



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Parasitologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Parasitologia**

GUILHERME SILVA MIRANDA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, GENÉTICA, PARASITOLÓGICA E  
IMUNOPATOLÓGICA DE UM ISOLADO DE *Schistosoma mansoni* OBTIDO DO  
ROEDOR SILVESTRE *Holochilus sciureus***



Belo Horizonte  
2022

GUILHERME SILVA MIRANDA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, GENÉTICA, PARASITOLÓGICA E  
IMUNOPATOLÓGICA DE UM ISOLADO DE *Schistosoma mansoni* OBTIDO DO  
ROEDOR SILVESTRE *Holochilus sciureus***

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa

**Área de concentração:** Helmintologia

Belo Horizonte  
2022

043 Miranda, Guilherme Silva.  
Caracterização morfológica, genética, parasitológica e imunopatológica de um isolado de *Schistosoma mansoni* obtido do roedor silvestre *Holochilus sciureus* [manuscrito] / Guilherme Silva Miranda. – 2022.  
233 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Parasitologia.

1. Parasitologia. 2. Esquistossomose. 3. Roedores. 4. Morbidade. 5. Resposta imune. 6. Perfil Genético. 7. *Biomphalaria*. I. Negrão-Corrêa, Deborah Aparecida. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576.88/.89



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PARASITOLOGIA

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, GENÉTICA, PARASITOLÓGICA E IMUNOPATOLÓGICA DE  
UM ISOLADO DE *Schistosoma mansoni* DO ROEDOR SILVESTRE *Holochilus sciureus***

**GUILHERME SILVA MIRANDA**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **06 de maio de 2022**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Doutores:

**Arnaldo Maldonado Junior**

IOC/FIOCRUZ-RJ

**Eduardo José Lopes Torres**

UERJ

**Stefan Michael Geiger**

UFMG

**Walter dos Santos Lima**

UFMG

**Deborah Aparecida Negrão-Corrêa -**

Orientadora UFMG

Belo Horizonte, 06 de  
maio de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Stefan Michael Geiger, Membro**, em 10/05/2022, às 08:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Deborah Aparecida Negrão Correa, Professora do Magistério Superior**, em 10/05/2022, às 10:08, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo José Lopes Torres, Usuário Externo**, em 10/05/2022, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Walter dos Santos Lima, Professor do Magistério Superior**, em 10/05/2022, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



Documento assinado eletronicamente por **Arnaldo Maldonado Junior, Usuário Externo**, em 13/05/2022, às 10:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

---



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1401647** e o código CRC **FD38AA0B**.

---

Referência: Processo nº 23072.223008/2022-18

**LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS:**

**ESQUISTOSSOMOSE E IMUNOHELMINTOLOGIA – ICB/UFMG**

Profa. Dra. Deborah Ap. Negrão-Corrêa

**HELMINTOS INTESTINAIS – ICB/UFMG**

Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

**HELMINTOLOGIA (ROMERO LASCASAS PORTO) – UERJ**

Prof. Dr. José Roberto Machado-Silva

Profa. Dra. Renata Heisler Neves

Profa. Dra. Luciana Brandão-Bezerra

**SAÚDE, MEIO AMBIENTE E SEGURANÇA – CTNANO/UFMG**

Prof. Dr. Ary Corrêa

**PARASITOLOGIA MOLECULAR – ICB/UFMG**

Profa. Dra. Élide Mara Leite Rabelo

Prof. Dr. Luís Fernando Viana Furtado

**TAXONOMIA E ECOLOGIA DE HELMINTOS – ICB/UFMG**

Prof. Dr. Felipe Pereira Bisaggio

**PARASITOLOGIA HUMANA – DQB/UEMA**

Prof. Dr. Néuton Silva-Souza

**APOIO FINANCEIRO:**

Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão  
(FAPEMA)

Fundação de Apoio à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG)

Projeto de Extensão - manutenção de *S. mansoni* em condições de laboratório

Dedico este trabalho a todos os animais, vertebrados e invertebrados, que doaram suas vidas para que importantes questões da ciência fossem descobertas e discutidas nesta tese, muito obrigado: *Holochilus sciureus*, camundongos, hamsters, *Biomphalaria* e *Schistosoma mansoni*.

## AGRADECIMENTOS

À Deus e a todas às formas espirituais que permeiam nosso universo, pela força concedida para que eu conseguisse suportar esse longo e desgastante processo de iniciar e concluir um doutorado.

Aos meus pais, Livramento Miranda e Edivan Miranda, que foram minha base desde o mestrado. Obrigado pelo incentivo contínuo, e por me mostrarem que o caminho da educação é a melhor forma de enfrentar a vida. Estive fora por muito tempo, mas agora estarei de volta com o título máximo nas mãos!

Aos meus irmãos, Camila Miranda e Bruno Miranda, à minha tia Erinilce Silva, à minha avó Salete Costa e a todos os meus familiares que estiveram junto a mim nessa caminhada, proferindo palavras de apoio, e por todas as orações. Pude sentir, mesmo à distância, todo o carinho.

À minha querida orientadora profa. Dra. Deborah Negrão-Corrêa, pela parceria ao longo desses seis anos em seu laboratório. Por ter acreditado no meu potencial e pelas conversas extra orientação sobre a vida. Se hoje me sinto capaz de liderar qualquer grupo de pesquisa no mundo relacionado à esquistossomose, foi por causa de seus ensinamentos. Obrigado! Espero um dia poder retribuir.

Ao prof. Dr. Nêuton Silva-Souza (UEMA) por ter me dado a primeira oportunidade de aprender sobre a esquistossomose e seus múltiplos aspectos. Graças a essa chance, pude concluir agora um doutorado em Parasitologia, estudando sobre o tema da minha primeira iniciação científica. Obrigado!!

Aos profs. Dr. José Roberto Machado-Silva (UERJ) e Dra. Renata Heisler Neves (UERJ) (meus ídolos desde a graduação!), e à Dra. Luciana Brandão (UERJ), pela oportunidade de aprender a confeccionar lâminas de *Schistosoma mansoni* e a identificar os caracteres morfológicos de suas formas evolutivas. Está gerando uma renda e tanto ao nosso laboratório! Além de dados incríveis para essa tese.

À profa. Dra. Élide Rabelo (UFMG) e ao prof. Dr. Fernando Furtado (UFMG) por terem topado essa colaboração de milhões, pela paciência de terem me ensinado a fazer PCR (que para mim era um bicho de 7 cabeças!) e analisar os resultados. Fernando, você foi essencial nessa etapa! É uma área muito linda, mas que muita coisa pode dar errado ao longo do processo (socorro!). Agradeço também à Dra. Andreina Carvalho, Ma. Talita Rodrigues e Dra. Celi Medeiros pelos momentos de descontração e por compartilharem dicas valiosas de como fazer o negócio funcionar (risos!). Andreina você é o raio da biologia molecular (linguagem maranhense)!!!

Obviamente que não poderia deixar de agradecer à Dra. Renata Peixoto do CT vacinas/UFMG por ter tanto zelo com minhas amostras enviadas ao sequenciamento e por sempre me receber com uma mensagem otimista de que tudo daria certo. Agradeço também ao Dr. Alex Fiorini (CT vacinas), que também sugeriu dicas valiosas para que os sequenciamentos ficassem perfeitos. Obrigado!

Ao prof. Dr. Felipe Bissagio (UFMG) por ter me mostrado e ensinando sobre o fascinante mundo pós-sequenciamento, as análises filogenéticas. Se existia vida após essa etapa do sequenciamento, eu realmente desconhecia (risos). Obrigado pela paciência, bom humor, palavras positivas e disponibilidade. Você foi a peça chave que faltava para o desenrolar dessa tese e para abrir minha mente para futuras novas ideias.

Ao prof. Dr. Stefan Geiger (UFMG), por toda boa vontade em ajudar (desde o mestrado!), disponibilizando a infraestrutura do seu laboratório para que eu pudesse realizar alguns experimentos. Agradeço também aos seus orientados, Me. Paulo Coelho e ao Me. Dharlton Soares, pelas conversas jogadas fora, pelas trocas de conhecimento, colaboração e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Ary Corrêa (UFMG) pelo belo espírito de “cientista maluco”, ideias geniais e olho clínico para a microscopia. Obrigado por ceder a infraestrutura do seu laboratório na Microbiologia/ICB e no CT nano/UFMG, principalmente para a realização das fotomicrografias. As imagens ficaram lindas! Valeu pelas caronas também (risos)!

Ao Admo Júnior da ArtGeo pelo belíssimo trabalho realizado na confecção do mapa de captura de *H. sciureus* no Maranhão, e pela paciência em ouvir todas as minhas observações e “TOCs” de posicionamento das fotos, espessura de linhas, cores, etc. (risos!).

Ao Laboratório de Imunohelmintologia (e agregados, rs), no qual passei boa parte do meu tempo nas companhias dos meus incríveis amigos e ajudantes de laboratório: Me. Jeferson Oliveira, Me. Genil Camelo, Me. Gustavo Rodrigues, Dra. Laura Maggi, Dra. Michelle Rezende, Dr. Vinicius Oliveira, Dra. Vanessa Rodrigues, Me. João Marcelo, Dra. Elis Paula, Dra. Fernanda Magalhães, Mariela Ribeiro, Cristiane Bernardo, Caio Gouveia, Larissa Costa e Mariana Pimentel. Obrigado pelos ensinamentos, conversas, risadas, momentos de descontração e apoio. Uma equipe unida e animada é difícil de encontrar, por isso vou levar pra sempre a alegria de poder ter tido a oportunidade de trabalhar com vocês. Desejo sucesso aos que continuam nessa jornada.

Queria agradecer especialmente e em um parágrafo exclusivo, ao meu companheiro da vida, Gustavo Rodrigues. Você transformava minhas ansiedades e inseguranças em leveza e paz de espírito. Obrigado por toda ajuda nos experimentos, ensinamentos sobre a vida e por caminhar ao meu lado, me apoiando sempre. Em breve estaremos juntos novamente e será sua vez de ser doutor! Obrigado <3

Aos funcionários: Zenir de Souza (*In memoriam*), Elizabeth Lacorte (Beth) e José Carlos dos Reis (Zé) pelo excelente e essencial serviço prestado ao nosso laboratório e às nossas pesquisas. Obrigado Zé, por ter me ensinando tudo sobre a rotina de manutenção de *S. mansoni* em laboratório e ter me ajudado a estabelecer os caramujos *B. glabrata* SB e a linhagem HS do parasito que trouxe do Maranhão (pense em uns bichos birrentos!).

