nossas lâminas analisadas, pode-se sugerir que animais ST2^{-/-} apresentem uma deficiência também em ativar ambos tipos de miofibroblastos o que pode refletir a deficiência na deposição de diferentes tipos de colágeno e na menor produção das fibras reticulares.

Apesar de ausência da ativação de IL-33 impossibilitar a correta diferenciação de miofibroblastos durante a infecção por *S.mansoni*, a deposição de ovos e o conteúdo de hidroxiprolina encontrado no fígado destes animais foram semelhantes. Corroborando com nossos dados, Vanella e colaboradores (2016) também observaram níveis altos e semelhantes do conteúdo de hidroxiprolina no fígado de camundongos IL-33^{-/-} infectados com *S.mansoni*. Apesar de nossos dados mostrarem que o conteúdo tecidual de hidroxiprolina ter sido semelhante entre as duas linhagens de camundongo analisadas, foram marcantes as diferenças na deposição de colágeno no granuloma entre animais WT e ST2^{-/-}, retratadas pela coloração Tricrômio de Masson. Animais deficientes depositam colágeno de forma totalmente desorganizada e exsudativa. Condizente com o aumento de hidroxiprolina, houve um aumento da transcrição de mRNA de *Col I* no fígado de BALB/c WT e ST2^{-/-} infectados, enquanto os colágenos III e VI aumentaram apenas para os animais WT. A produção e deposição de colágeno do tipo I e do tipo III são comumente encontrados no granuloma esquistossomótico, sendo que o colágeno I é o que prevalece durante a fase crônica da esquistossomose (Olds *et al.* 1985; Adnani 1985; King 2001; Anthony *et al.* 2010b). Nossos dados, mostraram que a expressão de *Col I* foi mantida na ausência da via IL-33/ST2, mas a ausência do receptor ST2 reduziu significativamente a expressão de *Col III* e *Col VI* na fase aguda da esquistossomose, resultado confirmado pela análise histológica com coloração de Picrosirius em luz polarizada. A indução de expressão de *Col I* nos animais ST2^{-/-} infectados pode estar relacionada à alta expressão de mRNA de *TGF-β*, e aos níveis aumentados de IL-17 no fígado já que estas citocinas são descritas como potentes indutores da produção de colágeno do tipo I (Hellerbrand *et al.* 1999; Meng *et al.* 2012; Tsuchida & Friedmann 2017). Enquanto, a redução dos níveis de colágeno III, estão de acordo com dados encontrados na literatura para o modelo de tendiopatía humana e murina, no qual foi possível relacionar IL-33 com a síntese de colágeno III, mostrando que esta citocina desempenha um papel fundamental na transição da síntese de colágeno III, através da regulação de miRNA29a, ou seja, quando há regulação negativa de miRNA29a em tenócitos humanos é visto a indução e aumento na expressão de IL-33 e colágeno III e, conseqüentemente na remodelação inicial do tendão (Millar *et al.* 2015).

A conseqüência da menor produção de colágeno tipo III e VI na ausência da ativação do receptor ST2, resultou na menor deposição e maior desorganização das fibras reticulares nestes animais. As fibras reticulares são fibras contínuas de colágeno compostas de colágeno tipo I e III em associação com outros colágenos, como o V (Ushiki *et al.* 2002); e esta rede de fibras auxilia na proteção do tecido lesionado contribuindo principalmente para a contenção dos antígenos dos ovos (Pearce & MacDonald 2002; Costain *et al.* 2018). Em conseqüência

desta desorganização na deposição da matriz extracelular e na grande redução na formação de fibras reticulares no granuloma esquistossomótico formado em animais $ST2^{-/-}$, estas estruturas podem não confinar corretamente os antígenos liberados pelos ovos de *S.mansoni*, desenvolvendo maiores lesões hepáticas como observado nas histopatologias e consequentemente maior mortalidade (Fig. 9- capítulo 1; Maggi *et al.* 2021).

Esta diferença da produção dos tipos de colágenos, pôde ser notada em outro modelo experimental, como demonstrado por Li e colaboradores (2014) no modelo de indução de fibrose pulmonar em camundongos $ST2^{-/-}$ e C57BL/6 WT submetidos à inoculação com bleomicina. Nestes animais, a bleomicina estimulou a expressão de colágeno I de forma semelhante em ambas as linhagens de camundongos, porém foi verificado uma significativa redução da expressão de *Col III* nos animais $ST2^{-/-}$, que foi associado a reparação precoce de fibrose. Quando camundongos WT receberam mIL-33 juntamente com a bleomicina foi observado um aumento de células inflamatórias como macrófagos alternativamente ativados (M2) e ILC2 que aumentaram a produção de IL-13 e TGF- β , de colágeno solúvel e da expressão de *Col III*, e, consequentemente, aumentou o score da fibrose.

Além das HSCs, os macrófagos alternativamente ativados também têm uma especial função no processo de fibrose. Macrófagos alternativamente ativados expressam tipicamente baixos níveis de citocinas inflamatórias e altos níveis de TGF- β , que tendem a promover a expressão de colágeno e a fibrose (Spencer *et al.* 2010). Na esquistossomose, evidências experimentais indicam que macrófagos M2 tem uma participação fundamental no desenvolvimento da fibrose e na reparação tecidual (Gordon 2003; Biswas & Mantovani 2010; Anthony 2010b). Sendo considerada uma alarmina de perfil Th2, IL-33 parece ser um potencial ativador de macrófagos M2 durante a resposta imune inata e adaptativa, pois amplificam fortemente a expressão de arginase I e citocinas que contribuem para os processos de fibrose (Kurowska-Stolarska *et al.* 2009). Alguns autores já relataram esta ligação de IL-33 com macrófagos e o desenvolvimento de fibrose pulmonar (Li *et al.* 2014), renal (Li *et al.* 2019) e a fibrose hepática pela infecção por *S.japonicum* (Peng *et al.* 2016). Entretanto, ainda é pouco esclarecido e necessário mais estudos quanto a ação de IL-33 na ativação e diferenciação dos macrófagos envolvidos na fibrose hepática durante a infecção por *S.mansoni*, podendo este ser o ponto chave para o entendimento do desenvolvimento deste processo.

Concluimos com nossos achados que a via IL-33/ST2 é essencial para ativação de HSCs e sua transdiferenciação em miofibroblastos, consequentemente afetando a produção de diferentes tipos de colágeno e a formação de fibras reticulares que auxiliam na organização da matriz extracelular observada nos granulomas esquistossomóticos, possibilitando assim, o

desenvolvimento adequado do granuloma hepática durante a esquistossomose e a sobrevivência do hospedeiro.

8. CAPÍTULO 3

PARTICIPAÇÃO DA VIA IL-33/ST2 NO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *SCHISTOSOMA MANSONI* EM CAMUNDONGOS BALB/c

Dados ainda não publicados

Os macrófagos constituem cerca de 30% das células que compõem os granulomas hepáticos induzidos pela deposição de ovos de *Schistosoma mansoni*. Neste ambiente, predominantemente Th2, estas células são preferencialmente diferenciadas em macrófagos alternativamente ativados ou M2, que contribui na remodelação tecidual e no confinamento dos produtos tóxicos secretados pelos ovos, bem como participam da evolução da fibrose hepática, associada a casos graves da esquistossomose. A citocina IL-33 é uma alarmina característica da resposta imune inata, considerada um potencial ativador de macrófagos alternativamente ativados (M2) durante a resposta imune inata e adaptativa, porém pouco se sabe sobre a ação desta citocina no processo de ativação e diferenciação dos macrófagos, durante a formação e modulação dos granulomas induzidos pela infecção por *S. mansoni* e, conseqüentemente, na gravidade da esquistossomose, tornando-se o objetivo deste capítulo. Para tanto, camundongos BALB/c WT e BALB/c geneticamente deficientes na produção do receptor de IL-33 (ST2^{-/-}) foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* e avaliados comparativamente quanto a ativação e diferenciação dos macrófagos isolados na medula óssea através da dosagem de óxido nítrico (nitrito) e arginase. Também foi avaliada o perfil de ativação de macrófagos presentes nos granulomas hepáticos dos animais infectados de ambas as linhagens através da expressão dos genes *NOS-2*, *Arg-1*, *IL-10*, *Relm-α*, *MgL2*, *Chi3l3*, quantificação da atividade de NAG (N-acetilglicosamidase), da produção de óxido nítrico e arginase. Nossos dados *in vitro* indicam que os monócitos recuperados da medula óssea de animais ST2^{-/-} e estimulados para diferenciação em M1 e M2 produzem menores níveis de arginase e maiores níveis de nitrito comparado às células diferenciadas a partir da medula óssea de animais selvagens. Nas infecções experimentais foi detectado aumento da atividade de NAG no tecido hepático de animais WT e ST2^{-/-}, sem diferença entre as linhagens; entretanto, camundongos ST2^{-/-} não infectados e cronicamente infectados apresentaram expressão significativamente maior de *NOS-2* no tecido hepático, marca característica de M1. Em contrapartida, ao quantificar a expressão de genes que caracterizam a ativação de macrófagos M2, verificou-se que na fase aguda os níveis de mRNA de *Arg-1* aumentam e de *MgL2* e *Chi3l3* diminuíram em ST2^{-/-}, enquanto os níveis de mRNA de *IL-10* e *Relm-α* mantiveram-se semelhantes entre as duas linhagens no decorrer da infecção. Esta variação na ativação de macrófago M2 também foi observada na atividade de arginase no homogenato hepático, onde a atividade enzimática foi significativamente maior em camundongos ST2^{-/-} após 8 semanas de infecção, mas sem diferença nos animais cronicamente infectados. Desta forma, concluímos que a via IL-33/ST2 é necessária para a diferenciação adequada dos diferentes tipos de macrófagos o que afeta diretamente na modulação do granuloma e equilíbrio da resposta imune durante a esquistossomose.

Palavras chaves: IL-33/ST2, *Schistosoma mansoni*, granuloma, modulação, macrófagos

8.1 RESULTADOS - Capítulo 3

8.1.1 Caracterização do perfil de diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea de camundongos WT e ST2^{-/-} infectados com *S.mansoni*

Com o objetivo de avaliar a participação da ativação da via IL-33/ST2 na diferenciação e ativação de macrófagos, inicialmente foi mensurado a atividade de arginase e a produção de nitrito, como medida indireta de óxido nítrico (NO), no sobrenadante de cultura de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM) de animais BALB/c WT e ST2^{-/-} infectados ou não com *S.mansoni* e cultivados sob diferentes estímulos.

Os dados mostram que macrófagos diferenciados *in vitro* a partir de células da medula óssea de camundongos não infectados ou com 8 semanas de infecção por *S. mansoni* e cultivadas na ausência de estímulos (fig. 21A) ou estimulados com citocinas do perfil Th2 (fig. 21B) ou com SEA (fig. 21C) produziram baixa concentração de óxido nítrico. Além disso, a ausência do receptor ST2 nestas células não altera significativamente a produção de NO₂⁻, não sendo observado diferença entre as linhagens avaliadas (fig. 21A-20C). Entretanto, macrófagos derivados de medula óssea de camundongos ST2^{-/-} cronicamente infectados sem estímulo (fig.21A) ou estimulados com citocinas Th1 (fig. 21D) produziram níveis estatisticamente superiores de nitrito em relação aos demais grupos experimentais e este perfil de ativação foi revertido quando as células foram diferenciadas na presença de citocinas Th2 (fig. 21B) ou SEA (fig. 21C).

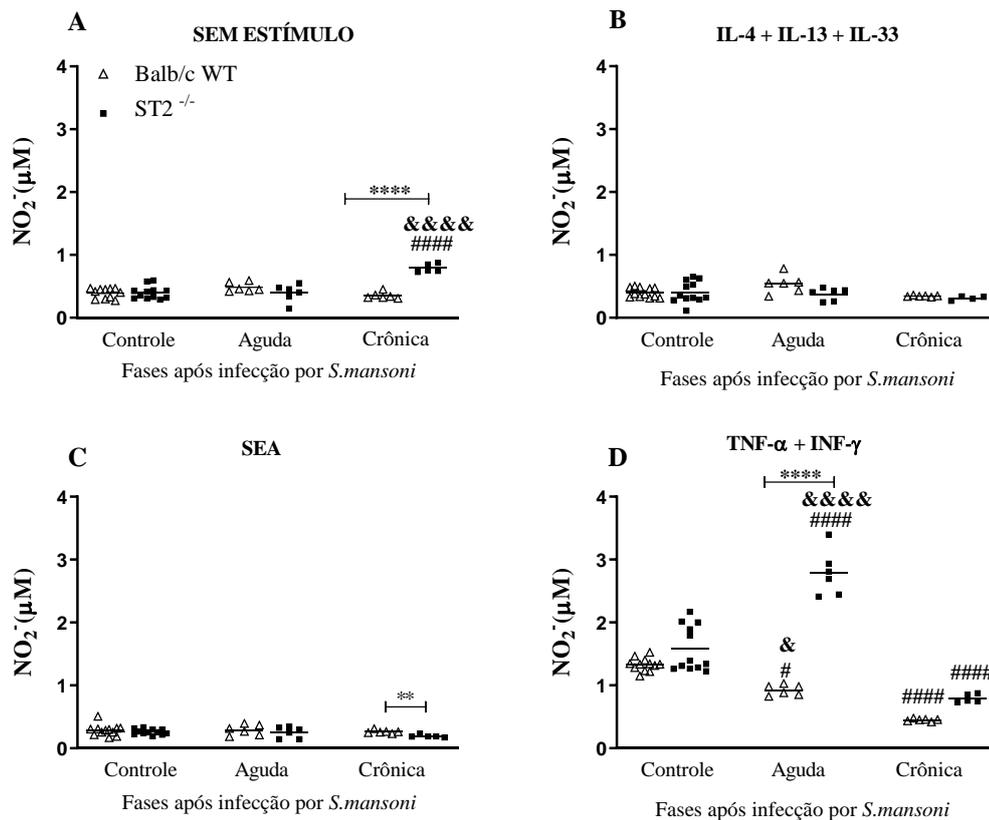


Figura 21. Quantificação da atividade de óxido nítrico em sobrenadante de BMDM de camundongos WT e $ST2^{-/-}$ infectados por *S. mansoni*. Os camundongos foram infectados por via subcutânea com 50 cercárias de *S. mansoni* e eutanasiados nas semanas 8 (fase aguda) ou 12 após a infecção (fase crônica). Após 7 dias de cultura e diferenciação dos macrófagos da medula óssea, estas células foram estimuladas durante 72h ou não com SEA (5µg/mL), ou com um mix de citocinas para diferenciação de M1 (TNF- α e INF- γ) ou M2 (IL-4, IL-13 e IL-33), todas as citocinas na concentração de 1ng/mL. Os dados são apresentados como um gráfico de pontos e média, cada ponto representando um animal. Comparações entre mesma fase utilizou-se análise Test T Student ou Mann-Whitney. Comparações entre fases diferentes (aguda e crônica) Two-Way ANOVA test Bonferroni Multiple Comparison., e o valor de p foi atribuído. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de diferentes linhagens; & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos da mesma linhagem infectados na fase aguda; # representa diferenças significativas em comparação com o grupo não infectado da mesma linhagem de camundongos (* ou # ou & $p < 0,05$; ** ou ## ou && $p < 0,01$; ### $p < 0,001$; **** ou &&&& $p < 0,0001$).