Aos meus inesquecíveis amigos de Belo Horizonte: Dra. Danimar Lopez, Arthur Teixeira, Dra. Williane Siqueira, Davi Viegas (esse aqui é do Maranhão!), Ma. Carol Marinho, Dr. Diogo Tavares e Isabelle Siqueira, por todos os momentos que passamos juntos, as festas, os perrengues da vida adulta, os choros, as viagens, as partidas, as chegadas, as comidas gostosas, os drinks, as brigas, vôlei aos sábados... toda essa bagagem de humanidade e conhecimento sobre a vida, doutorado nenhum nos traz. Obrigado por me proporcionarem um dos melhores ciclos da minha vida, vou levar vocês comigo pra sempre!

Aos meus amigos do Fitdance: Danielle Costa (Dany, minha profa), Tays Carvalho, Dra. Luísa Vogt, Pamela Santos, Dr. Walber Junior, Igor Penaforte, Ma. Maira Lacerda e Sheila Silva, por terem me acolhido nesse espaço que eu nunca imaginei ser capaz de me sentir tão à vontade e feliz. Queria agradecer em especial a minha profa. Dany que abriu as portas da dança para mim, mesmo com toda minha timidez e falta de experiência. Desde então, foram três anos de parceria, de muitas coreografias e vídeos gravados. Se hoje penso em dar aulas de dança paralelas às minhas aulas no IFMA, foi graças a você! A dança foi minha válvula de escape do doutorado e sempre será minha paixão na vida. Muito obrigado!

Aos meus inseparáveis amigos da escola: Juliana Alves, Daniel Rodrigues, Letícia Serra, Luciana Santos, pela amizade de décadas. Obrigado pelos incentivos, risadas, rolês, e por sempre torcerem pelas minhas conquistas. Desejo que todos vocês tenham um imenso sucesso na vida. Não poderia esquecer os amigos dos amigos que vão chegando junto nessa dança da vida e que agora são meus amigos também, por isso agradeço à Jefther Felipe Rocha, Juan Neves, Adenauer Cordeiro, Ana Paula Vieira, Larissa Soares e Catarina Muniz pela amizade durante todos esses anos. Adoro vocês.

Aos meus fiéis companheiros de laboratório e de turma da Universidade Estadual do Maranhão: Dra. Gabriela Sampaio, Dra. Ranielly Nogueira, Dra. Lorrane Cantanhede, Dra. Fernanda Carvalho, Thiago Vinícius, Dra. Roberta Duarte, Dra. Irla Licá e Dra. Gleycka Gomes, pela parceria e amizade. Foram muitos perrengues na época de graduação (risos!) e hoje posso dizer que crescemos muito cientificamente durante todos esses anos. Mas ainda temos um mundo todo de oportunidades na nossa frente, e desejo que cada um de vocês também alcancem seus sonhos.

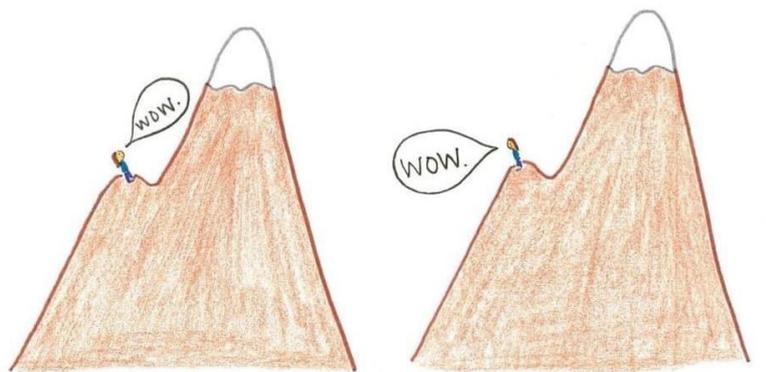
Às ilustres secretárias do Programa de Pós-Graduação em Parasitologia/ICB/UFMG, Sibebe Abreu e Sumara Guilherme, pela amizade e por toda paciência e auxílio em esclarecer minhas dúvidas e resolver questões burocráticas relacionadas ao diploma. Obrigado.

À coordenadora do Pós-Graduação em Parasitologia, Profa. Dra. Héliida Monteiro de Andrade, que além de uma professora sensacional, está atualmente à frente do programa, contribuindo para a continuidade da sua excelência.

Ao Instituto Federal do Maranhão (IFMA) pela oportunidade do afastamento integral para que eu pudesse cursar o doutorado na UFMG. Essa liberação foi essencial para o meu crescimento profissional e espero poder retribuir com todo o conhecimento e experiências que aprendi.

À FAPEMA que auxilia nas minhas pesquisas desde a graduação até agora no doutorado, por meio de bolsas e apoios financeiros concedidos por meio de diversos editais. Estou ansioso para retornar e contribuir com as pesquisas no Maranhão. Muito obrigado! Agradeço também à FAPEMIG e ao programa de extensão da UFMG, que muito contribuíram com o financiamento desse projeto.

Ufa, deu até sede! Será que acabou? De qualquer forma, eu finalizo agradecendo a todos que não mencionei (ou que esqueci, perdoem-me!), mas que contribuíram de forma direta ou indireta com esse trabalho. Obrigado!



“Always remember how far you've come”

@decadezdoodles

## RESUMO

O parasito *Schistosoma mansoni* é o agente etiológico da esquistossomose, uma doença parasitária que determina elevadas taxas de mortalidade e morbidade em humanos. Além do ser humano, algumas espécies de roedores silvestres também são susceptíveis ao parasito e as sucessivas infecções nesses animais podem favorecer a seleção de novas linhagens de *S. mansoni*, cujo impacto na morbidade, transmissão e controle da esquistossomose ainda é desconhecido. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi descrever o processo de isolamento da linhagem HS de *S. mansoni* obtida de roedores *Holochilus sciureus* naturalmente infectados, capturados no Maranhão, Brasil. Posteriormente, o presente estudo avaliou, de forma comparativa, aspectos morfológicos e genéticos do parasito isolado, além da cinética parasitária e da resposta imunopatológica induzida pelas linhagem HS e linhagem LE (originalmente isolada de humano) durante infecções experimentais em camundongos BALB/c e caramujos *Biomphalaria glabrata*. Para isolar o parasito, miracídios obtidos de fígados de *H. sciureus* foram utilizados para infectar *B. glabrata* de linhagens simpátrica (SB) e alopátrica (BH) e as cercárias produzidas foram usadas para a infecção dos hamsters e/ou camundongos BALB/c. Após isolamento, o perfil parasitológico da infecção nesses hospedeiros foi avaliado e as regiões 16S e *cox 1* de vermes obtidos desses modelos experimentais foram amplificadas e sequenciadas. Posteriormente, novas infecções foram realizadas em camundongos e *B. glabrata*, utilizando as linhagens HS e LE de *S. mansoni* para a avaliação comparativa de aspectos morfológicos e morfométricos de ovos eliminados nas fezes, miracídios, cercárias e vermes adultos. Para realizar avaliações parasitológicas e imunopatológicas da infecção pela linhagem HS de *S. mansoni* em BALB/c, grupos de camundongos infectados com 50 cercárias HS ou LE foram comparativamente avaliados durante a esquistossomose experimental aguda e crônica. Por fim, para investigar a interação entre *B. glabrata* e a linhagem HS de *S. mansoni*, grupos de caramujos infectados com 15 miracídios das linhagens HS ou LE foram comparativamente avaliados durante 91 dias de infecção. As nossas tentativas de isolamento demonstraram que apenas miracídios obtidos de camundongos infectados, mas não de hamsters, foram capazes de infectar *B. glabrata*, permitindo a manutenção do parasito em laboratório. As sequências genéticas obtidas de vermes adultos HS apresentaram 100% de similaridade com *S. mansoni*, e a análise filogenética mostrou que essa linhagem do parasito forma um grupo com outros isolados do Brasil, Porto Rico, Guadalupe e Quênia. Apesar dessa similaridade genética com outros isolados de *S. mansoni*, a linhagem HS apresentou particularidades biológicas: a infecção experimental de *B. glabrata* SB com *S. mansoni* HS resultou em dois picos de eliminação de cercárias, aos 45 e após 70 dias pós-infecção (dpi), e a taxa de recuperação de vermes em camundongos foi baixa, aproximadamente 13%. Além disso, as avaliações morfológicas comparativas demonstraram que os miracídios HS apresentaram menores dimensões corporais; entretanto, as cercárias HS foram maiores que as da linhagem LE. Adicionalmente, vermes adultos machos da linhagem HS apresentam maior número de tubérculos tegumentares na região anterior do corpo e as fêmeas uma menor área da espermateca e uma maior frequência de ovos no oótipo, quando comparado com a linhagem LE. Em camundongos BALB/c, verificamos que a infecção pela linhagem HS apresentou menor carga parasitária; entretanto, as fêmeas HS apresentaram maior fecundidade, quando comparado com as da linhagem LE. Além disso, a infecção pela linhagem HS resultou em menor concentração de IL-5, IL-10 e IL-13 e atividade de EPO no homogenato hepático, mas maiores concentrações de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-17 no homogenato do intestino delgado, quando comparado com a infecção pela linhagem LE. A infecção pela linhagem HS de *S. mansoni* também resultou em maiores concentrações de produtos finais de NO tecidual e induziu um aumento nos níveis de transaminases plasmáticas, formação de granulomas maiores e maior taxa de mortalidade. Em *B. glabrata*, verificamos que a infecção pela linhagem HS induziu uma maior taxa de infecção e um atraso na migração de esporocistos secundários (30–40 dpi) e eliminação de cercárias (77 dpi.), quando comparado com a linhagem LE. Além disso, *B. glabrata* infectado com a linhagem HS não teve alteração significativa no número de hemócitos circulantes em comparação aos caramujos não infectados, resultando em menor quantidade de células em relação aos caramujos infectados com a linhagem LE, aos 15 dpi. A infecção pela linhagem HS também resultou em uma redução da concentração de proteínas homólogas a TNF- $\alpha$  e IL-17 de humanos na hemolinfa e aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mieloperoxidase e arginase no tecido. Dessa forma, nossos dados demonstraram que os camundongos BALB/c e caramujos *B. glabrata* suportam a manutenção de *S. mansoni* isolado de *H. sciureus* em condições de laboratório. A partir desse conhecimento, foi possível caracterizar o perfil genético da linhagem HS e demonstrar que ela apresenta características morfológicas próprias e padrões parasitológicos e imunopatológicos diferenciados que podem favorecer sua transmissão e induzir maior gravidade da esquistossomose.

**Palavras-chave:** esquistossomose; *Holochilus sciureus*; morbidade; resposta imune; caracterização genética; reservatório silvestre; *Biomphalaria glabrata*.

## ABSTRACT

*Schistosoma mansoni* is the etiologic agent of schistosomiasis, a parasitic disease associated with high rates of mortality and morbidity in humans. In addition to humans, some species of wild rodents are also susceptible to this parasite and successive infections in these animals may favor the selection of new strains of *S. mansoni*, whose impact on morbidity, transmission and control of schistosomiasis is still unknown. Thus, this work aimed to describe the isolation process of *S. mansoni* obtained from naturally infected *Holochilus sciureus* rodents (HS strain), captured in Maranhão, Brazil. Subsequently, the present study comparatively evaluated morphological and genetic aspects of the isolated parasite, in addition to the parasitic kinetics and immunopathological response induced by the HS and the LE strain (originally isolated from humans) during experimental infections in BALB/c mice and *Biomphalaria glabrata* snails. To isolate the parasite, miracidia obtained from livers of *H. sciureus* were used to infect sympatric (SB) and allopatric (BH) strains of *B. glabrata*, and the cercariae produced were used to infect hamsters and/or BALB/c mice experimentally. After isolation, the parasitological profile of the HS strain infection in these hosts was evaluated and the 16S and *cox 1* genetic regions of worms obtained from these experimental models were amplified and sequenced. Subsequently, new infections were performed in mice and *B. glabrata*, using the HS and the LE strain of *S. mansoni* for the comparative evaluation of morphometric aspects of eggs eliminated in feces, miracidia, cercariae and adult worms. To assess the parasitological and immunopathological profile of *S. mansoni* HS strain infection in vertebrate hosts, groups of BALB/c mice were infected with 50 cercariae of HS or LE strain, and these animals were comparatively evaluated during acute and chronic experimental schistosomiasis. Finally, to investigate the interaction between *B. glabrata* and the HS strain of *S. mansoni*, groups of snails infected with 15 miracidia of the HS or LE strains were comparatively evaluated during 91 dpi. Our isolation attempts demonstrated that only miracidia obtained from infected mice, but not from hamsters, were able to infect *B. glabrata*, allowing the maintenance of the parasite in the laboratory. The sequences showed 100% similarity with *S. mansoni*, and the phylogenetic analysis demonstrated that the HS strain of the parasite forms a group with isolates from Brazil, Puerto Rico, Guadeloupe, and Kenya. Despite this genetic similarity with other *S. mansoni* isolates, the HS strain had biological peculiarities: experimental infection of *B. glabrata* SB with *S. mansoni* HS resulted in two peaks of cercariae shedding, at 45 and after 70 days post-infection (dpi), and the worm recovery rate in mice was very low, about of 13%. In addition, our comparative morphological evaluations showed that HS miracidia had smaller body dimensions; however, HS cercariae were larger than those of the LE strain. Additionally, adult male worms of the HS strain have a greater number of tegumental tubercles and the female worms have a smaller area of the spermatheca and a higher frequency of eggs in the ootype, compared to the LE strain. In BALB/c mice, we showed that the infection by the HS strain had a lower parasite burden; however, the HS females showed higher fecundity when compared to the LE strain. Moreover, mice infected with the HS strain showed reduced concentrations of IL-5, IL-10, and IL-13, and lower EPO activity in liver homogenate; but higher concentrations of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, and IL-17 in the small intestine homogenate, compared to the LE strain. *S. mansoni* HS strain infection also resulted in higher concentrations of NO end-products in tissues and induced an increase in plasma transaminase levels, formation of larger granulomas, and a higher mortality rate. In *B. glabrata* snails, we demonstrated that the infection by the HS strain had a higher rate of infection and a delay in secondary sporocyst migration (30–40 dpi) and cercariae shedding (77 dpi.), compared to LE strain. In addition, *B. glabrata* infected with the HS strain did not significantly change the number of circulating hemocytes compared to uninfected snails, resulting in a smaller number of cells compared to snails infected with the LE strain, at 15 dpi. Infection by the HS strain also resulted in a reduction in the concentration of proteins homologous to humans in the hemolymph, such as TNF- $\alpha$  and IL-17, and an increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, myeloperoxidase, and arginase in the tissue. Thus, our data demonstrate that BALB/c mice and *B. glabrata* snails support the maintenance of *S. mansoni* isolated from *H. sciureus* under laboratory conditions. Based on this knowledge, it was possible to characterize the genetic profile of the HS strain and demonstrate that this parasite strain has distinct morphological characteristics and differentiated parasitological and immunopathological patterns in vertebrate and invertebrate hosts, which may favor its transmission and induce greater severity of schistosomiasis.

**Keywords:** schistosomiasis; *Holochilus sciureus*; morbidity; immune response; genetic characterization; wild reservoir; *Biomphalaria glabrata*.

## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

<b>Figura 1.</b> Distribuição mundial das principais espécies de <i>Schistosoma</i> de importância médica .....	34
<b>Figura 2.</b> Distribuição geográfica das áreas de transmissão da infecção por <i>S. mansoni</i> e estimativa de prevalência da esquistossomose mansoni no Brasil, baseado nos dados do Inquérito de Prevalência da Esquistossomose e das Geo-helminthoses (2010 – 2015).....	35
<b>Figura 3.</b> Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	37
<b>Figura 4.</b> Ovo maduro de <i>Schistosoma mansoni</i> (à fresco) recuperado das fezes de camundongos BALB/c com 8 semanas de infecção, observado em microscopia de luz de campo claro .....	38
<b>Figura 5.</b> Estágios evolutivos de <i>Schistosoma mansoni</i> associados a <i>Biomphalaria</i> spp., observados em microscopia de luz de campo claro .....	39
<b>Figura 6.</b> Larva cercária de <i>Schistosoma mansoni</i> recuperada de <i>Biomphalaria glabrata</i> aos 50 dias de infecção, e suas divisões corporais, observados em microscopia de luz de campo claro .....	40
<b>Figura 7.</b> Esquistossômulo pulmonar (à fresco) de <i>Schistosoma mansoni</i> recuperado de camundongos BALB/c aos 6 dias de infecção, observados em microscopia de luz de campo claro .....	41
<b>Figura 8.</b> Vermes adultos macho e fêmea (acasalados) de <i>Schistosoma mansoni</i> recuperados do sistema circulatório de camundongos BALB/c com 8 semanas de infecção, observados em microscopia de luz de campo claro .....	42
<b>Figura 9.</b> Ativação de diferentes tipos celulares inatos e adaptativos e produção de suas moléculas microbidas e de comunicação, com ênfase nos diferentes perfis de citocinas produzidas por linfócitos durante a infecção primária por <i>Schistosoma mansoni</i> em modelo murino .....	43
<b>Figura 10.</b> Comparação da composição celular e perfil de deposição de matriz extracelular em granulomas do fígado e do intestino em fases iniciais e tardias de formação.....	48
<b>Figura 11.</b> Descrição dos componentes do sistema interno de defesa de <i>Biomphalaria glabrata</i> e mecanismos de ação frente à infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> , com ênfase nas funções efetoras das células de defesa circulantes na hemolinfa e nas respostas humorais que envolvem fatores solúveis presentes na hemolinfa acelular que participam no reconhecimento e destruição do patógeno e recrutamento e ativação de células .....	52

<b>Figura 12.</b> Hemócitos encontrados na hemolinfa de <i>Biomphalaria glabrata</i> .....	53
<b>Figura 13.</b> Interações entre espécies de <i>Schistosoma</i> que infectam humanos, animais de produção e roedores silvestres.....	61
<b>Figura 14.</b> Exemplares de <i>H. sciureus</i> capturados na cidade de São Bento e mantidos em laboratório .....	65
<b>Figura 15.</b> Localização geográfica (A-C) e características ecológicas da cidade São Bento, Baixada Ocidental Maranhense, Maranhão, Brasil (D) .....	66

## CAPÍTULO I

<b>Figura 16.</b> Áreas de amostragem de <i>Holochilus sciureus</i> , localizadas em região endêmica para esquistossomose intestinal, no Nordeste do Brasil.....	78
<b>Figura 17.</b> Delineamento experimental do capítulo I.....	88
<b>Figura 18.</b> Infecção natural de <i>Schistosoma</i> sp. em <i>Holochilus sciureus</i> capturados no Estado do Maranhão, Brasil .....	91
<b>Figura 19.</b> Árvores geradas por inferência Bayesiana de sequências de regiões genéticas de mtDNA 16S (A) e <i>cox1</i> (B) de Schistosomatidae.....	95
<b>Figura 20.</b> Matriz pairwise gerada entre as sequências de <i>Schistosoma</i> utilizadas neste estudo para a região 16S.....	96
<b>Figura 21.</b> Matriz pairwise gerada entre as sequências de <i>Schistosoma</i> utilizadas neste estudo para a região <i>cox1</i> .....	97
<b>Figura 22.</b> Parâmetro de infectividade da infecção experimental com <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem HS em <i>Biomphalaria glabrata</i> BH (linhagem alopátrica) e SB (linhagem simpátrica) .....	99
<b>Figura 23.</b> Taxa de mortalidade e carga parasitária em camundongos BALB/c.....	100

## CAPÍTULO II

<b>Figura 24.</b> Delineamento experimental do capítulo II .....	120
<b>Figura 25.</b> Morfologia de ovos e miracídios .....	115
<b>Figura 26.</b> Morfologia de cercárias .....	117
<b>Figura 27.</b> Morfologia de vermes adultos .....	121

### CAPÍTULO III

<b>Figura 28.</b> Delineamento experimental do capítulo III .....	132
<b>Figura 29</b> Subdivisão do fígado e intestino delgado .....	133
<b>Figura 30.</b> Resultado colorimétrico da presença de sangue oculto nas fezes (iFOBT, Labtest®) .....	140
<b>Figura 31.</b> Carga parasitária .....	144
<b>Figura 32.</b> Citocinas hepáticas .....	145
<b>Figura 33.</b> Histopatologia hepática .....	147
<b>Figura 34.</b> Infiltração e ativação celular hepática .....	149
<b>Figura 35.</b> Citocinas do intestino delgado .....	150
<b>Figura 36.</b> Histopatologia do intestino delgado .....	152
<b>Figura 37.</b> Infiltração e ativação celular intestinal .....	154
<b>Figura 38.</b> Gravidade da esquistossomose .....	156