Os monócitos derivados da medula óssea de animais WT e $ST2^{-/-}$ com 8 semanas de infecção por *S. mansoni* e diferenciados em macrófagos *in vitro* mostraram um aumento significativo da produção de uréia, que é uma maneira de estimar atividade de arginase, em relação aos macrófagos obtidos de animais não infectados ou na fase crônica da esquistossomose, independente do estímulo que receberam (fig. 22A-22D). Nas culturas de macrófagos mantidas sem estímulo, ou estimuladas com as citocinas IFN- γ e TNF- α , o nível de atividade de arginase foi estatisticamente semelhante nas diferentes linhagens de camundongos, nos diferentes tempos examinados (fig. 22A e fig. 22D). Entretanto, quando as culturas celulares foram estimuladas com citocinas de perfil Th2 (IL-4, IL-13 e IL-33) foi verificado

que os níveis de arginase produzidos por macrófagos obtidos de camundongos ST2^{-/-} foram estatisticamente menores comparado aos animais BALB/c WT na fase aguda da esquistossomose (fig. 22B), enquanto que em culturas estimuladas com o antígeno de ovos de *S.mansoni* (SEA) a atividade de arginase foi significativamente maior em células de camundongos ST2^{-/-} que de WT, em ambas as fases da infecção (fig. 22C).

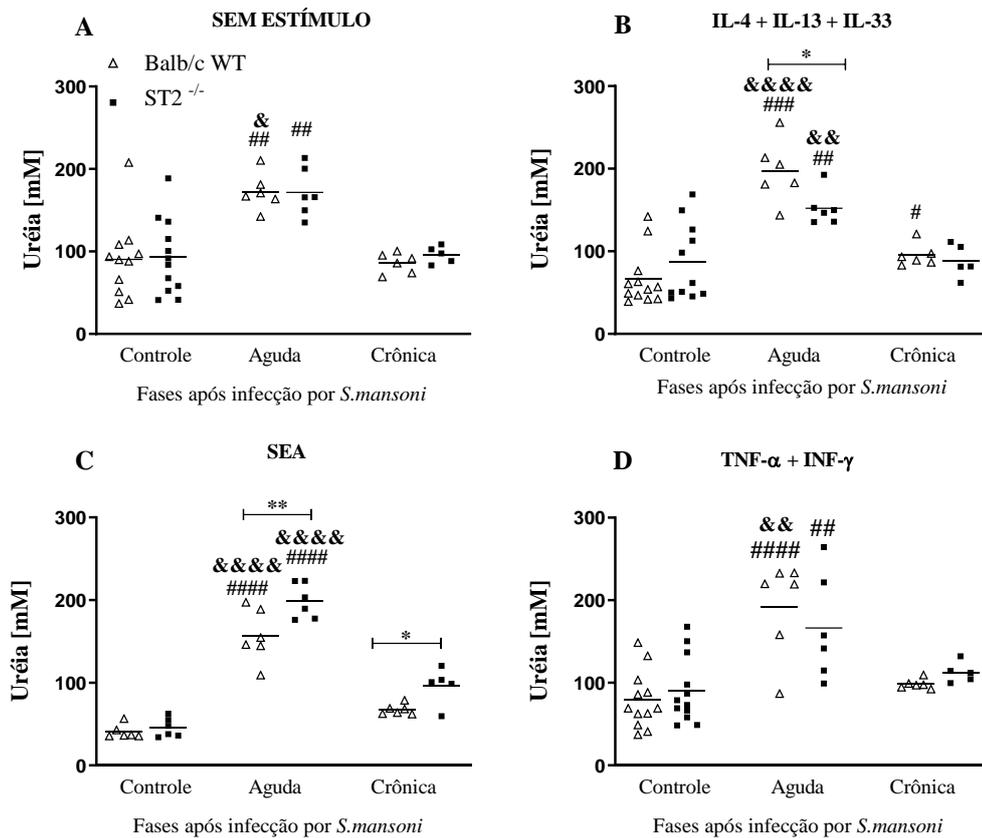


Figura 22. Quantificação da atividade de arginase em sobrenadante de BMDM de camundongos WT e ST2^{-/-} infectados por *S.mansoni*. Os camundongos não infectados ou infectados por via subcutânea com 50 cercárias de *S. mansoni* foram eutanasiados nas semanas 8 (fase aguda) ou 12 após a infecção (fase crônica) para recuperação e diferenciação de células da medula óssea. Após 7 dias de cultura e diferenciação dos macrófagos da medula óssea, estas células foram estimuladas durante 72h ou não com SEA (5µg/mL) e um mix para diferenciação de M1 (TNF-α e INF-γ), e para M2 (IL-4, IL-13 e IL-33) todas as citocinas na concentração de 1ng/mL. Os dados são apresentados como um gráfico de pontos e média, cada ponto representando um animal. Comparações entre mesma fase utilizou-se análise Test T Student ou Mann-Whitney. Comparações entre fases diferentes (aguda e crônica) Two-Way ANOVA test Bonferroni Multiple Comparison., e o valor de *p* foi atribuído. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de diferentes linhagens; & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos da mesma linhagem infectados na fase aguda; # representa diferenças significativas em comparação com o grupo não infectado da mesma linhagem de camundongos (* ou # ou & p<0,05; ** ou ## ou && p<0,01; ### p<0,001; **** ou &&&& p<0,0001).

8.1.2 Perfil de ativação de macrófagos hepáticos

Como a ausência do receptor de ST2 resultou em alteração no perfil de diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea *in vitro* e tendo conhecimento da importância dos macrófagos na formação, manutenção e modulação da reposta imune induzida pela infecção por *S.mansoni*, o efeito da ativação da via IL-33/ST2 na diferenciação e ativação de macrófagos também foi avaliado *in vivo*. Na figura 23 pode-se verificar que a atividade de N-acetilglicosamidade (NAG), atividade enzimática indiretamente associada ao recrutamento/ativação de macrófagos, aumenta significativamente no homogenato hepático de camundongos no decorrer da infecção, mas sem diferenças entre as linhagens avaliadas. Com relação aos níveis de nitrito, medida indireta da produção de NO, foi verificado aumento significativo no homogenato hepático de camundongos cronicamente infectados de ambas as linhagens em relação aos seus controles, sendo o aumento maior nos camundongos ST2^{-/-}, estes também apresentaram um aumento progressivo dos níveis de nitrito no decorrer da infecção (fig. 23B). Com relação à atividade de arginase, a infecção levou a um aumento significativo da produção de arginase no homogenato hepático dos animais ST2^{-/-} na fase aguda em relação aos seus controles e aos WT, entretanto na fase crônica este perfil foi revertido, havendo uma redução também significativa em relação aos animais BALB/c WT (fig. 23C).

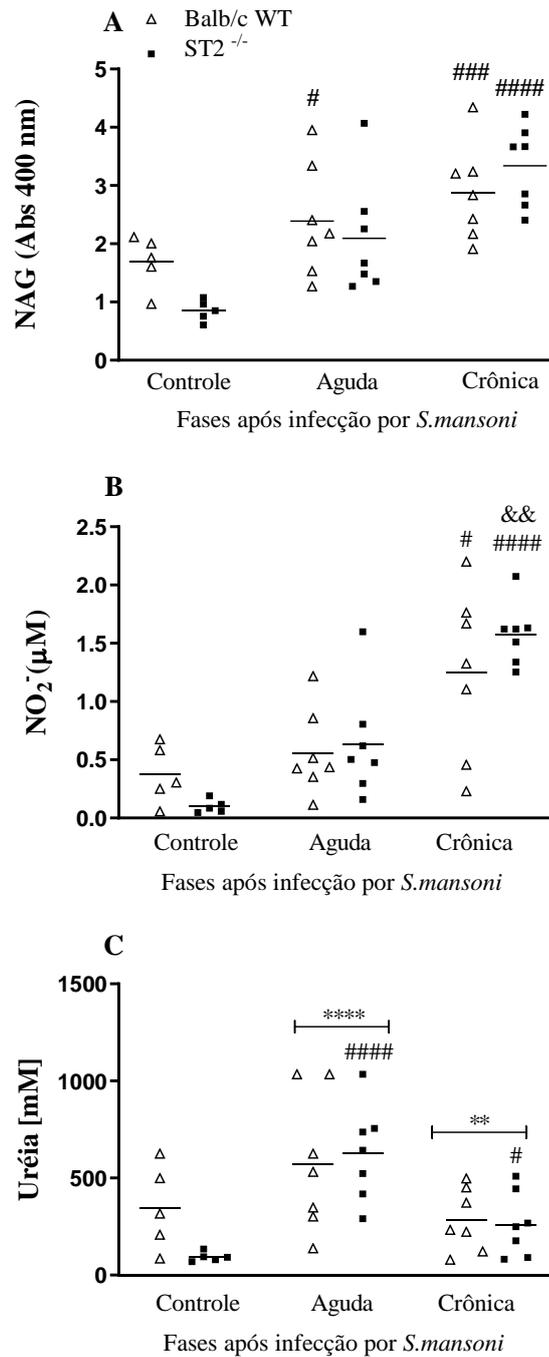


Figura 23. Quantificação da atividade de N-acetilglicosamidase (NAG), óxido nítrico e arginase no homogenato hepático de camundongos WT e ST2^{-/-} durante a infecção por *S.mansoni*. Os camundongos BALB/c WT e ST2^{-/-} foram infectados por via subcutânea com 50 cercárias de *S. mansoni* e sacrificados nas semanas 8 (fase aguda) ou 12 após a infecção (fase crônica). Os dados são apresentados como um gráfico de pontos e média, cada ponto representando um animal. As comparações entre os grupos foram realizadas por Two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e o valor de *p* foi atribuído. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de diferentes linhagens; & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos da mesma linhagem infectados na fase aguda; # representa diferenças significativas em comparação com o grupo não infectado da mesma linhagem de camundongos (# *p* < 0,05; ** ou && *p* < 0,01; ### *p* < 0,001; **** ou ##### *p* < 0,0001).

Para melhor caracterizar o perfil de ativação de macrófagos presentes no fígado no decorrer da infecção por *S. mansoni*, o nível de expressão de genes característicos da ativação M1 (*NOS-2*) e M2 (*Arg-1*, *IL-10*, *Relm- α* , *Chi3l3* e *MgL2*) foram mensurados por RT-PCR e os dados estão representados na figura 24.

Foi verificado que o nível de expressão do gene *NOS-2* no fígado de camundongos WT é baixo e não altera na fase aguda da infecção por *S. mansoni*; entretanto, na fase crônica da esquistossomose houve uma redução significativa em relação a fase aguda. Em contraste, camundongos *ST2^{-/-}* não infectados e cronicamente infectados apresentaram níveis de expressão de *NOS-2* significativamente superiores comparado aos animais BALB/c WT (fig. 24A). Este nível mais elevado de expressão de *NOS-2* não foi detectado durante a esquistossomose aguda em animais *ST2^{-/-}* (fig. 24A).

A infecção por *S. mansoni* induziu aumento da expressão de mRNA de genes associados a ativação de macrófagos M2 no fígado de camundongos de ambos os grupos experimentais, BALB/c WT e *ST2^{-/-}*; entretanto, houve diferenças no perfil de ativação dos diferentes genes. No caso de *Arg-1*, camundongos *ST2^{-/-}* com esquistossomose aguda apresentaram níveis de expressão hepática deste gene significativamente mais elevados que camundongos WT na mesma fase da infecção, mas na fase crônica o nível de expressão de *Arg-1* nos animais deficientes diminuiu significativamente em relação a fase aguda, entretanto, sem diferenças entre as linhagens (fig. 24B). A infecção por *S. mansoni* também induziu aumento significativo dos níveis de mRNA de *IL-10* (fig. 24C) e de *Relm- α* (fig. 24D) tanto na fase aguda como na fase crônica da esquistossomose, mas sem diferença significativa entre WT e *ST2^{-/-}*.

Também houve um aumento significativo da expressão de *MgL2* no fígado de camundongos WT e *ST2^{-/-}* infectados comparado aos seus controles, tanto na fase aguda como na fase crônica, sendo que, na fase aguda este aumento foi significativamente maior nos camundongos WT comparados aos animais deficientes (fig. 24E).