### CAPÍTULO IV

<b>Figura 39.</b> Delineamento experimental do capítulo IV .....	168
<b>Figura 40.</b> Hemócitos circulantes.....	176
<b>Figura 41.</b> Concentração de proteínas homólogas a citocinas pró-inflamatórias de humanos na hemolinfa.....	178
<b>Figura 42.</b> Perfil bioquímico do tecido .....	179
<b>Figura 43.</b> Avaliação biológica .....	180
<b>Figura 44.</b> Resumo dos resultados obtidos.....	187

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

<b>Tabela I.</b> Sequências de nucleotídeos de diferentes espécies de <i>Schistosoma</i> obtidas do GenBank e utilizadas em reconstruções filogenéticas associadas a seus hospedeiros, origem geográfica, número de acesso e região genética 16S (rDNA).....	83
<b>Tabela II.</b> Sequências de nucleotídeos de diferentes espécies de <i>Schistosoma</i> obtidas do GenBank e utilizadas em reconstruções filogenéticas associadas a seus hospedeiros, origem geográfica, número de acesso e região genética <i>cox1</i> (mtDNA) .....	84
<b>Tabela III.</b> Modelos de evolução e seus parâmetros fixos, escolhidos de acordo com o critério de informação de Akaike usando o software jModelTest, para as reconstruções filogenéticas do presente estudo, associadas ao seu respectivo conjunto de dados.....	86
<b>Tabela IV.</b> Detalhamento do isolamento de uma linhagem de <i>Schistosoma</i> obtida do roedor <i>Holochilus sciureus</i> naturalmente infectado, capturado nos municípios de São Bento e Peri Mirim, Maranhão, Brasil, áreas endêmicas para esquistossomose .....	93
<b>Tabela V.</b> Número de vermes adultos recuperados do sistema circulatório e número de ovos retidos em diferentes órgãos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente pela linhagem HS de <i>Schistosoma mansoni</i> .....	101

### CAPÍTULO II

<b>Tabela VI.</b> Descrição comparativa das características morfométricas de ovos (n=45 por grupo) eliminados nas fezes de camundongos infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> da linhagem humana referência (LE) ou pela linhagem do roedor <i>Holochilus sciureus</i> (HS).....	113
<b>Tabela VII.</b> Descrição comparativa das características morfométricas de miracídeos (n=40 por grupo) de <i>Schistosoma mansoni</i> entre as linhagens humana referência (LE) e a do roedor <i>Holochilus sciureus</i> (HS). .....	114
<b>Tabela VIII.</b> Descrição comparativa das características morfométricas de cercárias (n=30 por grupo) de <i>Schistosoma mansoni</i> entre as linhagens humana referência (LE) e a do roedor <i>Holochilus sciureus</i> (HS). .....	116
<b>Tabela IX.</b> Descrição comparativa das características morfométricas de machos adultos (n=20 por grupo) de <i>Schistosoma mansoni</i> entre as linhagens humana referência (LE) e a do roedor <i>Holochilus sciureus</i> (HS) .....	118

**Tabela X.** Descrição comparativa das características morfométricas de fêmeas adultas (n=15 por grupo) de *Schistosoma mansoni* entre as linhagens humana referência (LE) e a do roedor *Holochilus sciureus* (HS) ..... 119

**Tabela XI.** Descrição comparativa das características morfológicas de vermes adultos machos (n=20 por grupo) e fêmeas (n=15 por grupo) de *Schistosoma mansoni* entre as linhagens humana referência (LE) e a do roedor *Holochilus sciureus* (HS) ..... 120

#### CAPÍTULO IV

**Tabela XII.** Taxa de infecção e quantidade de esporocistos secundários em migração na região cefalopodal e cercárias eliminadas em *Biomphalaria glabrata* infectado com a linhagem LE (referência humana) ou HS (*Holochilus sciureus*) ..... 175

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Grau Celsius	HS	Linhagem de <i>S. mansoni</i> isolada de <i>Holochilus sciureus</i>
µM	Micromolar	HSCs	Células hepáticas estreladas
AAMacs/M2	Macrófagos alternativamente ativados	HSPs	Proteínas de choque térmico
AFA	Álcool - formalina - ácido acético	HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
ANOVA	Análise de variância	ICB	Instituto de Ciências Biológicas
APCs	Células apresentadoras de antígenos	IFN-γ	Interferon-gama
APO	Órgão produtor de amebócito	Ig	Imunoglobulina
Arg-1	Gene arginase 1	IgSF	Domínios de imunoglobulina
BALB/c	Camundongo Bagg albino	IL	Interleucina
BgGRN	Granulina de <i>B. glabrata</i>	iNOS	Óxido nítrico sintase indutível
BgMIF	Fator de inibição de migração de macrófagos de <i>B. glabrata</i>	ITS	Espaçador interno transcrito
BgTLR	Toll-like receptors de <i>B. glabrata</i>	Kb	Kilobase
BH	Linhagem Belo Horizonte	KCl	Cloreto de potássio
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	kDa	Kilodaltons
BSA	Albumina sérica bovina	Kg	Kilograma
CAMs	Moléculas de adesão celular	KOH	Hidróxido de potássio
CCL	Ligante de quimiocina	L	Litros
CCR	Receptor de quimiocina	LCs	Células de Langerhans
Cm	Centímetro	LE	Linhagem de <i>S. mansoni</i> isolada de humano
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono	liso-OS	Lisofosfatidilserina
cox1	Citocromo c oxidase subunidade 1	LNFPII	Lacto-N-fucopentose III
CREPs	Proteína relacionada à lectina tipo C	LTPs	Produtos de transformação larval
CXCL	Quimiocina de motivo C-X-C	M1	Macrófago classicamente ativado
DCs	Células dendríticas	MAPPK	Proteína-quinases ativadas por mitógeno
DMSO	Dimetilsulfóxido	Mg	Miligrama
DNA	Ácido desoxirribonucleico	MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfatos	mL	Mililitro
EPO	Peroxidase de eosinófilos	mM	Milimolar
ES	Excretado/secretado	mm <sup>3</sup>	Milímetro cúbico
FBG	Domínio de fibrinogênio	MPO	Mieloperoxidase
FREPs	Proteínas relacionadas ao fibrinogênio	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Fosfato dissódico
g/dL	Gramas/decilitro	Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato trissódico
G6PD	Glicose-6-fosfato desidrogenase	NaCl	Cloreto de sódio
H <sub>2</sub> O	Água	NAG	N-acetil-β-D-glucosaminidase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio	NaNO <sub>2</sub>	Nitrito
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido sulfúrico	NaOH	Hidróxido de sódio
HPJ	Técnica de sedimentação espontânea	NK	Células Natural Killer
nm	Nanômetros	WHO	World Health Organization
NO	Óxido nítrico	α-1	Antígeno IPSE/alfa 1
OPD	o-fenilenodiamina	β-PFT	Toxinas formados de poros β
p.i.	Pós-infecção	µL	Micro litro
PBS	Tampão fosfato	ω-1	Antígeno ômega 1
pg	Picograma		
PGD2	Prostagladina D2		
PGE2	Prostaglandina 2		

<b>PGM</b>	Fosfoglucomutase
<b>PGRPs</b>	Proteínas de reconhecimento de peptidoglicanos
<b>pH</b>	Potencial hidrogeniônico
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol-3-cinase
<b>PMNs</b>	Células polimorfonucleares
<b>PRRs</b>	Receptores de reconhecimento de padrões
<b>PZQ</b>	Praziquantel
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>SB</b>	Linhagem de São Bento
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SEA</b>	Antígenos solúveis de ovo
<b>SID</b>	Sistema interno de defesa
<b>SISBIO</b>	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
<b>SISGEN</b>	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
<b>SmPoMuc</b>	Mucinas polimórficas
<b>TAE</b>	Tris-Acetato-EDTA
<b>TCD4+</b>	Linfócitos T auxiliares/helper
<b>TCD8+</b>	Linfócitos T citotóxicos
<b>TEPs</b>	Proteínas contendo tioéster
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento tumoral-beta
<b>Th</b>	Células T helper
<b>TMB</b>	Tetrametilbenzidina
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral-alfa
<b>Treg</b>	Células T regulatórias

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>26</b>
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>32</b>
2.1 Distribuição mundial das principais espécies do gênero <i>Schistosoma</i> .....	33
2.2 Cenário epidemiológico da esquistossomose mansoni no Brasil .....	34
2.3 Biologia e morfologia de <i>S. mansoni</i> .....	37
2.4 Interação <i>S. mansoni</i> e hospedeiro vertebrado: resposta imune e patologia .....	43
2.5 Interação <i>S. mansoni</i> e <i>Biomphalaria</i> spp.: resposta imune e compatibilidade .....	51
2.6 Interação entre as espécies de <i>Schistosoma</i> de humanos e as de animais silvestres ou de criação: a ascensão dos híbridos.....	58
2.7 O papel de roedores silvestres no contexto da esquistossomose mansoni: evidências do surgimento de novas linhagens .....	63
<b>3. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>69</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>72</b>
4.1 Geral .....	73
4.2 Específicos.....	73

### CAPÍTULO I: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARASITOLÓGICA E GENÉTICA DO ISOLADO HS DE *Schistosoma mansoni* OBTIDA DE ROEDORES *Holochilus sciureus* NATURALMENTE INFECTADOS

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>77</b>
2.1 Capturas de <i>H. sciureus</i> .....	77
2.2 Obtenção dos miracídios .....	78
2.3 Processo de isolamento em caramujos .....	79
2.4 Processo de isolamento em camundongos e hamsters.....	80
2.5 Extração de DNA, PCR e sequenciamento .....	81
2.6 Análise filogenética .....	82
2.7 Perfil parasitológico da linhagem HS de <i>S. mansoni</i> em condições de laboratório .....	86
2.8 Delineamento experimental.....	87

2.9 Mortalidade e produção cercária em <i>B. glabrata</i> .....	88
2.10 Mortalidade e carga parasitária em camundongos BALB/c .....	89
2.11 Análise estatística .....	90
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>90</b>
3.1 Isolamento de <i>Schistosoma</i> spp. a partir de <i>H. sciureus</i> naturalmente infectado .....	90
3.2 Caracterização genética e análises filogenéticas .....	94
3.3 Interação parasito-hospedeiro entre <i>S. mansoni</i> HS e <i>B. glabrata</i> .....	98
3.4 Interação parasito-hospedeiro entre <i>S. mansoni</i> HS e camundongos BALB/c .....	100
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>101</b>
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>105</b>