A última marca de M2 avaliada foi o nível de expressão de mRNA de *Chi3l3*, sendo verificado que em animais não infectados de ambas as linhagens não foi possível quantificar a expressão deste gene. Na fase aguda da infecção por *S. mansoni* foi verificado um aumento significativo de expressão *Chi3l3* nos animais WT comparado aos *ST2^{-/-}*, enquanto que na fase crônica da esquistossomose a expressão deste gene diminuiu consideravelmente nos animais WT comparado com a fase aguda, e foi semelhante entre ambas as linhagens (fig. 24F). Estes dados indicam que a infecção por *S. mansoni* em animais deficientes é capaz de ativar os M2, entretanto, não todos os subtipos.

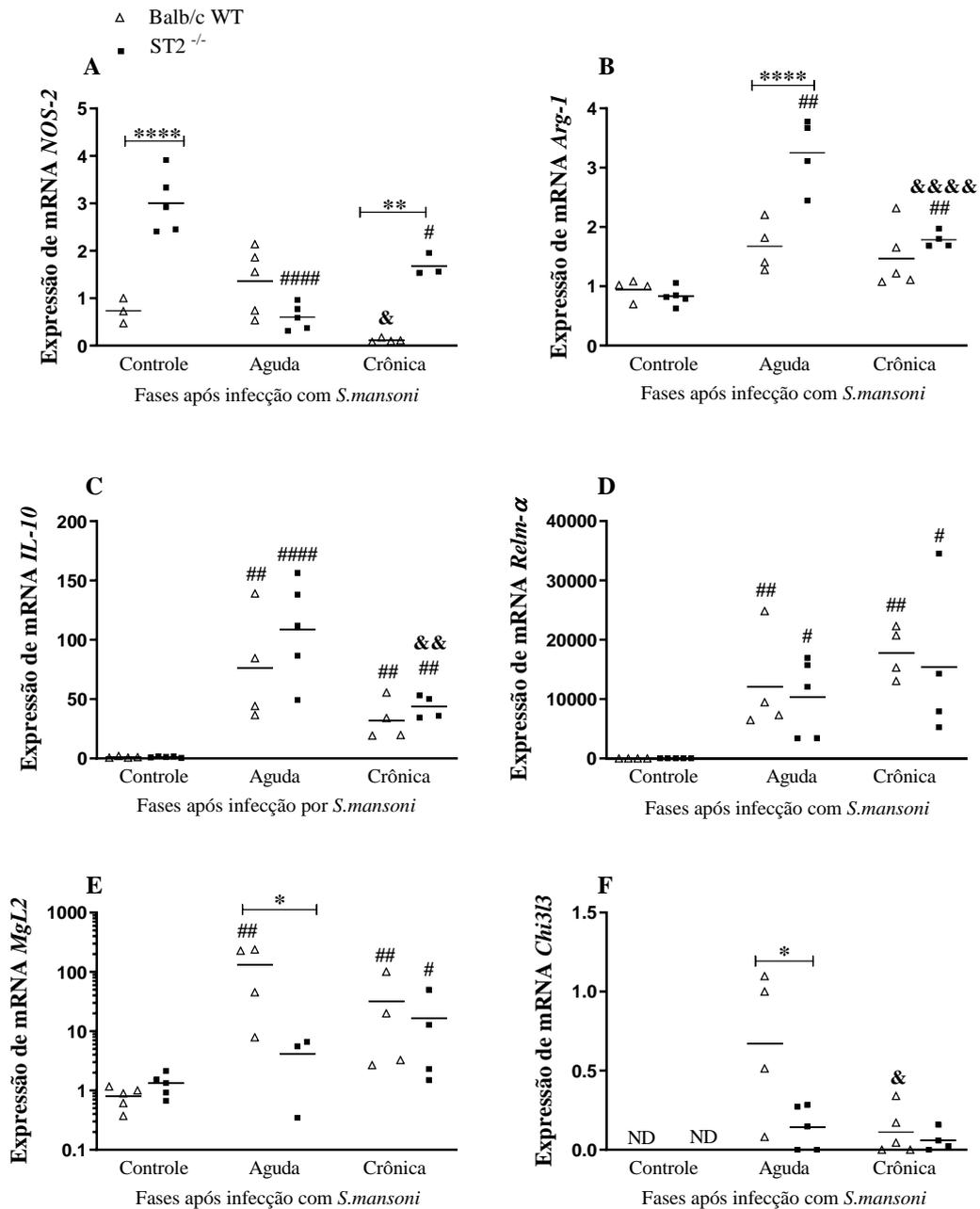


Figura 24. Caracterização do perfil de macrófagos ativado no fígado durante a infecção por *S.mansoni*. Quantificação relativa de mRNA de *NOS-2*(A), *Arg-1*(B), *IL-10* (C), *Relm-α* (D), *MgL2* (E) e *Chi3l3*(F) no homogenato de fígado em animais BALB/c WT e ST2^{-/-} durante a infecção por *S.mansoni* pela técnica de RT-qPCR. Os camundongos foram infectados por via subcutânea com 50 cercárias de *S. mansoni* e sacrificados nas semanas 8 (fase aguda) ou 12 após a infecção (fase crônica). Os dados são apresentados como um gráfico de pontos e média, cada ponto representando um animal. As comparações entre os grupos foram realizadas por Two-way ANOVA seguida pelo pós-teste de Bonferroni, e o valor de *p* foi atribuído. * representa diferenças significativas entre camundongos infectados de diferentes linhagens; & representa diferenças significativas entre camundongos infectados cronicamente em comparação com camundongos da mesma linhagem infectados na fase aguda; # representa diferenças significativas em comparação com o grupo não infectado da mesma linhagem de camundongos (* ou # ou & p<0,05; ** ou ## ou && p<0,01; ### p<0,001; **** ou &&&& p<0,0001).

8.2 DISCUSSÃO - Capítulo 3

A formação do granuloma hepático em resposta aos antígenos secretados pelo ovos de *S.mansoni* depositados no tecido, depende do recrutamento e ativação de uma variedade de tipos celulares, incluindo as células hepáticas estreladas, células dendríticas, células linfóides do tipo II, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e principalmente macrófagos (Chang *et al.* 2006; Swartz *et al.* 2006; Mchedlidze *et al.* 2013; Hams *et al.* 2013; Lopes *et al.* 2019). Neste capítulo, enfatizamos a importância da ativação da via IL-33/ST2 no recrutamento e ativação de diferentes subpopulações de macrófagos durante a infecção por *S. mansoni*. Os dados preliminares obtidos neste estudo indicam que a ausência da ativação da via IL-33/ST2 afeta a diferenciação *in vitro* de macrófagos derivados de medula óssea, favorecendo a diferenciação de macrófagos M1 em culturas estimuladas com citocinas Th1 e em culturas recolhidas de camundongos cronicamente infectados pelo parasito e cultivados sem restimulação. O tecido hepático de camundongos ST2^{-/-} infectados com *S. mansoni* também apresentou alteração na ativação de subpopulações de macrófagos, com expressão aumentada de *NOS-2* e *ARG-1* e redução na expressão de *MgI2* e *Chi3I3*, enquanto os níveis de mRNA *IL-10* e *Relm-α* mantiveram-se semelhantes.

Os macrófagos são células de grande plasticidade e que se diferenciam e adaptam ao perfil de resposta imune do ambiente em que se encontram (Mantovani *et al.* 2004). Um ambiente de perfil Th1, polariza a diferenciação de monócitos em macrófagos classicamente ativados, enquanto em uma resposta predominantemente Th2 os monócitos podem se diferenciar em macrófagos alternativamente ativados (Barron & Wynn 2011b; Duque & Descoteaux 2014; Martinez & Gordon 2014; Moghaddam *et al.* 2018). Esta alteração do perfil e função dos macrófagos é criticamente determinante para o hospedeiro, principalmente frente a infecções crônicas por helmintos, como a esquistossomose (Allen & Wynn 2011; Barron & Wynn 2011b).

Nossos dados mostraram que a atividade de NAG no homogenato hepático dos animais infectados, medida indireta da presença de macrófagos no tecido, foi semelhante em ambas as linhagens de camundongos avaliadas, indicando que o recrutamento de macrófagos para fígado nos animais infectados por *S.mansoni* não depende da ativação do receptor ST2. Entretanto, a ausência da sinalização da via IL-33/ST2 resultou em aumento significativo da expressão de *NOS-2* e da produção de óxido nítrico, especialmente na esquistossomose crônica, sugerindo que a ausência do receptor ST2 pode facilitar a diferenciação de macrófagos M1. A presença de IFN- γ , LPS ou TNF- α são cruciais para a ativação dos macrófagos M1, uma vez ativados,

estes expressam IL-12 e iNOS (NOS-2) (Martinez & Gordon 2014). Entretanto, os dados apresentados nas figuras 12E e 13A desta tese, não indicam aumento da resposta Th1 nos camundongos ST2^{-/-} infectados, sugerindo que a estimulação de M1 aumentada na ausência deste receptor não possa ser explicada pela produção de IFN- γ . Em macrófagos humanos o receptor CCR7 (ligantes as quimiocinas CCL19 e CCL21), assim como a quimiocina CCL3 são importantes para regulação e ativação de M1, tendo sido relato o aumento destas moléculas quando estas células foram estimuladas com IL-33 recombinante (Martinez *et al.* 2006; Joshi *et al.* 2010), entretanto, seria necessário mais estudos para entender o papel destas quimiocinas no processo de regulação da diferenciação de M1 via ativação de IL-33/ST2 no contexto da esquistossomose. Outra hipótese seria que os níveis de LPS poderiam estar aumentados nestes animais deficientes infectados com *S.mansoni*, desta forma, favorecendo a maior ativação de M1. No modelo murino de infecção por *S.mansoni*, Pereira e colaboradores (2017), observaram que o LPS prejudicou o microambiente pulmonar ao interromper agudamente os mecanismos homeostáticos inflamatórios, através do aumento de citocinas inflamatórias e óxido nítrico intensificando desta forma a esquistossomose pulmonar, processo que pode estar relacionado com a atividade dos macrófagos classicamente ativadas.

A atividade de M1 nos granulomas esquistossomóticos são determinantes na evolução da esquistossomose. Hesse *et al.* (2001) mostraram que camundongos geneticamente deficientes no gene *NOS-2*, quando infectados por *S.mansoni*, desenvolvem granulomas oito vezes maiores que os não deficientes, com aumento da deposição da colágeno e formação de um padrão denso de fibrose ao redor dos ovos do parasito retidos no fígado. Por outro lado, o excesso de ativação de M1 também pode acarretar maiores danos teciduais ao redor dos ovo de *S.mansoni*, aumentando a área de inflamação. Esta resposta exacerbada de M1 pode ser menos efetiva em auxiliar o trânsito de ovos através da parede do intestino, mas também danificar a integridade do epitélio intestinal devido ao aumento da inflamação local, que favorece a penetração de bactérias do lúmen, podendo levar a septicemia do hospedeiro (Barron & Wynn 2011b). Herbert e colaboradores (2004), demonstraram que a morte de camundongos que apresentavam deficiência na expressão do receptor IL-4R α somente em neutrófilos e macrófagos (LysM^{cre}IL-4R α ^{/flow}) submetidos a infecção experimental por *S.mansoni* estava associada, dentre outros fatores, ao aumento da resposta Th1 e da atividade de NOS-2, que levou a dificuldade da expulsão dos ovos e sepsi do hospedeiro. Portanto, nossos dados de aumento da atividade dos M1 visto nos camundongos ST2^{-/-} pode ser o motivo do desenvolvimento de granulomas mais inflamatórios e conseqüentemente da maior mortalidade observada nestes animais.

Antígenos excreto/secretado pelos ovos de *S.mansoni* retidos nos tecidos do hospedeiro são os principais indutores da resposta Th2 detectada em camundongos a partir da quarta à sexta semana pós infecção (Barron & Wynn 2011b). Estudos *in vitro* mostraram que presença de citocinas de perfil Th2, como IL-4 e IL-13, leva ao aumento da síntese de arginase-1, enzima do ciclo da uréia que converte L-arginina em L-ornitina, fornecendo prolina para síntese de colágenos. Com esta via ativada, há uma diminuição da síntese de iNOS, pois eles competem por um substrato da via em comum, dependente de STAT6, desta forma, quando há aumento de arginase leva a polarização e ativação de M2 e diminuição dos M1, pela redução de iNOS (Rutschaman *et al.* 2001; Munder 2009; Martinez & Gordon 2014). Portanto, o balanço entre NOS-2 e arginase correlaciona-se com o balanço entre as respostas Th1 e Th2, assim também ocorre durante a infecção por *S.mansoni*, o que garante a sobrevivência do hospedeiro (Munder *et al.* 1998; Munder *et al.* 1999; Barron & Wynn 2011b).

Hesse e colaboradores (2000) explicaram melhor este conceito frente a esquistossomose, concluindo que a resposta anti-inflamatória e anti-fibrótica são dependentes de NOS-2. Estes autores mostraram que camundongos deficientes em IFN- γ falharam em produzir uma resposta inflamatória exagerada que estava associada a deficiência na produção de óxido nítrico. Ao avaliarem a infecção por *S.mansoni* em camundongos que tiveram a ornitina-aminodecarboxilase bloqueada (enzima que usa o produto do metabolismo da arginina, L-ornitina, para gerar poliaminas), estes desenvolveram maiores granulomas esquistossomóticos e aumentada fibrose hepática, mostrando que a regulação ARG-1/NOS-2 é de fundamental importância para a patogênese da formação do granuloma (Hesse *et al.* 2001). A produção de IL-4 e IL-13, bem como a ativação de M2 e a expressão de arginase-1 estão relacionados com o processo de fibrose em decorrência da formação dos granulomas, estes macrófagos alternativamente ativados podem atuar direta ou indiretamente nos fibroblastos contribuindo com a remodelação tecidual, desta forma reduzindo a morbidade e mortalidade durante a esquistossomose (Pearce & MacDonald 2002; Wynn *et al.* 2004; Pesce *et al.* 2009; Barron & Wynn 2011b).