**CAPÍTULO II: ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ISOLADO HS DE *Schistosoma mansoni* COMPARADO COM A LINHAGEM LE HUMANA REFERÊNCIA**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>107</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>108</b>
2.1 Linhagens de <i>S. mansoni</i> e infecção dos modelos experimentais .....	108
2.2 Delineamento experimental .....	109
2.3 Coloração e montagem de lâminas de cercárias, ovos, vermes adultos e miracídeos .....	110
2.4 Caracteres morfológicos avaliados .....	112
2.5 Análise estatística .....	113
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>113</b>
3.1 Miracídeos, cercárias e vermes adultos da linhagem HS apresentam diferenças morfométricas e morfológicas.....	113
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>121</b>
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>126</b>

**CAPÍTULO III: ASPECTOS PARASITOLÓGICOS E IMUNOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO ISOLADO HS DE *Schistosoma mansoni* COMPARADO COM A LINHAGEM LE HUMANA REFERÊNCIA EM CAMUNDONGOS BALB/c**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>128</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>130</b>
2.1 Linhagens de <i>S. mansoni</i> e infecção dos camundongos .....	130
2.2 Delineamento experimental .....	130
2.3 Avaliação clínica .....	134
2.3.1 Ganho de peso e mortalidade .....	134
2.3.2 Hemograma .....	134
2.4 Carga parasitária .....	134
2.5 Resposta imunológica .....	134
2.5.1 Perfil de citocinas teciduais .....	134
2.5.2 Quantificação indireta do infiltrado tecidual de eosinófilos .....	136
2.5.3 Quantificação indireta do infiltrado tecidual de neutrófilos .....	136
2.5.4 Quantificação indireta do infiltrado tecidual de macrófagos .....	137
2.5.5 Quantificação da atividade de arginase .....	138
2.5.6 Quantificação indireta da produção de óxido nítrico .....	138
2.6 Avaliação patológica hepática e intestinal .....	139
2.6.1 Quantificação indireta de lesão hepática .....	139
2.6.2 Avaliação indireta de lesão intestinal .....	139
2.6.3 Quantificação indireta de fibrose .....	140
2.6.4 Mensuração dos granulomas .....	141
2.7 Análise estatística .....	142
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>142</b>
3.1 Carga parasitária .....	142
3.2 Resposta imunológica hepática .....	144
3.2.1 Perfil de citocinas Th1/Th2/Th17/Treg .....	144
3.2.2 Mensuração dos granulomas e dos níveis de hidroxiprolina .....	146
3.2.3 Infiltrado e ativação celular tecidual de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos .....	148
3.4 Resposta imunológica intestinal .....	149
3.4.1 Perfil de citocinas Th1/Th2/Th17/Treg .....	149
3.4.2 Mensuração dos granulomas e dos níveis de hidroxiprolina .....	150
3.4.3 Infiltrado e ativação celular tecidual de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos .....	153
3.5 Sinais clínicos de morbidade da esquistossomose .....	154
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>157</b>
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>162</b>

**CAPÍTULO IV: ASPECTOS BIOLÓGICOS, PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA  
INFECÇÃO PELO ISOLADO HS DE *Schistosoma mansoni* EM *Biomphalaria glabrata*  
COMPARADO COM UMA LINHAGEM HUMANA REFERÊNCIA (LE)**

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>164</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>166</b>
2.1 Linhagens de <i>S. mansoni</i> e infecção dos caramujos .....	166
2.2 Delineamento experimental .....	166
2.3 Aspectos biológicos .....	169
2.3.1 Sobrevivência e fecundidade .....	169
2.4 Aspectos parasitológicos .....	169
2.4.1 Recuperação e quantificação de esporocistos secundários .....	169
2.4.2 Quantificação de cercárias .....	170
2.5 Aspectos imunológicos .....	170
2.5.1 Quantificação e diferenciação de hemócitos .....	170
2.5.2 Avaliação dos níveis de proteínas semelhante a citocinas de humanos na fração acelular da hemolinfa .....	171
2.5.3 Avaliação dos níveis de N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG) .....	171
2.5.4 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) ..	171
2.5.5 Avaliação da atividade de arginase e mieloperoxidase (MPO) .....	172
2.6 Análise estatística .....	173
<b>3. RESULTADOS</b> .....	<b>173</b>
3.1 Susceptibilidade e carga parasitária .....	173
3.2 Padrão de hemócitos circulantes .....	175
3.3 Perfil de proteínas semelhantes a citocinas humanas na fração acelular da hemolinfa .....	177
3.4 Perfil bioquímico tecidual .....	178
3.5 Parâmetros biológicos .....	179
<b>4. DISCUSSÃO</b> .....	<b>181</b>
<b>5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS</b> .....	<b>185</b>
<b>6. CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>186</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>188</b>

<b>ANEXOS .....</b>	<b>225</b>
<b>ANEXO A – Aprovação e registro da pesquisa no SISBIO .....</b>	<b>226</b>
<b>ANEXO B – Aprovação e registro da pesquisa no SISGEN.....</b>	<b>227</b>
<b>ANEXO C – Aprovação da pesquisa no Conselho de Ética Animal .....</b>	<b>228</b>
<b>APÊNDICES.....</b>	<b>229</b>
<b>APÊNDICE A – Produção científica durante o doutorado (2018–2022) .....</b>	<b>230</b>

## ***1.Introdução geral***

---

A esquistossomose humana é uma doença causada por trematódeos parasitos de vasos sanguíneos pertencentes ao gênero *Schistosoma*, que possui grande relevância para a saúde pública mundial devido à elevada morbidade e gravidade decorrentes da infecção (GRYSEELS et al., 2006; McMANUS et al., 2018). A espécie *S. mansoni* é considerada um dos principais agentes etiológicos dessa parasitose, que afeta aproximadamente 250 milhões de pessoas em todo mundo, principalmente em áreas endêmicas localizadas na África, Ásia e América Latina (GRYSEELS et al., 2006; STEINMANN et al., 2006; HOTEZ et al., 2014; WEERAKOON et al., 2015; WHO, 2015).

O ciclo de vida de *S. mansoni* é do tipo heteroxeno, o qual envolve duas fases de reprodução em diferentes hospedeiros: uma assexuada em caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria* (hospedeiro invertebrado) e uma sexuada que ocorre principalmente em seres humanos (hospedeiro vertebrado) (KATZ; ALMEIDA, 2003; LOVERDE, 2019). Entretanto, outros mamíferos como roedores silvestres já foram encontrados naturalmente infectados por *S. mansoni* em áreas endêmicas da África, Caribe e Brasil (THÉRON et al., 1992; REY, 1993; DUPLANTIER; SÈNE, 2000; HANELT et al., 2010; MIRANDA et al., 2017; CATALANO et al., 2018), o que pode impactar diretamente nas taxas de transmissão da esquistossomose, contribuindo para manter a endemicidade desta parasitose mesmo após sucessivos programas de tratamento da população humana. Além disto, a presença destes diferentes hospedeiros pode favorecer a formação de novas linhagens do parasito.

A carga parasitária associada a resposta imune dos hospedeiros influencia diretamente na patologia da doença em humanos (DE JESUS et al., 2002; ABATH et al., 2006; COLLEY; SECOR, 2014), como também ditam o sucesso ou o fracasso da infecção em *Biomphalaria* spp. (LOCKYE et al., 2004; COUSTAU; THÉRON, 2004; PILA et al., 2017), e diferentes linhagens de *S. mansoni* podem alterar essa dinâmica da interação parasito-hospedeiro. Especificamente em hospedeiros vertebrados, é bem conhecido que o curso da infecção provocada por *S. mansoni* induz respostas imunes mediadas principalmente por células TCD4<sup>+</sup> (T helper) e seus subtipos, a depender da fase da infecção (PEARCE; MACDONALD, 2002; DUNNE; COOKE, 2005; GRYSEELS et al., 2006). A resposta imune durante a fase aguda pré-postural é predominantemente do tipo 1 e está associada ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como, interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-12, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), que estimulam a ativação clássica de macrófagos (M1) (COULSON et al., 1998; PEARCE; MACDONALD, 2002; DUNNE; COOKE, 2005; COLLEY; SECOR, 2014). Entretanto, após o início da ovipostura (fase aguda postural), os antígenos solúveis presentes no ovo (SEA) do parasito são um dos principais responsáveis por estimularem a

polarização da resposta imune para um perfil predominante do tipo 2, que está associado ao aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, aumento de eosinofilia e diferenciação de macrófagos alternativamente ativados (M2) (CHEEVER; HOFFMANN; WYNN, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002; PEARCE et al., 2004; BURKE et al., 2009). Esse tipo de resposta é capaz de balancear o perfil imune pró-inflamatória das fases iniciais e é responsável pela formação dos granulomas teciduais (BRUNET et al., 1997; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013).

Os granulomas são estruturas multicelulares altamente organizadas e compostas por uma variedade de células como Th2 (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), macrófagos, eosinófilos, mastócito, além de um envolvimento adicional de miofibroblastos (FALLON et al., 1998; HERBERT et al., 2004; BARRON; WYNN, 2011a, b; FU; ODEGAARD; HSIEH, 2015; COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018). Os granulomas são essenciais para conter a lesão tecidual provocada pelas substâncias líticas excreto-secretadas pelo ovo do parasito em desenvolvimento; entretanto, se não for bem modulado pela resposta imune do hospedeiro, esses granulomas evoluem progressivamente para depósitos de fibrose, principalmente na região periportal do fígado, sendo responsáveis pela patologia grave da doença (LENZI et al. 1998; CHEEVER; HOFFMANN; WYNN, 2000; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013; SCHWARTZ; FALLON, 2018). A evolução para um prognóstico benigno em hospedeiros vertebrados durante a fase crônica da infecção, depende de uma resposta imune regulatória capaz de modular adequadamente as respostas do tipo 1 e 2, principalmente via IL-10, minimizando a severidade da doença, uma vez que reduz a resposta inflamatória, o tamanho do granuloma e a formação de fibrose (HESSE et al., 2004; LUNDY; LUKACS, 2013; BOOTH et al., 2004). A produção da citocina IL-10 também é induzida pelo parasito para favorecer sua sobrevivência, uma vez que o perfil regulatório inibe mecanismos imunes que atuam no controle do parasito (HESSE et al., 2004). Dessa forma, a severidade da esquistossomose está associada diretamente ao equilíbrio entre o papel protetor e a intensidade da inflamação e fibrose induzidas pelo processo de formação dos granulomas, e diferentes linhagens do parasito podem alterar o equilíbrio da resposta imune e afetar a gravidade da esquistossomose.

Além do desenvolvimento em hospedeiros vertebrados, o parasito *S. mansoni* necessita interagir com moluscos do gênero *Biomphalaria* para completar seu ciclo de vida. Apesar de serem mais basais na escala evolutiva quando comparado com os mamíferos, *Biomphalaria* possui um arsenal de células e moléculas solúveis na hemolinfa capazes de destruir eficazmente as fases intramolusco de *S. mansoni* (LOKER et al., 2004; NEGRÃO-CORREA et al., 2012; PILA et al., 2017). O processo de ativação dessa resposta imune inata nesses caramujos ocorre inicialmente

pelo estímulo da penetração dos miracídios nos tecidos moles, associado a liberação de antígenos de transformação larval e os seus produtos secretados/excretados (LODES; YOSHINO, 1990; SULLIVAN; PIKIOS; ALONZO, 2004; NEGRÃO-CORREA et al., 2012; CASTILLO et al., 2020). Em infecções primárias, a primeira linha de defesa do sistema interno de *Biomphalaria* é composta principalmente por células denominadas de hemócitos, que são classificados em dois morfotipos básicos: granulócito e hialinócito (MARTINS-SOUZA et al., 2009; NEGRÃO-CORREA et al., 2012; ATAEV; KUDRYAVTSEV; POLEVSHCHIKOV, 2016). Essa interação entre parasito e célula ocorre via padrões de reconhecimentos, sendo que os mais conhecidos são os receptores do tipo “toll” (*Toll-Like Receptors* - TLR) e as lectinas (MARTINS-SOUSA et al., 2006; PEREIRA et al., 2008; PILA et al., 2016b, HUMPHRIES; DENECKER, 2018). Após reconhecimento e ativação, as células efectoras (principalmente os granulócitos) produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), que são capazes de destruir o parasito (HAHN; BENDER; BAYNE, 2001a, b; BENDER et al., 2005). Essa ação recebe um *feedback* positivo via atração de mais células para o local de penetração do parasito, processo que é orquestrado pela produção de mediadores inflamatórios como BgMIF, proteína homóloga ao fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) de mamíferos e que é produzida pelos hemócitos ativados (BAEZA GARCIA et al., 2010). Além disso, outras proteínas funcionalmente homólogas às citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-17 de mamíferos, já tiveram suas participações descritas no sistema interno de defesa de *B. glabrata* contra *S. mansoni* (OUWE-MISSI-OUKEM-BOYER et al., 1994; GRANATH Jr, CONNORS; TARLETON, 1994; ZHANG et al., 2015; ADEMA et al., 2017; CASTILLO et al., 2020); entretanto, seus verdadeiros papéis na imunidade inata de *Biomphalaria* ainda não foram totalmente definidos.

Além do envolvimento de células no processo de defesa interna de *B. glabrata*, elementos solúveis presente na hemolinfa também são capazes de montar uma resposta efetiva contra *S. mansoni* sem a necessidade de encapsulamento celular, principalmente em infecções secundárias (SIRE; ROGNON; THÉRON, 1998; PINAUD et al., 2016). Esse tipo de resposta imune humoral compreende proteínas capazes de lesar diretamente o parasito, que incluem àquelas pertencentes à família de toxinas formadoras de poros  $\beta$  ( $\beta$ -PFT) semelhante à de bactérias, denominadas de Biomphalisina e Glabralisina (GALINIER et al., 2013; LASSALLE et al., 2020), e as que facilitam o reconhecimento do parasito, como as proteínas denominadas de TEPs (Thioester-containing Proteins) e FREPs (Fibrinogen-related Proteins) (HANINGTON; ZHANG, 2011; PORTET et al., 2018). Estudos recentes demonstram que a ação dessas proteínas não ocorre de modo isolado, mas de uma maneira muito efetiva e coordenada a partir da interação entre si e com os hemócitos, favorecendo a destruição dos esporocistos de *S. mansoni* (LI et al., 2020). Assim, o padrão de

compatibilidade entre hospedeiro invertebrado e *S. mansoni* dependem, dentre outros fatores, de uma combinação de eventos imunológicos induzidos por uma composição antigênica variada atribuída a diferentes cepas de *S. mansoni*, denominadas de mucinas polimórficas (SmPoMuc) (ROGER et al., 2008a, b). Nesse sentido, entender as bases imunológicas associadas à interação de diferentes linhagens de *S. mansoni* com seus hospedeiros intermediários, permitem elucidar os diferentes padrões de transmissão do parasito e constituem novas abordagens de controle da esquistossomose.

Embora *S. mansoni* seja primariamente um parasito de humanos, outros primatas (NELSON, 1960; STANDLEY et al., 2011), bovinos (BARBOSA; BARBOSA; ARRUDA, 1962; MODENA et al., 2008) e algumas espécies de roedores já foram encontrados naturalmente infectados por esse parasito (THÉRON et al., 1992; REY, 1993; ALARCÓN DE NOYA et al., 1997; HANELT et al., 2010; MIRANDA et al., 2017; CATALANO et al., 2018). No Brasil, os roedores das espécies *Nectomys squamipes* e *Holochilus sciureus* são considerados os principais reservatórios de *S. mansoni*, pois apresentam alta suscetibilidade e persistência da infecção (SOUZA et al. 1992, MALDONADO et al. 1994; SILVA-SOUZA; VASCONCELOS, 2005; MARTINEZ et al., 2008; MIRANDA et al., 2019), eliminam grande quantidade de ovos viáveis nas fezes (PIVA; RUBENS; BARROS, 1966; DIAS et al., 1978; PICOT, 1992; SOUZA et al., 1992; MIRANDA et al., 2019), e não desenvolvem morbidade severa quando infectados naturalmente ou experimentalmente (SILVA; ANDRADE 1989; COSTA NETO et al., 2013; MIRANDA et al., 2019).

Diversos autores propõem que a participação de animais silvestres, principalmente roedores, na transmissão de *S. mansoni* propicia a interação genética entre diversas espécies do parasito, favorecendo o surgimento de híbridos e novos genótipos (LEGER; WEBSTER, 2017; COLLEY; LOKER, 2018; CATALANO et al., 2020), o que representa um novo desafio em termos de controle da transmissão e redução da morbidade da esquistossomose, uma vez que novas variantes e híbridos do parasito podem apresentar ganhos em adaptabilidade e virulência (D'ANDREA et al., 2000; LEGER; WEBSTER, 2017). Particularmente, a presença de híbridos de *Schistosoma* pode impactar em várias características fenotípicas do parasito, como maior fecundidade, causar maior patologia e pode ser capaz de infectar ambos os hospedeiros intermediários das espécies parentais, ampliando sua área de transmissão (LEGER; WEBSTER, 2017). Para *S. mansoni*, a única possibilidade de hibridização efetiva descrita até o momento com espécies de *Schistosoma* próprias de roedores silvestres, foi com a espécie *S. rodhaini* (MORGAN et al., 2003; STEINAUER et al., 2008). Entretanto, apesar do Brasil apresentar diversos relatos de infecção natural por *S. mansoni* em roedores silvestres, poucos estudos avaliaram mais

detalhadamente espécies de *Schistosoma* isoladas de roedores e de humanos que residem na mesma região.

Além dos híbridos, novos genótipos e linhagens da espécie *S. mansoni* também podem surgir a partir das sucessivas infecções e processos de adaptação aos animais silvestres. Estudos moleculares com populações de *S. mansoni* coletados em roedores naturalmente infectados da espécie *Rattus rattus* em Guadalupe (ilha do Caribe), demonstram que existem múltiplos genótipos circulando nesses animais (BARRAL et al., 1996; SIRE et al., 1999), assim como em roedores capturados em áreas endêmicas na África (CATALANO et al., 2020). A existência de linhagens de *S. mansoni* próprias de roedores silvestres no Brasil também foram sugeridas, a partir de dados morfológicos de vermes adultos (MACHADO-SILVA et al., 1994), compatibilidade e virulência em caramujos *Biomphalaria* (BASTOS et al., 1982), sensibilidade a drogas (COSTA-SILVA et al., 2012), e de estudos preliminares relacionados a variações antigênicas de parasitos isolados de roedores silvestres (CARNEIRO et al., 1991). Entretanto, essas diferenças encontradas nesses trabalhos prévios não são totalmente elucidativas e o verdadeiro impacto de possíveis novas linhagens de *S. mansoni* na transmissão e patologia da esquistossomose ainda é desconhecido.

Dessa forma, este estudo tem por objetivo realizar uma caracterização detalhada do processo de isolamento da linhagem de *S. mansoni* obtida do roedor *H. sciureus* (*S. mansoni* linhagem HS), sua adaptação a infecções experimentais em animais de laboratório, bem como avaliar comparativamente aspectos morfológicos, genéticos, parasitológicos e imunopatológicos decorrentes da infecção por *S. mansoni* da linhagem HS e da linhagem LE (originalmente isolada de paciente infectado) em camundongos BALB/c e caramujos *B. glabrata* como modelos experimentais. Os dados obtidos a partir dessas avaliações nos permitirá melhor entender como a linhagem HS de *S. mansoni* utiliza seus hospedeiros para favorecer sua transmissão e o seu possível impacto na severidade da esquistossomose na população humana exposta à essa linhagem do parasito.