A ativação dos subtipos de M2 estão relacionados com alguns outros fatores da resposta imune, como presença de mediadores anti-inflamatórios (IL-10 e glucocorticóides), produção de fatores de crescimento celular (GM-CSF) e liberação de alarminas após o dano celular, como IL-33, IL-25 e adenosinas (Mosser & Edwards 2008; Kurowska-Stolarska *et al.* 2009; Biswas & Mantovani 2010).

A função de potente ativador de M2 da citocina IL-33, foi descrita em alguns trabalhos por estimular a produção de IL-13, dependente dos receptores IL-13/IL-4R α , e induzirem a

produção de TGF- β e das ILC2 que produzem ainda mais IL-13 fazendo um ciclo contínuo de ativação deste tipo de macrófagos (Li *et al.* 2014). Além disso, é visto que IL-33 contribui para o aumento da produção de CCL24 e CCL17 levando ao predomínio de uma resposta Th2 no ambiente contribuindo para a polarização dos macrófagos alternativamente ativados e amplificação da expressão de *ARG-1* e *Chi3l3* (*YMI*) (Kurowska-Stolarska *et al.* 2009; Li *et al.* 2014). A relação de IL-33 com a ativação dos M2 já foi demonstrada em alguns modelos, como de infecção por *S.japonicum* (Peng *et al.* 2016), de inflamação pulmonar como asma (Kurowska-Stolarska *et al.* 2009), inflamação pulmonar ocasionada pela infecção experimental do fungo *Alternaria alternata* (Jackson-Jones *et al.* 2016), e também em modelos de fibrose pulmonar induzida por bleomicina (Li *et al.* 2014), fibrose renal pela obstrução uretreal unilateral (Li *et al.* 2019), e no modelo de encefalomielite autoimune experimental (Jiang *et al.* 2012).

Em nosso modelo, a infecção por *S.mansoni* desencadeou a expressão dos marcadores referentes a ativação de M2, tanto na fase aguda como na fase crônica, em animais BALB/c WT e ST2^{-/-}. Surpreendentemente, contradizendo os dados encontrados na literatura, nossos resultados indicam que a ausência da sinalização da via IL-33/ST2 durante a infecção por *S.mansoni* levou a intensificada ativação da expressão de *ARG-1* e aumento da atividade de arginase durante a fase aguda da infecção. Os níveis de expressão de *Relm- α* (*FIZZ1*) no fígado de camundongos ST2^{-/-} aumentou com a infecção de forma semelhante ao detectado nos camundongos WT, isto sugere que a falta de sinalização de IL-33 não impossibilitou dos macrófagos de subtipo M2a fossem ativados, já que estas são duas marcas predominantes neste subtipo de célula (Cortes-Selva & Fairfax 2021). Segundo Barron & Wynn (2011b), a expressão de *Relm- α* não é limitada apenas aos macrófagos, mas pode ser derivada de células epiteliais e também dos eosinófilos, portanto, a alta e contínua expressão deste gene nos animais deficientes condiz com os altos níveis de EPO (fig.15B) encontrados nestes animais quando infectados.

Assim como para *Relm- α* os níveis de expressão de *IL-10* mantiveram-se semelhantes mesmo com ausência da via IL-33/ST2, o que condiz com a produção de IL-10 (fig. 12H) encontrada no fígado dos animais ST2^{-/-}. Por outro lado, a expressão dos genes *Chi3l3* (*YMI*) e *MgL2* reduziram consideravelmente durante a fase aguda da esquistossomose em camundongos deficientes para o receptor ST2.

Apesar da atividade dos M2a estar mais ligada a um perfil inflamatório, a expressão de *ARG-1* também é característica do subtipo M2c, assim como, a expressão *IL-10* e estas células apresentam um perfil mais protetivo ao hospedeiro, pois direciona a reparação tecidual (Mooser 2003; Mantovani *et al.* 2004; Biswas & Mantovani 2010; Lu *et al.* 2013; Duque &

Descoteaux 2014). Além disso, os M2b quando ativados secretam a citocina IL-10 e são células relacionadas também com a reparação tecidual via remodelação da matrix extracelular e já foram relatadas como importantes para a regulação da formação do granuloma durante a infecção por *S.mansoni* (Fairfax *et al.* 2012; Cortes-Selva & Fairfax 2021). Portanto, camundongos não deficientes podem também estimular a diferenciação de macrófagos dos subtipos M2b e M2c e orquestrar uma resposta com perfil modulatório frente a esquistossomose, enquanto que a redução de algumas marcas de ativação de macrófagos observada nos animais ST2^{-/-} sugere ativação preferencial de macrófagos M2a, resultando em resposta altamente inflamatória. Isto sugere que, possivelmente há outras células com perfil reparador e regulatório como por exemplo as Treg, envolvidas no processo de fibrose hepática, que possam estar desreguladas favorecendo este perfil mais inflamatório nestes animais infectados por *S.mansoni*. Entretanto, ainda é necessário maior estudo e investigação para o entendimento da relação da via IL-33/ST2 com os subtipos de macrófagos e outros tipos celulares que estão envolvidos na resposta imune protetora contra *S.mansoni*.

Nossos dados demonstraram que a ausência da ativação da via IL-33/ST2 proporcionou a intensa diferenciação de macrófagos M2a durante a fase aguda e de macrófagos M1 durante a fase crônica, fazendo com que os animais ST2^{-/-} infectados mantivesse constantemente um perfil mais inflamatório durante o decorrer da infecção por *S.mansoni*, o que acarretou na maior patologia observada nestes animais.

9. CONCLUSÃO GERAL

Concluimos que a ausência da sinalização da via IL-33/ST2 na esquistossomose experimental tem fundamental importância no desenvolvimento da doença (fig. 25). Neste modelo experimental, nossos dados mostram que a ativação da via IL-33/ST2:

- Não altera a indução da resposta Th2, mas afeta o equilíbrio entre as respostas Th1/Th2, e intensifica a resposta Th17 alterando significativamente a formação do granuloma;
- Participa da ativação de HSC e sua diferenciação em miofibroblastos, conseqüentemente afetando a produção de diferentes tipos de colágeno que contribuem para formação de granulomas organizados, e evolução mais modulada da fibrose hepática;
- Interfere na ativação de macrófagos, resultando em diferente perfil de expressão de genes associados a diferenciação de macrófagos M2, como aumento de *ARG-1* e redução de *Chi3l3 (YMI)* e *MgL2*, na fase aguda da infecção por *S. mansoni*, seguido por aumento na expressão do gene *NOS-2*. Esta alteração no perfil da ativação dos macrófagos pode contribuir para maior celularidade dos granulomas hepáticos e para ineficiência na contenção dos antígenos de *S. mansoni*, que pode ter favorecido a maior mortalidade da esquistossomose nos animais ST2^{-/-};

Nossos dados também sugerem que a ausência de ativação da via IL-33/ST2 pode afetar a indução de mecanismos imunoregulatórios responsáveis pela modulação do granuloma, um dos principais elementos relacionados a gravidade da esquistossomose crônica. Neste sentido, estudos complementares relacionados ao papel de IL-33 na ativação e polarização dos diferentes subtipos de M2 e de linfócitos T com papel modulador, como células Treg, ainda se fazem necessários para que possamos ter um melhor entendimento deste processo.

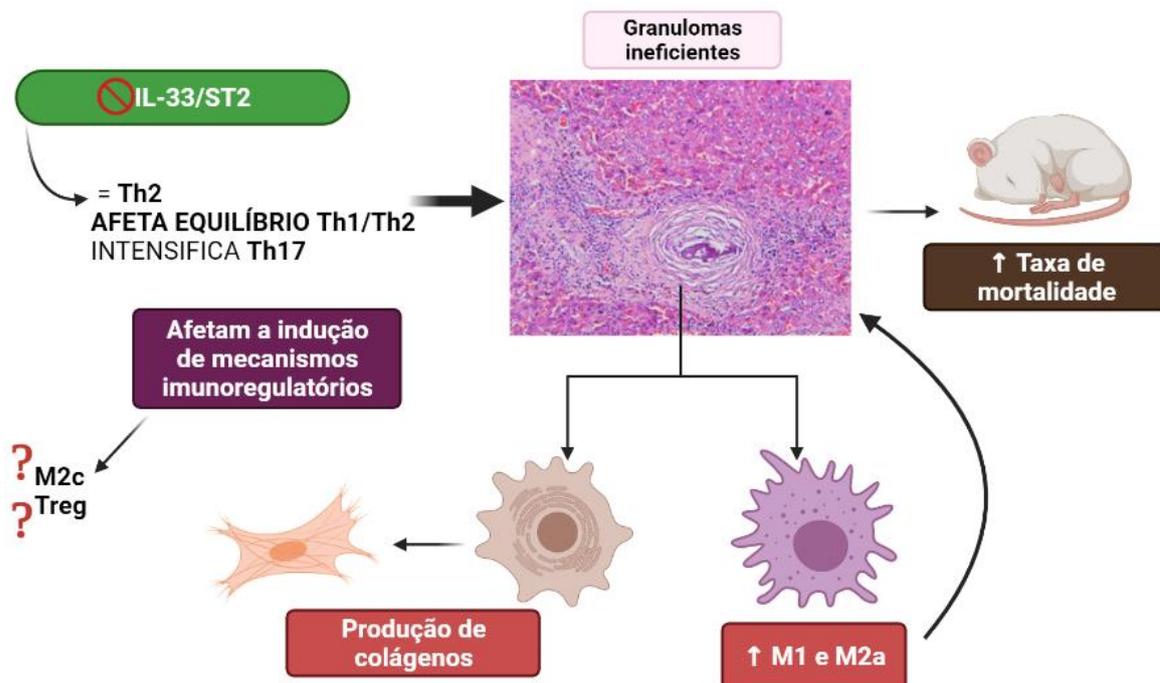


Figura 25. Esquema dos efeitos da ausência da sinalização da via IL-33/ST2 na esquistossomose experimental. A ausência da sinalização de IL-33 acarreta uma série de consequências no desenvolvimento da resposta imune durante a esquistossomose experimental, trazendo o desequilíbrio entre as respostas Th1/Th2 e intensificando a resposta Th17, além de afetar a ativação de miofibroblastos contribuindo para má produção dos diferentes tipos de colágeno contribuindo para formação de granulomas hepáticos ineficientes. Esta citocina também mostrou ser fundamental para ativação de macrófagos com perfil regulatório mantendo constantemente um perfil inflamatório durante todo decorrer da infecção por *S.mansoni*.

10. 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 (2) 85-91.
- Abdulla MH, Lim KC, McKerrow JH, Caffrey CR 2011. Proteomic identification of IPSE/alpha-1 as a major Hepatotoxin secreted by *Schistosoma mansoni* eggs. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 1–10.
- Adnani MSAL 1985. Concomitant immunohistochemical localization of fibronectin and collagen in schistosome granulomata. *Journal of pathology* 147:77-85.
- Akiho H, Blennerhassett P, Deng Y, Collins SM 2002. Role of il-4, il-13, and stat6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. *Journal of physiology – gastrointestinal and liver physiology*: 282 226–232.
- Allen JE & Wynn TA 2011. Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens. *PLoS Pathog.* 7(5):e1002003.
- Alves AF, Pereira RA, Andrade HM, Mosser DM, Tafuri WL 2019. Immunohistochemical study of renal fibropoiesis associated with dogs naturally and experimentally infected with two diferente strains of *Leishmania (L.) infantum*. *Int J Exp Path.* 100:222–233.
- Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA Jr, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, McKenzie AN, Xu D, Cunha FQ, Liew FY 2010. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat. Med.* (16), 708–712.
- Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. 2006. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro: 101(Suppl. I) 79-85.
- Amaral KB, Silva TP, Dias FF, Malta KK, Rosa FM, Costa-Neto SF, et al 2017. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *PLoS ONE.* 13;12(9):e0184696.
- Andrade ZA & Prata A 1963. Asymptomatic schistosomiasis studied be needle biopsy of the liver. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*: 12 (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 2008. Patologia da Esquistossomose Humana. In Carvalho, O.S.(Org); Coelho PMZ (Org); Lenzi HL (Org). *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar*: 547-568. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz.
- Andrade ZA 2009. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunology*: 31, 656-663.

Anthony RM, Urban JF Jr, Alem F, Hamed HA, Rozo CT, Boucher JL, Van Rooijen N, Gause WC 2006. Memory T(H)2 cells induce alternatively activated macrophages to mediate protection against nematode parasites. *Nat Med* 12:955–960.

Anthony B, Allen JT, Li YS, McManus DP 2010. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. *Parasit Vectors*. 21;3(1):60.

Aoki R, Kawamura T, Goshima F, Ogawa Y, Nakae S, Nakao A, Moriishi K, Nishiyama Y, Shimada S 2013. Mast cells play a key role in host defense against herpes simplex virus infection through TNF-alpha and IL-6 production. *J. Invest. Dermatol.* (133), 2170–2179.

Ariyaratne A, Finney CAM 2019. Eosinophils and macrophages within the Th2- induced granuloma: balancing killing and healing in a tight space. *Infect. Immun.* 87: e00127–e219.

Ashton PD, Harrop R, Shah B, Wilson RA 2001. The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology* (122):329–38.