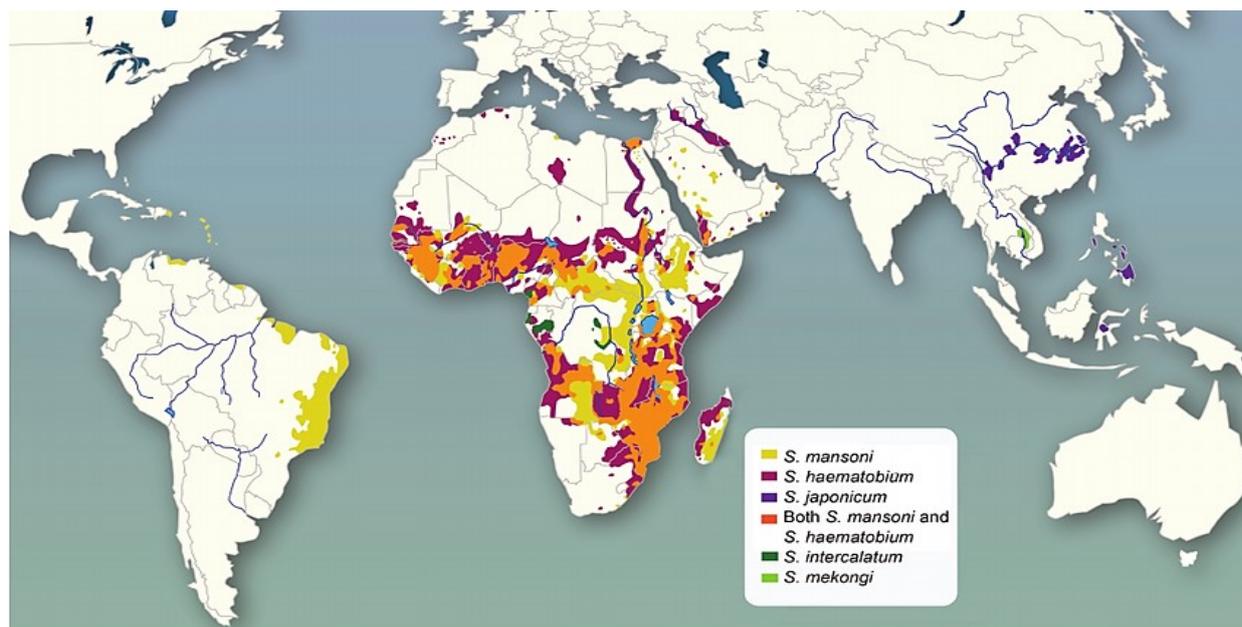
## ***2. Referencial Teórico***

---

## 2.1 Distribuição mundial das principais espécies do gênero *Schistosoma* Weiland, 1858

A esquistossomose é uma doença parasitária de grande relevância mundial, sendo causada por helmintos que parasitam vasos sanguíneos de mamíferos que pertencem ao filo Platyhelminthes Gegenbauer 1859, classe Trematoda Rudolphi 1808, família Schistosomatidae Stiles & Hassal 1898, e gênero *Schistosoma* Weiland, 1858. Ao todo, sete espécies são consideradas de interesse médico devido à capacidade de infectar o ser humano, sendo que a transmissão destas espécies de *Schistosoma* está associada a diferentes regiões endêmicas, com possibilidades de sobreposição em suas áreas de ocorrência. Entre as espécies de *Schistosoma* responsáveis por patologias hepato-intestinais destacam-se: *S. mansoni* Sambon, 1907, com transmissão na África e Américas e *S. japonicum* Katsurada, 1904, encontrado no Extremo Oriente. Também parasitando os ramos mesentéricos do intestino, porém com baixas prevalências e com transmissão limitada a pequenas regiões, destacam-se as espécies: *S. mekongi* Voge, Brickner & Bruce 1978, encontrada no Sudeste asiático; *S. intercalatum* Fischer, 1934 e *S. guineensis* Pages, Jourdane, Southgate & Tchuem, 2003, encontradas na África Ocidental e Central; e *S. malayensis* Greer, Ow-Yang & Yong, 1988 (anteriormente designada por *S. japonicum*), encontrado em pequenos focos de transmissão na Malásia. A única espécie causadora de patologia primariamente genito-urinária é *S. haematobium* (Bilharz, 1852), comum na África e Oriente Médio (**Figura 1**) (GRYSEELS et al., 2006; GRYSEELS, 2012; LATIF et al., 2013; COLLEY et al., 2014; McMANUS et al., 2018). Entretanto, em 2013, esta espécie foi responsável por um surto de infecção em banhistas na ilha de Córsega, França (BOISSIER et al., 2016).

Estima-se que aproximadamente 250 milhões de pessoas estejam contaminadas por espécies de *Schistosoma* e que 700-800 milhões permaneçam em risco iminente de contrair a doença, pois residem em áreas endêmicas situadas principalmente nos países em desenvolvimento localizados na África, Ásia e América Latina (GRYSEELS et al., 2006; STEINMANN et al., 2006; HOTEZ et al., 2014; WHO, 2015; WEERAKOON et al., 2015). As infecções ocasionadas pelos trematódeos do gênero *Schistosoma* já foram notificadas em 78 países, sendo que em 19 deles não se tem constatado notificações de casos recentes, o que pode indicar a interrupção da transmissão do parasito (WHO, 2012; WEERAKOON et al., 2015). No entanto, ainda se contabilizam cerca de 200-280 mil óbitos a cada ano (VAN DER WERF et al., 2003; STEINMANN et al., 2006) devido ao parasitismo e suas complicações, fazendo com que essa parasitose continue sendo de grande relevância para a saúde pública (VAN DER WERF et al., 2003).



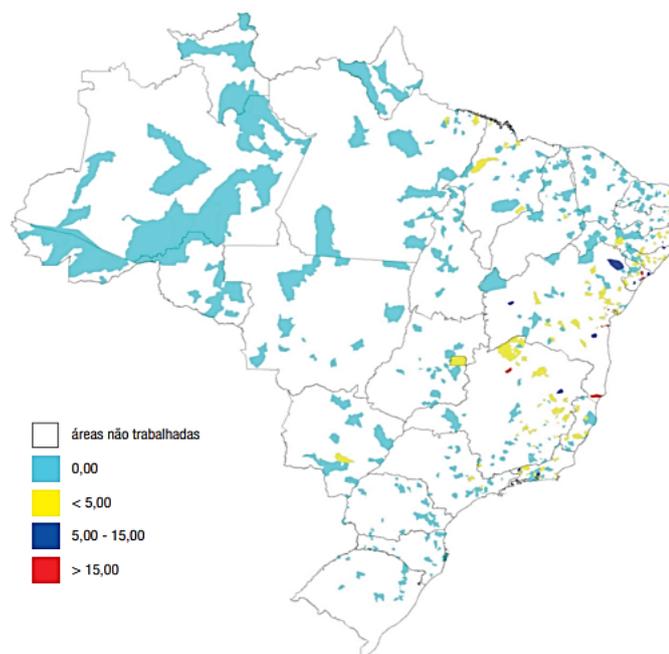
**Figura 1. Distribuição mundial das principais espécies de *Schistosoma* de importância médica.** As áreas de transmissão de esquistossomose nas Américas são determinadas exclusivamente pela espécie *S. mansoni*. No extremo Oriente, a infecção é ocasionada principalmente por *S. japonicum*, embora pequenos focos de transmissão de *S. mekongi* também sejam observados. No Oriente médio, *S. mansoni* e *S. haematobium* são co-endêmicas. Com exceção de *S. japonicum* e *S. mekongi*, todas as outras espécies de interesse médico são endêmicas na África, determinando diversas áreas de sobreposição entre elas. **Fonte:** Weerakoon et al. (2015).

## 2.2 Cenário epidemiológico da esquistossomose mansoni no Brasil

De acordo com estudos filogenéticos (MORGAN et al., 2005; WEBSTER et al., 2013a; CRELLEN et al., 2016), a chegada de *S. mansoni* nas Américas ocorreu entre séculos XI e XIX, período em que houve uma intensa imigração de escravos, possivelmente infectados, trazidos da África. Atualmente, os dados do Inquérito de Prevalência da Esquistossomose no Brasil apontam valores em torno de 0,99%, o que representa mais de 1,5 milhões de pessoas na população brasileira (KATZ, 2018) (**Figura 2**); entretanto, é bem provável que esse número seja subestimado devido à estreita faixa etária investigada neste inquérito e a baixa carga parasitária da maioria dos indivíduos que vivem em áreas endêmicas do Brasil, o que dificulta o diagnóstico por meio de exame de fezes com a técnica de Kato-Katz (utilizada no levantamento) (COLLEY DG, ANDROS TS, CAMPBELL, 2017; OLIVEIRA et al., 2018). Em relação à mortalidade, os dados mais recentes demonstram uma taxa média de 0,38 óbitos/100 mil habitantes (PINHEIRO et al., 2020), o que indica que a esquistossomose permanece como um sério problema de saúde pública no Brasil.

Apesar dos extensos esforços realizados para eliminação dessa parasitose no Brasil desde a década de 70 (COURA; AMARAL, 2004), atualmente ainda existem registros de transmissão

da doença em 18 estados da federação, além do Distrito Federal. As principais áreas endêmicas se situam nos estados de Alagoas, Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais e Pernambuco, enquanto que áreas focais são registradas no Ceará, Distrito Federal, Maranhão, Pará, Rio Grande do Sul, Rio de Janeiro e São Paulo (BRASIL, 2014).



**Figura 2.** Distribuição geográfica das áreas de transmissão da infecção por *S. mansoni* e estimativa de prevalência da esquistossomose mansoni no Brasil, baseado nos dados do Inquérito de Prevalência da Esquistossomose e das Geo-helmintoses (2010 – 2015). **Fonte:** Katz (2018).

Nessas áreas, fatores econômicos, sociais e ecológicos têm contribuído para a contínua transmissão da doença ao longo dos anos. As precárias condições de saneamento básico, o baixo poder socioeconômico e nível educacional dos moradores das áreas endêmicas, somado aos hábitos de vida (principalmente associados às atividades econômicas de pesca e agricultura), migração, a presença dos hospedeiros intermediários do parasito e o clima, são condições que permitem a permanência da transmissão da esquistossomose (LOUREIRO, 1989; KLOOS et al., 2008; KLOOS et al., 2010).

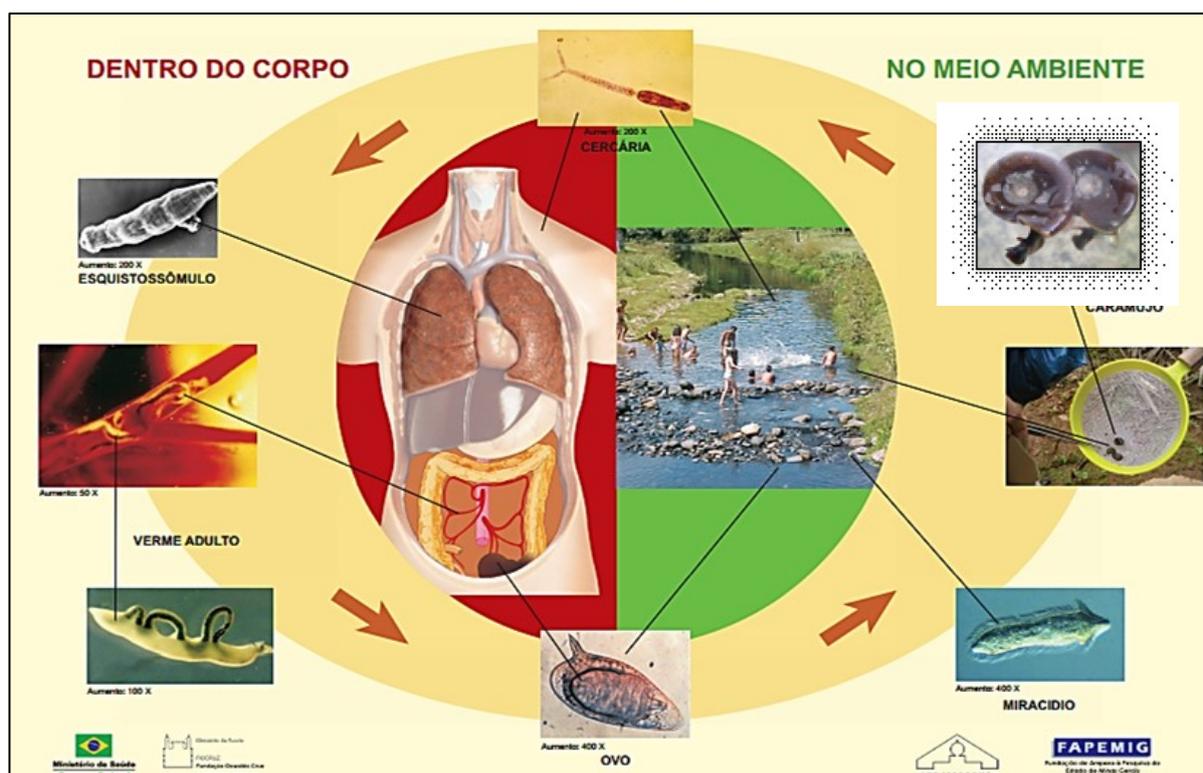
Assim como na África, no Brasil também tem sido reportado a presença de reservatórios silvestres de *S. mansoni*, o que pode constituir um importante elo para a permanência de áreas endêmicas de esquistossomose em diversas regiões brasileiras, porém este é um aspecto sem conclusões definitivas e que ainda é pouco abordado (REY et al., 1993; GENTILE et al., 2012; MIRANDA et al., 2017). Os principais reservatórios silvestres de *S. mansoni* conhecidos no Brasil são os roedores de hábitos semiaquáticos das espécies *Holochilus sciureus* e *Nectomys squamipes*