Assunção LS, Magalhães KG, Carneiro AB, Molinaro R, Almeida PE, Atella GC, et al 2017. Schistosomal-derive lysophosphatidylcholine triggers M2 polarization of macrophages through PPARg dependent mechanisms. *Biochim Biophys ca Acta*. 1862:246–54.

Ayimba E, Hegewald J, Ségbéna AY, Gantin RG, Lechner CJ, Agossou A, Banla M, Soboslay PT 2011. Proinflammatory and regulatory cytokines and chemokines in infants with uncomplicated and severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Exp. Immunol.* (166) 218–226.

Aydın MM, Akçalı KC 2018. Liver fibrosis. *Turk J Gastroenterol*. 29(1):14-21.

Bachem MG, Meyer D, Melchior R, Sell KM, Gressner AM 1992. Activation of rat liver perisinusoidal lipocytes by transforming growth factors derived from myofibroblastlike cells. A potential mechanism of self perpetuation in liver fibrogenesis. *J. Clin. Invest.* 89, 19–27.

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.

Barlow JL, Bellosi AB, Hardman CS, Drynan LF, Wong SH, Cruickhank JP, McKenzie ANJ 2012. Innate IL-13-producing nuocytes arise during allergic lung inflammation and contribute to airways hyperreactivity. *J Allergy Clin Immunol* 129(1):191-8.e1-4.

Barron L, Wynn TA 2011. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 300(5):G723-8.

Barron L, Wynn TA 2011b. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. *Eur J Immunol* 41 (9): 2509-14.

Bartley PB, Ramm GA, Jones MK, Ruddell RG, Li YS & McManus DP 2006. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. *International Journal of Parasitology*: (36) 993-1001.

Benoit M, Benoît Desnues B, Mege JL 2008. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology* 3733-3739.

Benyon RC, Arthur MJ 2001. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis*, 21(3):373-84.

Besnard AG, Guabiraba R, Niedbala W, Palomo J, Reverchon F, Shaw TN, Couper KN, Ryffel B, Liew FY 2015. IL-33-Mediated Protection against Experimental Cerebral Malaria Is Linked to Induction of Type 2 Innate Lymphoid Cells, M2 Macrophages and Regulatory T Cells, *PLoS Pathog*. 11 1–21.

Bina JC & Prata A 2003. Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*.(36), 2, 211-216.

Biswas SK & Mantovani A 2010. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* 11(10):889–96.

Bonnardel J & Williams M 2018. Developmental control of macrophage function *Current Opinion in Immunology* 50:64–74.

Booth M, Mwatha JK, Joseph S, Jones FM, Kadzo H, Ireri 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 IFN-gamma, high TNF-alpha, or low RANTES, depending on age and gender. *J Immunol* 172:1295-1303.

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. *The Journal of Experimental Medicine*: 488-507.

Boros DL, Pelley RP; Warren KS 1975. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in Schistosomiasis mansoni. *J. Immunol*. 114, 1437–1441.

Borthwick LA, Barron L, Hart KM, Vannella KM, Thompson RW, Oland S, Cheever A, Scieurba J, Ramalingam TR, Fisher AJ, Wynn TA 2016. Macrophages are critical to the maintenance of IL-13-dependent lung inflammation and fibrosis. *Mucosal Immunol*. 9(1):38-55.

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:e598.

Butterworth AE, Capron M, Cordingley JS, Dalton PR, Dunne DW, Kariuki HC, Kimani G, Koech D, Mugambi M, Ouma JH, Prentice MA, Richardson BA, ARAP-Siongok TK, Taylor DW 1985. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune response. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg* (79) 393-408.

Cadman ET & Lawrence RA 2010. Granulocytes: effector cells or immunomodulators in the immune response to helminth infection? *Parasite Immunol.* 32(1):1-19.

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 Tropica*:108(2-3) 109-117.

Carriere V, Roussel L, Ortega N, et al 2007. IL-33, the IL-1- like cytokine ligand for ST2 receptor, is a chromatin-associated nuclear factor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*;104:282-287.

Carson JP, Ramm GA, Robinson MW, McManus DP, Gobert GN 2018. Schistosome Induced Fibrotic Disease: The Role of Hepatic Stellate Cells. *Trends Parasitol.* 34(6):524-540.

Cao S, Zhu L, Zhu C, Feng J, Yin J, Lu J, Xu Y, Yang H, Huang Y, Zhang Q 2020. *Helicobacter hepaticus* infection-induced IL-33 promotes hepatic inflammation and fibrosis through ST2 signaling pathways in BALB/c mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 525 654–661.

Carvalho E.M & Andrade Z.A 2005. Imunopatologia da Esquistossomose. In: Coura J.R. (Ed.) *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.I.

Cayrol C & Girard JP 2009. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U SA*: 106 9021-9026.

Cayrol C & Girard JP 2018. Interleukin-33 (IL-33): A nuclear cytokine from the IL-1 family. *Immunol Rev.* 281(1):154-168.

Chang D, Ramalho LN, Ramalho FS, Martinelli AL, Zucoloto S 2006. Hepatic stellate cells in human schistosomiasis mansoni: a comparative immune histochemical study with liver cirrhosis. *Acta Trop.* 97, 318–323.

Chang YJ, Kim HY, Albacker LA, Baumgarth N, McKenzie AN, Smith DE, Dekruyff RH, Umetsu DT 2011. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* (12), 631–638.

Cheever AW 1968. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide Digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull World Health Organ* 39(2): 328-31.

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, Macedonia JG, Mosimann JE, Cheever EA 1994. Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice infected with a single pair of worms. *Am J Trop Med Hyg* 50:281–95.

Cheever AW, Jankovic D, Yap GS, Kullberg MC, Sher A, Wynn TA 1998. Role of cytokines in the formation and downregulation of hepatic circumoval granulomas and hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni*-infected mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 93, Suppl. I: 25-32.

Cheever AW, Hoffmann KF & Wynn T 2000. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunology Today*: 21 465–466.

Chen, MG 1993. *Schistosoma japonicum* and *S. japonicum*-like infections: epidemiology, clinical and pathological aspects. In Human Schistosomiasis (Jordan, P. et al., eds) 237–270, CAB International.

Chen D, Luo X, Xie H, Gao Z, Fang H, Huang J 2013. Characteristics of IL-17 induction by *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mouse liver. *Immunology* 139 523–532.

Chuah C, Jones MK, Burke ML, McManus DP & Gobert GN 2014. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in Parasitology*: 30 141-150.

Coelho PMZ 1995. Resistência e susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In Barbosa, FS. Tópicos em Malacologia Médica, Ed. Fiocruz: 208-217.

Coelho, PMZ, Jurberg, AD, Oliveira, Á A, & Katz, N. 2009. Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(5), 720-723.

Colley DG 1975. Immune responses to a soluble egg antigen preparation during chronic primary infection with *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, 115, 150.

Colley DG, Bustinduy AL, Secor EW, King CH 2014. Human schistosomiasis. *The Lancet*: 28 (383) 2253-2264.

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 immuneresponse of patients from endemic areas. *Acta Trop*. 23;77(1):141-6.

Cortes-Selva D, Fairfax K 2021. Schistosome and intestinal helminth modulation of macrophage immunometabolism. *Immunology*. 162(2):123-134.

Costain AH, MacDonald AS, Smits HH 2018. Schistosome Egg Migration: Mechanisms, Pathogenesis and Host Immune Responses. *Front Immunol* 20;9:3042.

Coura JR, Coura LC, Kalache A 1970. Esquistossomose aguda autóctone de foco na cidade do Rio de Janeiro. Estudo de 22 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*: 6 387-96.

Coura JR & Amaral RS 2004. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro: 99(Suppl. I): 13-19.

De Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhães A, De Jesus AA, Almeida RP, Rêgo MAV, Burattini MN, Pearce EJ, Carvalho EM 2002. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of Infectious Disease*: 185 98–105.

De Jesus AR, Magalhães A., Miranda DG, Araujo MI, De Jesus A.A., 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.*, v. 72, p. 3391-3397.

de Jong, E.C., P.L. Vieira, P. Kalinski, J.H. Schuitemaker, Y. Tanaka, E.A. Wierenga, M. Yazdanbakhsh, and M.L. Kapsenberg 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J. Immunol.* 168:1704–1709.

Del Pozo V, De Andres B, Martin E, Cardaba B, Fernandez JC, Gallardo S, Tramon P, Leyva-Cobian F, Palomino P, Lahoz C 1992. Eosinophil as antigen-presenting cell: Activation of T cell clones and T cell hybridoma by eosinophils after antigen processing. *Eur J Immunol* 22:1919–1925.

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 fibrosis in *S. mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interfero- γ receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.*, (65) 709-721.

Donnelly S, O'Neill SM, Sekiya M, Mulcahy G, Dalton JP 2005. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect Immun* 73:166–173.

Donnelly S, Stack CM, O'Neill SM, Sayed AA, Williams DL, Dalton JP 2008. Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *FASEB J* (22):4022–32.

Dunn MA, Rojkind M, Warren KS, Hait PK, Rifas L, Seifter S 1977. Liver Collagen Synthesis in Murine Schistosomiasis. *The Journal of Clinical Investigation* (59) 666-674.

Dunne DW, Lucas S, Bickle Q, Pearson S, Madgwick L, Bain J, Doenhoff M. 1981. Identification and partial purification of an antigen (q) from *Schistosoma mansoni* eggs which is putatively hepatotoxic in T-cell deprived mice. *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine and Hygiene* 55, 54-1 1.

Dunne DW, Jones FM, Doenhoff MJ 1991. The purification, characterization, serological activity and hepatotoxic properties of two cationic glycoproteins (alpha 1 and omega 1) from *Schistosoma mansoni* eggs. *Parasitology*. 103(Pt 2), 225–236.

Dunne DW & Pearce EJ 1999. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes Infect* (1) 533-560.

Duque GA & Descoteaux A 2014. Macrophage cytokines: involvement in immunity and infectious diseases. *Frontiers in Immunology*: 5 (491) 1-12.

Dzik JM, Golos B, Jagielska E, Zielinski Z, Walajtyś-Rode E 2004. A non-classical type of alveolar macrophage response to *Trichinella spiralis* infection. *Parasite Immunol*;26:197–205.

Ebbo M, Crinier A, Vely F, Vivier E 2017. Innate lymphoid cells: major players in inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*. 17:665–78.

Egesa M, Lubyayi L, Tukahebwa EM, Bagaaya BS, Chalmers IW, Wilson S, Hokke CH, Hoffman KF, Dunne DW, Yazdanbakhsh M, Labuda LA, Cose S 2018. *Schistosoma mansoni* schistosomula antigens induce Th1/ Pro-inflammatory cytokine responses. *Parasite Immunology*. 40:e12592.

Everts B, Perona-Wright G, Smits HH, Hokke CH, Van Der Ham AJ, Fitzsimmons CM, et al 2009. Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. *J Exp Med*. 206:1673–80.

Fairfax KC, Amiel E, King IL, Freitas TC, Mohrs M, Pearce EJ 2012. IL-10R blockade during chronic *Schistosoma mansoni* results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. *PLoS Pathog* 8:e1002490.

Falcão PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A 1998. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunol* 20: 447-54.

Fallon PG 2000. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunology Today*:21 29–35.

Farah IO, Mola PW, Kariuki TM, Nyindo M, Blanton RE, King CL 2000. Repeated Exposure Induces Periportal Fibrosis in *Schistosoma mansoni*-Infected Baboons: Role of TGF- β and IL-4. *J Immunol* 2000; 164:5337-5343.

Figliuolo da Paz VR., Figueiredo-Vanzan D., & dos Santos Pyrrho, A. 2019. Interaction and involvement of cellular adhesion molecules in the pathogenesis of Schistosomiasis mansoni. *Immunology Letters*, 206, 11–18. doi:10.1016/j.imlet.2018.11.011

Fulford AJ, Butterworth AE, Ouma JH, Sturrock RF. A statistical approach to schistosome population dynamics and estimation of the life-span of *Schistosoma mansoni* in man. *Parasitology* 1995 110(Pt 3):307–16.

- Geerts A, 2001. History, heterogeneity, developmental biology, and function of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis.* 21, 311-336.
- Grimaud JA 1987. Cell matrix interaction in Schistosomal portal fibrosis: a dynamic event. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, RJ* 82, IV:55-65.
- Gryseels B, Polman K, Clerinx J & Kestens L 2006. Human schistosomiasis. *The Lancet:* 368 1106–1118.
- Gryssels B 2012. Schistosomiasis. *Infectious Diseases Clinics of North American:* 26 383-397.
- Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology:* 146 1322–1327.
- Gordon S 2003. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3: 23-35.
- González MI, Lopes F, McKay DM, Reyes JL 2018. Mast cell deficiency in mice results in biomass over growth and delayed expulsion of the rat tapeworm *Hymenolepis diminuta*. *Biosci Rep* 30;38 (6).
- Gundra UM, Girgis NM, Ruckerl D, Jenkins S, Ward LN, Kurtz ZD, Wiens KE, Tang MS, Basu-Roy U, Mansukhani A, Allen JE, Loke P 2014. Alternatively activated macrophages derived from monocytes and tissue macrophages are phenotypically and functionally distinct. *Blood.* 15, 123(20).
- Haeberlein S, Obieglo K, Ozir-Fazalalikhani A, Chay'e MAM, Veninga H, van der Vlugt LEPM, A. Voskamp A, L. Boon L, J.M.M. den Haan JMM, Westerhof LB, Wilbers RHP, Schots A, Schramm G, Hokke CH, Smits HH 2017. Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/alpha-1, trigger the development of regulatory B cells, *PLoS Pathog.* 13 1–28.
- Hams E, Aviello G, Fallon PG 2013. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front Immunol* 4:89.
- Hams E, Armstrong ME, Barlow JL, Saunders SP, Schwartz C, Cooke G, et al 2014. IL-25 and type 2 innate lymphoid cells induce pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 111:367–72.
- Hams E, Bermingham R, Wurlod FA, Hogan AE, O'Shea D, Preston RJ, Rodewald HR, McKenzie ANJ, Fallon PG 2016. The helminth T2 RNase v1 promotes metabolic homeostasis in an IL-33 and group 2 innate lymphoid cell-dependent mechanism. *FASEB J* (2):824-35.
- Hansel TT, De Vries IJ, Carballido JM, Braun RK, Carballido- Perrig N, Rihs S, Blaser K, Walker C 1992. Induction and function of eosinophil intercellular adhesion molecule- 1 and HLA-DR. *J Immunol;* 149: 2130–2136.

Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT 2005. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 6:1123–32.

He X, Xie J, Wang Y, Fan X, Su Q, Sun Y, Lei N, Zhang D, Gao G, Pan W 2018. Down-regulation of micro-RNA-203-3p initiates type 2 pathology during schistosome infection via elevation of interleukin-33. *PLoS Pathog* 19;14(3):e1006957.

Hellerbrand C, Stefanovic B, Giordano F, Burchardt ER, Brenner DA 1999. The role of TGFbeta1 in initiating hepatic stellate cell activation in vivo. *J Hepatol* 30 (1): 77-87

Hendriks HF, Verhoofstad WA, Brouwer A, de Leeuw AM, Knook DL 1985. Perisinusoidal fat-storing cells are the main vitamin A storage sites in rat liver. *Exp. CellRes.* 160, 138–149.

Hendriks HF, Blaner WS, Wennekers HM, Piantedosi R, Brouwer A, de Leeuw AM, Goodman DS, Knook DL 1988. Distributions of retinoids, retinoid-binding proteins and related parameters in different types of liver cells isolated from young and old rats. *Eur. J. Biochem.* 171, 237–244.

Herbert DR, Holscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossmann H, et al 2004. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20:623–635.

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):945-55.

Hesse M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, et al 2001. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol.* 167:6533–44.

Hiatt RA, Sotomayor ZR, Sanchez G, Zambrana M, Knight WB 1979. Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of Infectious Diseases:* 139 659–666.

Hiatt RA, Ottesen EA, Sotomayor ZR, Lawley TJ 1980. Serial observations of circulating immune complexes in patients with acute schistosomiasis. *The Journal of Infectious Diseases:* 142 665–670.

Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y 2017. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev,* 1;121:27-42.

Hoffman, W. A., Pons, J. A., & Janer, J. L 1934. The Sedimentation-Concentration Method In Schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine,* 9(3), 283-291.

Hoffmann 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.

Hsu SY, Hsu HF, Mitros FA, Helms CM, Solomon RI 1980. Eosinophils as effector cells in the destruction of *Schistosoma mansoni* eggs in granulomas. *Ann Trop Med Parasitol* 74:179–83.

Humphreys EN, Xu D, Hepworth MR, Liew FY, Grencis RK 2008. IL-33, a potent inducer of adaptive immunity to intestinal nematodes. *The Journal of Immunology*: 180 2443–2449.

Hung LY, Lewkowich IP, Dawson LA, Downey J, Yang Y, Smith DE, Herbert DR 2013. IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical Type 2 immunity against hookworms. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110, 282–287.

Huang, L, Gebreselassie NG, Gagliardo LF, Ruyechan MC, Lee NA, Lee JJ, Appleton JA 2014. Eosinophil-derived IL-10 supports chronic nematode infection. *J. Immunol.* 193, 4178–4187.

Huang, L. & Appleton, J. A 2016. Eosinophils in helminth infection: defender and dupes. *Trends Parasitol.* 32, 798–807.

Jackson-Jones LH, Rückerl D, Svedberg F, Duncan S, Maizels RM, Sutherland TE, Jenkins SJ, McSorley HJ, Bénézech C, MacDonald AS, Allen JE 2016. Il-33 delivery induces serous cavity macrophage proliferation independent of interleukin-4 receptor alpha. *Eur J Immunol* 46(10):2311-2321.

Jacobs W, Kumar-Singh S, Bogers J, Van de Vijer K, Deelder A, Van Marck E 1998. Transforming growth factor-b, basement membrane components and heparan sulphate proteoglycans in experimental hepatic schistosomiasis mansoni. *Cell Tissue Res* 292:101-106.

Jankovic D, Cheever AW, Kullberg MC, Wynn TA, Yap G, Caspar P, Lewis FA, Clynes R, Ravetch JV, Sher A 1998. CD4+ T Cell-mediated Granulomatous Pathology in Schistosomiasis Is Downregulated by a B Cell-dependent Mechanism Requiring Fc Receptor Signaling. *The Journal of Experimental Medicine* (187) 4 619–629.

Jiang HR, Milovanović M, Allan D, Niedbala W, Besnard AG, Fukada SY, Alves-Filho JC, Togbe D, Goodyear CS, Linington C, Xu D, Lukic ML, Liew FY 2012. IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN-gamma production and inducing alternatively activated macrophages. *Eur J Immunol.* 42(7):1804-14.

Jones LA, Roberts F, Nickdel MB, Brombacher F, McKenzie AN, Henriquez FL, Alexander J, Roberts CW 2010. IL-33 receptor (T1/ST2) signalling is necessary to prevent the development of encephalitis in mice infected with *Toxoplasma gondii*. *Eur. J. Immunol.* (40), 426–436.

Joshi AD, Raymond T, Coelho AL, Kunkel SL, Hogaboam CM 2008. A systemic granulomatous response to *Schistosoma mansoni* eggs alters responsiveness of bone marrow-

derived macrophages to toll-like receptor agonists. *Journal of Leukocyte Biology* Volume 83, 314-324.

Joshi AD, Oak SR, Hartigan AJ, Finn WG, Kunkel SL, Duffy KE, Das A, Hogaboam CM 2010. Interleukin-33 contributes to both M1 and M2 chemokine marker expression in human macrophages. *BMC Immunol* 19:11,52.

Junqueira LCU; Junqueira LMM 1983. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Santos.

Junqueira, LCU; Bignolas, G; Bretani, R 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. *Histochem J* 11: 447-455.

Kalantari P, Bunnell SC, Stadecker MJ 2019. The C-type Lectin Receptor-driven, Th17 cell-mediated severe pathology in schistosomiasis: not all immune responses to helminth parasites are Th2 dominated. *Front Immunol* 30:10,26.

Kamdem SD, Konhawa F, Kuemkon EM, Meyo Kamguia L, Tchanana GK, Nche F, Oumarou A, Hamza M, Ouratou Y, Tcheutchoua MN, Ghislain Essomba R, Ngogang MP, Kengne M, Netongo PM, Ondigui BE, Okomo Assoumou MC, Brombacher F, Nono JK 2019. Negative association of interleukin-33 plasma levels and schistosomiasis infection in a site of polyparasitism in Rural Cameroon. *Front. Immunol.* 10 e2827.

Kaviratne M, Hesse M, Leusink M, Cheever A W, Davies SJ, Mckerrow JH, Wakefield LM, Letterio J J, Wynn TA 2004. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *The Journal Immunology*: 173 (6) 4020-4029.

Katz N., Chaves A., & Pellegrino J. 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 14(6), 397-400.

Katz N & Peixoto VS 2000. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*: 33(3) 303-308.

Katz N & Almeida K 2003. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciência e Cultura*: 55 (1) 38-40.

Katz N 2018. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelminthoses/Naftale Katz. – Belo Horizonte: CPqRR 2018.

Kato A. 2019. Group 2 innate lymphoid cells in airway diseases. *Chest*. pii: S0012-3692(19)31023-2.

King C 2001. Initiation and Regulation of Disease in Schistosomiasis London: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd

King CH & Dangerfield-Cha M 2008. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illn* 4: 65-79.

Klose CS & Artis D 2016. Innate lymphoid cells as regulators of immunity inflammation and tissue homeostasis. *Nat Immunol* 17:765–74.

Knuhr K, Doenhoff M, Fehrenbach H, Haas H, Schramm G 2015. IPSE/alpha- 1, a secreted glycoprotein from *Schistosoma mansoni* eggs, may inhibit inflammation. In: 27th Spring Symposium of the German Society of Allergy and Clinical Immunology: *Allergo Journal International* 24–43.

Krishack PA, Louviere TJ, Decker TS, Kuzel TG, Greenberg JA, Camacho DF, Hrusch CL, Sperling AI, Verhoef PA 2019. Protection against *Staphylococcus aureus* bacteremia-induced mortality depends on ILC2s and eosinophils. *JCI Insight* 5-30.

Kubo M 2017. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunol Rev.* 278(1):162-172.

Kuchler AM, Pollheimer J, Balogh J, et al 2008. Nuclear interleukin-33 is generally expressed in resting endothelium but rapidly lost upon angiogenic or proinflammatory activation. *Am J Pathol.* 173:1229-1242.

Kurowska-Stolarska M, Stolarski B, Kewin P, Murphy G, Corrigan CJ, Ying S, Pitman N, Mirchandani A, Rana B, Van Rooijen N, Shepherd M, McSharry C, McInnes IB, Xu D, Liew FY 2009. IL-33 Amplifies the Polarization of Alternatively Activated Macrophages That Contribute to Airway Inflammation. *The Journal of Immunology* 6469-6477.

Lambertucci JR, Silva LCS, Voietta I 2005. Esquistossomose Mansônica. In: Coura, JR, (editor). *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 931-946.

Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ 2002. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol.* 1;169 (5):2253-63.

Le HT, Tran VG, Kim W, Kim J, Cho HR, Kwon B. 2012. IL-33 priming regulates multiple steps of the neutrophil-mediated anti-*Candida albicans* response by modulating TLR and dectin-1 signals. *J. Immunol.* (189), 287–295.

Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Kotliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA 2001. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J. Exp. Med.* 194, 809–821.

Lenzi HL, Romanha WS, Zorzenon dos Santos RM, Rosas A, Mota EM, Manso PPA, Caputo LFG, Pelajo-Machado M 2006. Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic componente and closure. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 101 Suppl 1: 219-31.

- Lenzi HF, Jurberg AD, Coelho PMZ, Lenzi JA 2008. Migração e desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HF. *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinária. Ed. Fiocruz: 149-160.
- Li D, Guabiraba R, Besnard AG, Komai-Koma M, Jabir MS, Zhang L, Graham GJ, Kurowska-Stolarska M, Liew FY, McSharry C, Xu D 2014. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 134 1422–1432.e11.
- Li ZY, Xiao L, Lin G, Tang J, Chen Y, Chen L, Li B, Wu M, Liu S, Huang C, Ferrandon D, Li Z 2019. Contribution of tissue transglutaminase to the severity of hepatic fibrosis resulting from *Schistosoma japonicum* infection through the regulation of IL-33/ST2 expression. *Parasit Vectors.* 14;12(1):302.
- Liu Y, Meyer C, Müller A, Herweck F, Li Q, Müllenbach R, Mertens PR, Dooley S, Weng HL 2011. IL-13 induces connective tissue growth factor in rat hepatic stellate cells via TGF- β -independent Smad signaling. *J. Immunol.* 187, 2814–2823.
- Liu Y, Munker S, Müllenbach R, Weng HL 2012. IL-13 signaling in liver fibrogenesis. *Front Immunol* 3: 1-7.
- Liu K, Zhao E, Ilyas G, Lalazar G, Lin Y, Haseeb M, Tanaka KE, Czaja MJ 2015. Impaired macrophage autophagy increases the immune response in obese mice by promoting proinflammatory macrophage polarization. *Autophagy.* 11(2):271-84.
- Liew YF, Pitman NI, McInnes IB 2010. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature Reviews Immunology* 10 103-110.
- Liew FY, Girard JP, Turnquist HR 2016. Interleukin-33 in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 16:676-689.
- Loke P, Gallagher I, Nair MG, Zang X, Brombacher F, Mohrs M, Allison JP, Allen JE 2007. Alternative activation is an innate response to injury that requires CD4⁺ T cells to be sustained during chronic infection. *J Immunol* 15; 179(6):3926-36.
- Long H, Liao W, Wang L, Qianjin L 2016. A player and coordinator: The versatile roles of eosinophils in the immune system. *Transfus Med Hemother.* 43(2):96-108.
- Lopes DM, Oliveira SC, Page B, Carvalho LP, Carvalho EM, Cardoso LS 2019. *Schistosoma mansoni* rSm29 Antigen Induces a Regulatory Phenotype on Dendritic Cells and Lymphocytes From Patients With Cutaneous Leishmaniasis. *Front Immunol.* 9;9:3122.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Lu J, Cao Q, Zheng D, Sun Y, Wang C, Yu X, et al 2013. Discrete functions of M2a and M2c macrophage subsets determine their relative efficacy in treating chronic kidney disease. *Kidney Int* 84(4):745–55.

- Lundy SK & Lukacs NW 2013. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Frontiers in immunology* 4 1-18.
- Luthi AU, Cullen SP, Mcneela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kerse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ 2009. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*: 31 84-98.
- Lutz MB, Strobl H, Schuler G, Romani N 2017. GM-CSF Monocyte-Derived Cells and Langerhans Cells As Part of the Dendritic Cell Family. *Front Immunol.* 23; 8:1388.
- Lutz A 1919. *Schistosomum mansoni* e a schistosomose segundo observações feitas no Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 11: 121-155.
- MacDonald, A.S., A.D. Straw, B. Bauman, and E.J. Pearce. 2001. CD8- dendritic cell activation status plays an integral role in influencing Th2 response development. *J. Immunol.* 167:1982–1988.
- Maggi L, Rocha IC, Camelo GMA, Fernandes VR, Negrão-Corrêa D 2021. The IL-33/ST2 pathway is not essential to Th2 stimulation but is key for modulation and survival during chronic infection with *Schistosoma mansoni* in mice. *Cytokine* 138:155390.
- Mahmoud AAF, Warrenk, S, Grahamr, CJR 1975. Antieosinophil serum and the kinetics of eosinophilia in schistosomiasis mansoni. *J. Exp. Med.*, 142, 560.
- 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: 677–686.
- Martinez FO, Gordon S, Locati M, Mantovani A 2006. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* 177:7303-11.
- Martinez FO, Helming L, Gordon S 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27:451-83.
- Martinez FO, Gordon S 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep* 3;6-13.
- Masamba P, Adenawo AF, Oyinloye BE, Kappo AP 2016. Universal Stress Proteins as New Targets for Environmental and Therapeutic Interventions of Schistosomiasis. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 13, 972.
- Massacand JC, Stettler RC, Meier R, Humphreys NE, Grecis RK, Marsland BJ, Harris NL. Helminth products bypass the need for TSLP in Th2 immune responses by directly modulating dendritic cell function 2009. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106:13968–13973.
- Mawhorter SD, Kazura JW, Boom WH 1994. Human eosinophils as antigen-presenting cells: Relative efficiency for superantigen- and antigen-induced CD4+ T-cell proliferation. *Immunology*;81:584–591.

- Maxwell PH, Ferguson DJ, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Doe BG, Johnson MH, Ratcliffe PJ. 1994. Expression of a homologously recombined erythropoietin-SV40T antigen fusion gene in mouse liver: evidence for erythropoietin production by Ito cells. *Blood* 84, 1823–1830.
- McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, Voehringer D, McKenzie AN, Neurath MF, Pflanz S, Wirtz S 2013. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity* 39(2):357-71.
- McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ, Zhou XN 2018. Schistosomiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 9;4(1):13.
- Meeusen EN & Balic A 2000. Do eosinophils have a role in the killing of helminth parasites? *Parasitol Today* 16(3):95-101.
- Melo F, Amaral M, Oliveira P, Lima W, Andrade M, Michalick M, Raso P, Tafuri W, Tafuri W 2008. Diffuse intralobular liver fibrosis in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Am J Trop Med Hyg* 79(2):198-204.
- Meng, F, Wang K, Aoyama T, Grivennikov SI, Paik Y, Scholten D, Cong M, Iwaisako K, Liu X, Zhang M et al. 2012. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice. *Gastroenterology* 143, 765–776.e3.
- Millar NL, Gilchrist DS, Akbar M, Reilly JH, Kerr SC, Campbell AL, Murrell GAC, Liew FY, Kurowska-Stolarska M, McInnes IB 2015. MicroRNA29a regulates IL-33-mediated tissue remodelling in tendon disease. *Nat Commun* 10;6:6774.
- Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, Furusawa J, Ohtani M, Fujii H, Koyasu S 2010. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature*. 463(7280):540-4.
- Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL 1986. Two types of murine helper T cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*;136:2348–55.
- Mosmann TR 1992. T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. *Ann N Y Acad Sci*. 664:89-92.
- Moore DL, Grove DI, Warren KS 1977. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. *J Pathol*.121:41–50.
- Mosser, D.M. 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. *Nat Rev Immunol* 8(12):958-69.
- Moussion C, Ortega N, Girard JP 2008 The IL-1- like cytokine IL-33 is constitutively expressed in the nucleus of endothelial cells and epithelial cells in vivo: A novel ‘alarmin’? *PLoS ONE*. 3:e3331.

Mu Y, McManus DP, Hou N, Cai P 2021. Schistosome Infection and Schistosome-Derived Products as Modulators for the Prevention and Alleviation of Immunological Disorders. *Front Immunol*, 22;12:619776.

Müller CA, Autenrieth IB, Peschel A 2005. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 62 (12) 1297–1307.

Munder M, Eichmann K, Modolell M 1998. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4⁺ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 1;160(11):5347-54.

Munder M, Eichmann K, Morán JM, Centeno F, Soler G, Modolell M 1999. Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 1;163(7):3771-7.

Munder M 2009. Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system. *Br J Pharmacol*. 158(3):638-51.

Nair MG, Cochrane DW, Allen JE 2003. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. *Immunol Lett*;85:173–180.

Nair MG, Du Y, Perrigoue JG, Zaph C, Taylor JJ, Goldschmidt M, Swain GP, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy A, Karow M, Stevens S, Pearce EJ, Artis D. 2009. Alternatively activated macrophage-derived RELM- α is a negative regulator of type 2 inflammation in the lung. *J Exp Med*. 13;206(4):937-52.

Neill, D. R, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE, McKenzie AN. 2010. Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464, 1367–1370.

Novato-Silva E, Gazzinelli G, Coley DG 1992. Immune Response During Human Schistosomiasis mansoni. XVIII. Immunologic Status of Pregnant Women and their Neonato. *Scandinavian Journal of Immunology* 35 (3) 429-437.

Nunes T, Bernardazzi C, Souza HS 2014. Interleukin-33 and Inflammatory Bowel Diseases: Lessons from Human Studies. *Mediators of Inflammation*: 2014 1-10.

Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Saito H, Nakae S 2010. IL-33 and IL-33 Receptors in Host Defense and Diseases. *Allergology International*: 59 (2) 143-160.

Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Arae K, Morita H, Ishii A, Nambu A, Abe T, Kiyonari H, Matsumoto K, Sudo K, Okumura K, Saito H, Nakae S 2010b. IL-33 is a crucial amplifier of innate rather than acquired immunity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* (107), 18581–18586.

Olds GR, Griffin A, Kresina TF 1985. Dynamics of collagen accumulation and polymorphism in murine *Schistosoma japonicum*. *Gastroenterology* 89:617-24.

Oliveira MF, D'ávila JC, Torres CR, Oliveira PL, Tempone AJ, Rumjanek FD, et al 2000. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol*.111:217–21.

Oliveira VG 2016. Participação de eosinófilos na evolução da infecção experimental por *Schistosoma mansoni* em camundongos. Mestrado- Universidade Federal de Minas Gerais- Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gerais.

Oliveira WJ, Magalhães FDC, Elias AMS, de Castro VN, Favero V, Lindholz CG, Oliveira ÁA, Barbosa FS, Gil F, Gomes MA, Graeff-Teixeira C, Enk MJ, Coelho PMZ, Carneiro M, Negrão-Corrêa DA, Geiger SM 2018. Evaluation of diagnostic methods for the detection of intestinal schistosomiasis in endemic areas with low parasite loads: Saline gradient, Helmintex, Kato-Katz and rapid urine test. *PLoS Negl Trop Dis*. 22;12 (2).

Oshiro TM, Macedo MS, Macedo-Soares MF 2005. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm Res*;54:17–21.

Osman A, Niles EG, Verjovski-Almeida S, LoVerde PT 2006. *Schistosoma mansoni* TGF-beta receptor II: role in host ligand-induced regulation of a schistosome target gene. *PLoS Pathog*, 2(6):e54.

Paraense WL 2001. The schistosome vectors in the Americas. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*: 96 7-16.

Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spina L, Mاتيولli B, Scarpa M, Fiocchi C, Vecchi M, Pizarro TT 2010. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental TH1/TH2 driven enteritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 107(17) 8017–8022.

Pastorelli L, De Salvo C, Cominelli MA, Vecchi M, Pizarro TT 2011. Novel cytokine signaling pathways in inflammatory bowel disease: insight into the dichotomous functions of IL-33 during chronic intestinal inflammation. *Therapeutic Advanced Gastroenterology*: 4 311–323.

Pastorelli L, De Salvo C, Cominelli MA, Vecchi M, Pizarro TT 2013. The role of IL-33 in gut mucosal inflammation. *Mediators of Inflammation*: 2013 1- 11.

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 Reviews Immunology*: 2 499-511.

Pearce EJ, Kane CM, Sun J, Taylor JJ, McKee AS, Cervi L 2004. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological Reviews* 201 117-126.

- Padigel UM, Hess JA, Lee JJ, Lok JB, Nolan TJ, Schad GA, Abraham D 2007. Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *J Infect Dis* 196(12):1844-51.
- 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.
- Pellegrino J & Macedo DG 1955. A simplified method for concentration of cercarial. *Journal of Parasitology*: 41 306–309.
- Peng H, Zhang QX, Li XJ, Liu Z, Shen J, Sun R, et al 2016. IL-33 contributes to *Schistosoma japonicum*-induced hepatic pathology through induction of M2 macrophages (vol 6, 29844). *Sci Rep*. 7:29844.
- Pesce JT, Ramalingam TR, Mentink-Kane MM, Wilson MS, El Kasmi KC, 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.
- Pereira ERA, Rodrigues MA, Novaes RD, Caldas IS, Souza RLM, Pereira AAC 2017. Lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice chronically infected by *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* (178), 21-29.
- Piehler D, Grahnert A, Eschke M, Richter T, Köhler G, Stenzel W, Alber G. 2013. T1/ST2 promotes T helper 2 cell activation and polyfunctionality in bronchopulmonary mycosis. *Mucosal Immunol.* (6), 405–414.
- Prata A 2007. Esquistossomose Mansonii. In: Veronesi R, Veronesi FR, (editor). *Tratado de infectologia*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu: 1695-1720.
- Prefontaine D, Lajoie-Kadoch S, Foley S, Audusseau S, Olivenstein R, Halayko AJ, Lemièrre C, Martin JG, Hamid Q 2009. Increased expression of IL-33 in severe asthma: evidence of expression by airway smooth muscle cells. *J. Immunol.* 183, 5094–5103.
- Price AE, Liang HE, Sullivan BM, Reinhardt RL, Eislely CJ, Erle DJ, Locksley RM 2010. Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 107, 11489–11494.
- Ragheb S & Boros DL 1989. Characterization of granuloma T lymphocyte function from *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J. Immunol.* 142, 3239–3246.
- Ramalingam TR, Pesce JT, Sheikh F, Cheever AW, Mentink-Kane MM, Wilson MS, Stevens S, Valenzuela DM, Murphy AJ, Yancopoulos GD, Urban JF Jr, Donnelly RP, Wynn TA 2008. Unique functions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receptor alpha1 chain. *Nat Immunol.* 9(1):25-33.

- Reddy GK, Enwemeka CS 1996 . A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem.* 29(3):225-9.
- Reece JJ, Siracusa MC, Scott AL 2006. Innate immune responses to lung-stage helminth infection induce alternatively activated alveolar macrophages. *Infect Immun*;74:4970–4981.
- Reitman S, Frankel S 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.* 28: 56–63.
- Reyes JL, Fernando MR, Lopes F, Leung G, Mancini NL, Matisz CE, Wang A, McKay DM 2016. IL-22 restrains tapeworm mediated protection against experimental colitis via regulation of IL-25 expression. *PLoS Pathog.* 7;12(4).
- Rezende MC, Araújo ES, Moreira JMP, Rodrigues VF, Rodrigues JL, Pereira CAJ, Negrão-Corrêa D 2015. Effect of different stages of *Schistosoma mansoni* infection on the parasite burden and immune response to *Strongyloides venezuelensis* in co-infected mice. *Parasitol. Res.* 114 (2015) 4601–4616.
- Rezende M, Moreira JMP, Fernandes LLM, Rodrigues VF, Negrão-Corrêa D 2020. *Strongyloides venezuelensis*-infection alters the profile of cytokines and liver inflammation in mice co-infected with *Schistosoma mansoni*. *Cytokine.* 127:154931.
- Rocha IC 2015. Participação de IL-33 na formação e modulação do granuloma hepático em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*. Doutorado- Universidade Federal de Minas Gerais- Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- Rodríguez-Sosa M, Satoskar AR, Calderón R, Gomez-Garcia L, Saavedra R, Bojalil R, Terrazas LI 2002. Chronic helminth infection induces alternatively activated macrophages expressing high levels of CCR5 with low interleukin-12 production and Th2-biasing ability. *Infect Immun.* 70(7):3656-64.
- Rodrigues JPF, Caldas IS, Gonçalves RV, Almeida LA, Souza RLM, Novaes RD 2017. *S. mansoni*-*T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. *Nitric Oxide.* 1;66:43-52.
- Rostan O, Gangneux JP, Piquet-Pellorce C, Manuel C, McKenzie AN, Guiguen C, Samson M, Robert-Gangneux F 2013. The IL-33/ST2 axis is associated with human visceral leishmaniasis and suppresses Th1 responses in the livers of BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. *MBio* (4), e00383–00313.
- Ross AGP, Bartley PB, Sleigh AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, MacManus DP 2002. Schistosomiasis. *The New England Journal of Medicine:* 346 (16) 1212-1220.
- Röszer T 2015. Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms. *Mediators Inflamm* 15:816460.
- Rückerl D, Allen JE 2014. Macrophage proliferation, provenance, and plasticity in macroparasite infection. *Immunol Rev* 262 (1):113-33.

- 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.* 175:3920–6.
- Rutitzky LI, Stadecker MJ 2011. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ . *Eur. J. Immunol.* 41: 2677–2687.
- Rutschman R, Lang R, Hesse M, Ihle JN, Wynn TA, Murray PJ 2001. Cutting edge: STAT6-dependent substrate depletion regulates nitric oxide production. *J. Immunol.* 166, 2173-2177.
- 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.
- Salimi M, Barlow JL, Saunders SP, Xue L, Gutowska-Owsiak D, Wang X, Huang LC, Johnson D, Scanlon ST, McKenzie AN, Fallon PG, Ogg GS 2013. A role for IL-25 and IL-33-driven type-2 innate lymphoid cells in atopic dermatitis. *J. Exp. Med.* 210, 2939–2950.
- Sanada S, Hakuno D, Higgins LJ, Schreiter ER, McKenzie AN, Lee RT 2007 IL-33 and ST2 comprise a critical biomechanically induced and cardioprotective signaling system. *J. Clin. Invest.* 117, 1538–1549.
- Sattler S, Hermelijn SH, Damo X, Fang-Ping H 2013. The Evolutionary Role of the IL-33/ST2 System in Host Immune Defence. *Archivum. Immunologiae et. Therapia Experimentalis:* 6 1107-1117.
- Sedhom, Ma, Pichery M, Murdoch JR, Foligné B, Ortega N, Normand S, Mertz K, Sanmugalingam D, Brault L, Grandjean T, Lefrancais E, Fallon PG, et al 2013. Neutralisation of the interleukin-33/ST2 pathway ameliorates experimental colitis through enhancement of mucosal healing in mice. *Gut* 62, 1714–1723.
- Seki E, Brenner DA 2015. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 22(7):512-8.
- Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity:* 23 479–490.
- Schwartz C, Oeser K, Da Costa CP, Layland LE, Voehringer D 2014. T Cell-Derived IL-4/IL-13 Protects Mice against Fatal *Schistosoma mansoni* Infection Independently of Basophils. *J Immunol* 193:3590-3599.
- Schwartz C & Fallon PG 2018. *Schistosoma* “Eggs-Itting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Front. Immunol.* 9:2492. doi:10.3389/fimmu.2018.02492.
- Shapouri-Moghaddam A, Mohammadian S, Vazini H, Taghadosi M, Esmaeili SA, Mardani F et al 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol* 233:6425–40.

Silveira MR, Nunes KP, Cara DC, Souza DG, Corrêa A. Jr, Texeira MM, Negrão-Corrêa D 2002. Infection with *Srongyloides venezuelensis* induces transiente airway eosinophilic inflamation, an increases in immunoglobulin E and hyperrespsiveness in rats. *Infection and Immunity*: 70 (11) 6263-6272.

Singh KP, Gerard HC, Hudson AP, Boros DL 2004. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during the resorption of schistosome egg-induced fibrosis in praziquantel-treated mice. *Immunology* 111(3):343-52.

Siqueira-Batista R, Ramos Júnior AN, Farinazzo RJM, *et al* 1998. O *Schistosoma mansoni*. In: Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB, I (editores). *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr: 26-32.

Smith PM, Shainheit MG, Bazzone LE, Rutizky LI, Poltorak A, Stadecker MJ 2009. Genetic control of severe egg-induced immunopathology and IL-17 production in murine schistosomiasis. *J Immunol* 1;183(5):3317-23.

Soloviova K, Fox EC, Dalton JP, Caffrey CR, Davies SJ 2019. A secreted schistosome cathepsin B1 cysteine protease and acute schistosome infection induce a transient T helper 17 response. *Plos Negl Trop Dis*17;13(1): e0007070.

Souza CPF, Vitorino RR, Costa AP, Faria FCF, Santana LA, Gomes AP 2011. Esquistossomose mansônica: aspectos gerias, imunologia, patogênese e história natural. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*: 9 (4) 300-307.

Souza COS, Gardinasse LG, Rodrigues V, Faccioli LH 2020. Monocyte and Macrophage-Mediated Pathology and Protective Immunity During Schistosomiasis. *Front Microbiol*.12;11:1973.

Spencer M, Yao-Borengasser A, Unal R, Rasouli N, Gurley CM, Zhu B, Peterson CA, Kern PA 2010. Adipose tissue macrophages in insulin-resistant subjects are associated with collagen VI and fibrosis and demonstrate alternative activation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 299 (6): E1016-27.

Steinfeld S, Andersen JF, Cannons JL, Feng CG, Joshi M, Dwyer D, *et al* 2009. The major component in schistosome eggs responsible for conditioning dendritic cells for Th2 polarization is a T2 ribonuclease (omega-1). *J Exp Med*.206:1681–90.

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*. 7;83(2):209-15.

Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM 2007. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol*. 82(2) 244-52.

Swartz JM, Dyer KD, Cheever AW, Ramalingam T, Pesnicak L, Domachowske JB, Lee JJ, Lee NA, Foster PS, Wynn TA, Rosenberg HF 2006. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood* 1;108(7):2420-7.

Tan Z, Liu Q, Jiang R, LV, Shoto SS, Maillet I, Quesniaux V, Tang J, Zhang W, Sun B, Ryffel B 2018. Interleukin-33 drives hepatic fibrosis through activation of hepatic stellate cells. *Cell Mol Immunol*, 15 (4): 388-398.

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-Carvalho A, Martins-Filho OA., Peruhype-Magalhaes V, 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*, v. 108, p. 139-149.

Teixeira M.M., Talvani A., Tafuri W.L., Lukacs N.W., Hellewell P.G 2001. Eosinophil recruitment into sites of delayed-type hypersensitivity reactions in mice, *J. Leukoc. Biol.* 69 (3)353–360.

Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Sala M, Chamuleau RA 1995. Collagen synthesis by human liver miofibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. *Journal of Hepatology*: 2(3) 307-317.

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 glycan uses a toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J. Immunol.* 171 5837–5841.

Truscott M, Evans DA, Gunn M, Hoffmann KF 2013. *Schistosoma mansoni* hemozoin modulates alternative activation of macrophages via specific suppression of retlna expression and secretion. *Infect Immun.* 81:133–42.

Tsikis D 2007. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide área of research. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 15;851(1-2):51-70 6.

Tsuchida T, Friedman SL 2017. Mechanisms of hepatic stellate cell activation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 14(7):397-411.

Tweyongyere R, Namanya H, Naniima P, Cose S, Tukahebwa EM, Elliott AM, Dunne DW, Wilson S 2016. Human eosinophils modulate peripheral blood mononuclear cell response to *Schistosoma mansoni* adult worm antigen in vitro. *Parasite Immunol* 38(8):516-22.

Ushiki T 2002. Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Arch Histo Cytol* 65 (2): 109-26.

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.

Vannella KM, Ramalingam TR, Borthwick LA, Barron L, Hart KM, Thompson RW, Kindrachuk KN, Cheever AW, White S, Budelsky AL, Comeau MR, Smith DE, Wynn TA 2016. Combinatorial targeting of TSLP, IL-25 and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *Sci Transl Med* 4;8(337):337ra65.

Zhang W, Xu W, Xiong S 2010. Blockade of Notch1 signaling all eviates murine lupus via blunting macrophage activation and M2b polarization. *J Immunol* 184(11):6465–78.

Zhang Y, Chen L, Gao W, Hou X, Gu Y, Gui L, Huang D, Liu M, Ren C, Wang S, Shen J 2012. IL-17 neutralization significantly ameliorates hepatic granulomatous inflammation and liver damage in *Schistosoma japonicum* infected mice. *Eur. J. Immunol.* 42 1523–1535.

Zhang M, Z. Fu Z, C. Li C, Han Y, Cao X, Han H 2015. Screening diagnostic candidates for schistosomiasis from tegument proteins of adult *Schistosoma japonicum* using an immunoproteomic approach. *PLoS Negl Trop Dis* 23;9(2):e0003454.

Zheng B, Zhang J, Chen H, Nie H, Miller H, Gong Q, Liu C 2020. T Lymphocyte-Mediated Liver Immunopathology of Schistosomiasis. *Front Immunol.* 18;11:61.

Zhu J, Xu Z, Chen X, Zhou S, Zhang W, Chi Y, et al 2014. Parasitic antigens alter macrophage polarization during *Schistosoma japonicum* infection in mice. *Parasit Vect.* 7:122.

Wang Y, Da’Dara AA, Thomas PG, Harn DA 2010. Dendritic cells activated by an anti-inflammatory agent induce CD4+ T helper type 2 responses without impairing CD8+ memory and effector cytotoxic T-lymphocyte responses. *Immunology.* 129:406–17.

Weinstock JV, Boros DL 1983. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with Schistosomiasis mansoni. *J Immunol.* 130:418–22.

Weinstock JV, Chensue SW, Boros DL 1983. Modulation of granulomatous hypersensitivity. V. Participation of histamine receptor positive and negative lymphocytes in the granulomatous response of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *J Immunol.* 130(1):423-7.

Weiskirchen R, Tacke F 2017. Interleukin-33 in the pathogenesis of liver fibrosis:alarming ILC2 and hepatic stellate cells. *Cell Mol Immunol,* 14(2):143-145.

Weller PF, Spencer LA 2017. Functions of tissue-resident eosinophils. *Nat Rev Immunol* 17(12):746-760.

Wen T, Rothenberg ME 2016. The regulatory function of Eosinophils. *Microbiol Spectr.* 4 (5):10.1128

Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA 2007. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology & Cell Biology:* 85 (2) 148–154.

Wilson MS, Elnekave E, Mentink-Kane MM, Hodges MG, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson RW, Kamanaka M, Flavell RA, Keane-Myers A, Cheever AW, Wynn TA 2007b.

IL-13 α 2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway-hyperreactivity, and fibrosis in mice. *J Clin Invest*. 117(10):2941-51.

World Health Organization (WHO) 2020. Status of schistosomiasis endemic countries 2020. Disponível em: < http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html>. Acesso em: 29 abril 2021

Wynn TA, Cheever AW, Williams ME, Hieny S, Caspar P, Kühn R, Müller 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. *The Journal of Immunology* 4473-4480.

Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, Mentink-Kane MM 2004. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological Reviews*: 201 156–167.

Wynn TA, Barron L 2010. Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. *Semin Liver Dis*. 30(3):245-57.

Wynn TA, Vannella KM 2016. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis. *Immunity*. 15;44(3):450-462.

Yamashita T & Boros DL 1992. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni. *The Journal of Immunology*: 149 3659–3664.

Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, et al 2003. Direct expansion of functional CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med*. 198:235–47.

Yang Z, Grinchuk V, Urban Jr JF, Bohl J, Sun R, Notari L, Yan S, Ramalingam T, Keegan AD, Wynn TA, Shea-Donohue T, Zhao A 2013. Macrophages as IL-25/IL-33 responsive cells play an important role in the induction of type 2 immunity. *PLoS One* 8 (3):e59441.

Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii KJ, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K 2012. Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 109:3451-3456.

Yasuda K, Adachi T, Koida A, Nakanishi K 2018. Nematode-infected mice acquire resistance to subsequent infection with unrelated nematode by inducing highly responsive group 2 innate lymphoid cells in the lung. *Front Immunol* 19;9:2132.

Yu, L, Sun X, Yang F, Yang J, Shen J, Zhongdao W 2012. Inflammatory cytokines IFN- γ , IL-4, IL-13 and TNF- α alterations in schistosomiasis: a meta-analysis. *Parasitol Res*: 110:1547–1552.

Yu Y, Deng W, Lei J 2015. Interleukin-33 promotes Th2 immune responses in infected mice with *Schistosoma japonicum*. *Parasitol. Res*. 114: 2911–2918.

11. ANEXOS

Artigos publicados como co-autora

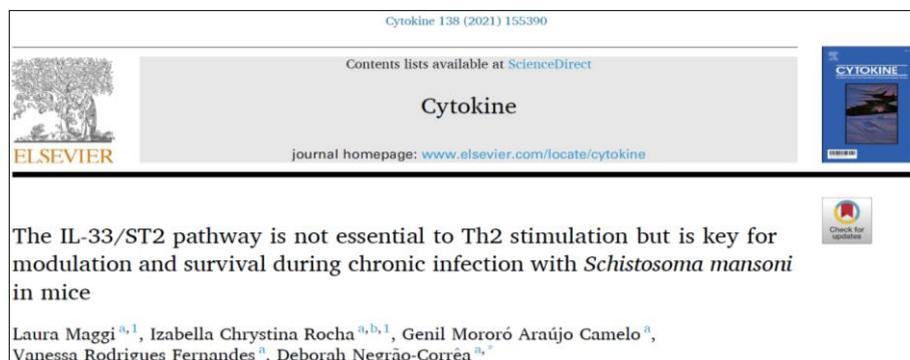


Referência: DE REZENDE, MICHELLE CARVALHO ; MOREIRA, JOÃO MARCELO PEIXOTO ; FERNANDES, LAURA LIANA MAGGI ; RODRIGUES, VANESSA FERNANDES ; NEGRÃO-CORRÊA, DEBORAH . *Strongyloides venezuelensis*-infection alters the profile of cytokines and liver inflammation in mice co-infected with *Schistosoma mansoni*. CYTOKINE **JCR**, v. 127, p. 154931, 2020.



Referência: RODRIGUES, VANESSA FERNANDES ; CAMELO, GENIL MORORÓ ARAÚJO ; DE REZENDE, MICHELLE CARVALHO ; MAGGI, LAURA ; SILVA, JEFERSON KELVIN ALVES OLIVEIRA ; RODRIGUES, JOÃO GUSTAVO MENDES ; ARAÚJO, MÁRCIO SOBREIRA SILVA ; MARTINS-FILHO, OLINDO ASSIS ; NEGRÃO-CORRÊA, DEBORAH . Infection by *Strongyloides venezuelensis* attenuates chronic colitis induced by Dextran Sodium Sulfate ingestion in BALB/c mice. IMMUNOBIOLOGY **JCR**, v. 226, p. 152129, 2021.

Artigo publicado como autora



Referência: MAGGI, LAURA; ROCHA, IZABELLA CHRYSTINA ; CAMELO, GENIL MORORÓ ARAÚJO ; FERNANDES, VANESSA RODRIGUES ; NEGRÃO-CORRÊA, DEBORAH . The IL-33/ST2 pathway is not essential to Th2 stimulation but is key for modulation and survival during chronic infection with *Schistosoma mansoni* in mice. CYTOKINE **JCR**, v. 138, p. 155390, 2021.