(VEIGA-BORGEAUD et al., 1986; GENTILE; COSTA-NETO; D'ANDREA, 2010; MIRANDA et al., 2017; DO CARMO-SILVA et al., 2019). Estudos anteriores sugerem que a participação de roedores silvestres na transmissão da esquistossomose pode potencializar a disseminação da doença, além de favorecer uma possível alteração no genótipo do parasito e na patologia da doença em humanos (BARRAL et al., 1996; SIRE et al., 1999; MIRANDA et al., 2017; CATALANO et al., 2020) e estes aspectos precisam ser investigados.

### 2.3 Biologia e morfologia de *S. mansoni*

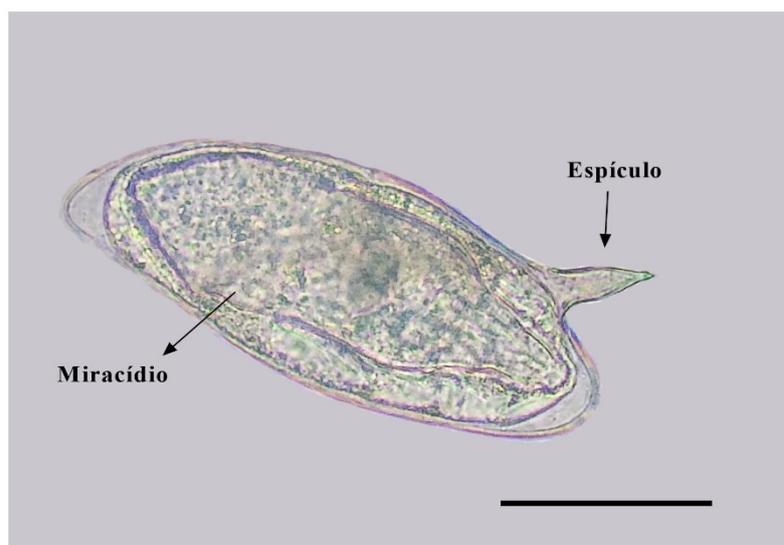
O parasito *S. mansoni* possui um ciclo de vida heteroxênico (**Figura 3**), o qual apresenta uma fase de reprodução assexuada no hospedeiro intermediário, que são representados por algumas espécies de caramujos de água doce pertencentes ao gênero *Biomphalaria*; e uma fase de reprodução sexuada em hospedeiros vertebrados, principalmente o ser humano (KATZ; ALMEIDA, 2003). Entretanto, primatas não-humanos (NELSON, 1960; STANDLEY et al., 2011), bovinos (BARBOSA et al., 1962; MODENA et al., 2008) e principalmente roedores silvestres (THÉRON et al., 1992; REY, 1993; ALARCÓN DE NOYA et al., 1997; MIRANDA et al., 2017; CATALANO et al., 2018), já foram encontrados naturalmente infectados pelo parasito.

Os caramujos hospedeiros pertencem ao gênero *Biomphalaria* (Preston, 1910), filo Mollusca Linnaeus, 1758, classe Gastropoda Cuvier 1797, subclasse Pulmonata Cuvier 1817, ordem Basommatophora Schmidt 1855 e família Planorbidae Rafinesque, 1815 (MALEK, 1985; PARAENSE, 2004; JARNE et al., 2011). Somente as espécies *B. glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835) e *B. straminea* (Dunker, 1848), foram encontradas naturalmente infectadas e atualmente têm importância na transmissão da esquistossomose no Brasil (PARAENSE, 1972).



**Figura 3. Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.** O parasito *S. mansoni* possui um ciclo de vida heteroxeno, que requer a infecção de hospedeiros invertebrados (caramujos do gênero *Biomphalaria*) e vertebrados (ser humano e outros mamíferos silvestres). Os hospedeiros intermediários são infectados pelas larvas denominadas de miracídios, que eclodem dos ovos do parasito quando em contato com coleções hídricas de água doce. No interior dos caramujos, esses miracídios transformam-se em esporocistos que dão origem a milhares de cercárias. Essas larvas são eliminadas no ambiente aquático e são infectantes para os hospedeiros vertebrados. As cercárias quando conseguem infectar seu hospedeiro vertebrado, são potencialmente capazes de transformarem-se em esquistossômulos e posteriormente em vermes adultos machos e fêmeas, que ficam instalados no interior das veias mesentéricas do intestino. Os vermes machos e fêmeas acasalam e parte dos ovos postos pelas fêmeas podem atravessar o endotélio vascular intestinal e serem eliminados pelas fezes, reiniciando o ciclo do parasito. **Fonte:** Schall et al. (2007) e modificado pelo autor.

No desenvolvimento do parasito, os ovos maduros de *S. mansoni* são eliminados nas fezes do hospedeiro vertebrado infectado e, ao entrar em contato com fontes hídricas de água doce, como rios e lagos, a larva ciliada, denominada miracídio, eclode do ovo, nada ativamente e encontra o seu hospedeiro intermediário, dando início ao desenvolvimento assexuado no caramujo (ROLLINSON; SIMPSON, 1987; JENKINS-HOLICK; KAUL, 2013). Os ovos maduros medem cerca de 150 µm de comprimento por 65 µm de largura, tamanho considerado grande quando comparado com de outros helmintos que parasitam o ser humano (**Figura 4**) (KATZ; ALMEIDA, 2003; NEVES et al., 2016).



**Figura 4.** Ovo maduro de *Schistosoma mansoni* (à fresco) recuperado das fezes de camundongos BALB/c com 8 semanas de infecção, observado em microscopia de luz de campo claro. Barra = 50  $\mu\text{m}$ . **Fonte:** acervo do autor.

Conforme mencionado anteriormente, do ovo maduro, eclode a larva ciliada de vida livre e que não se alimenta, denominada de miracídio. De formato oval e revestido por placas ciliadas, o miracídio mede em torno de 150 a 170  $\mu\text{m}$  de comprimento por 60 a 70  $\mu\text{m}$  de largura (**Figura 5.A**) (KATZ & ALMEIDA, 2003; NEVES et al., 2016). O sucesso do desenvolvimento do miracídio de *S. mansoni* depende do encontro de caramujos *Biomphalaria* susceptíveis antes que seus estoques de energia (glicogênio) sejam esgotados, o que ocorre aproximadamente 12 horas após a eclosão. Assim, ao longo da evolução parasito-hospedeiro, o miracídio acabou desenvolvendo fototaxia positiva e geotropismo negativo, migrando para locais na superfície aquática em que os caramujos preferencialmente habitam. No entanto, existem evidências que o miracídio também apresenta uma resposta quimioatrativa às substâncias presentes no muco do caramujo (COELHO et al., 2008; LOVERDE, 2019). Ao encontrar o seu hospedeiro, o miracídio penetra nas partes moles do caramujo (comumente nas bases dos pés e antenas), liberam o conteúdo das glândulas de adesão e penetração, perdem suas placas ciliadas e sofrem modificações fisiológicas, transformando-se em esporocistos primários após 72 horas (COELHO et al., 2008) (**Figura 5. B**).

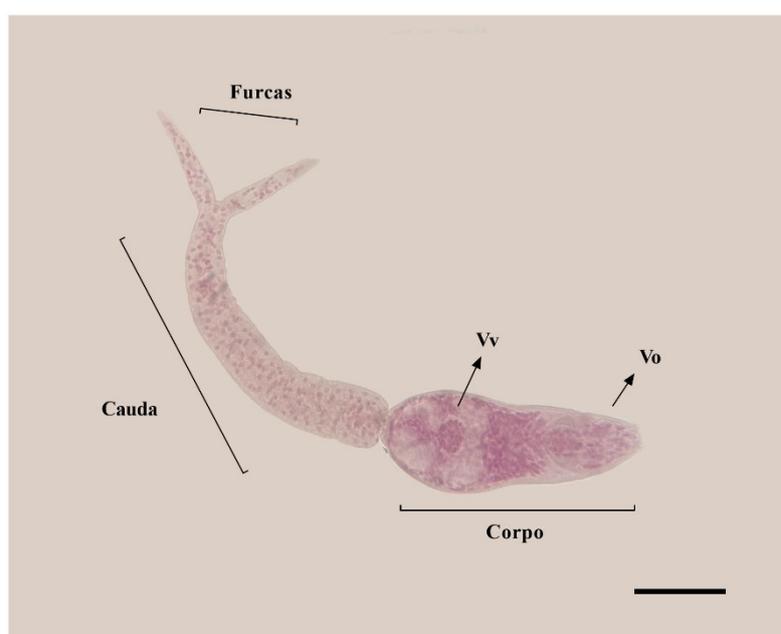


**Figura 5.** Estágios evolutivos de *Schistosoma mansoni* associados a *Biomphalaria* spp., observados em microscopia de luz de campo claro. **A.** miracídio, notar os cílios ainda presentes em sua superfície (seta). Coloração: carmim clorídrico 2,5%. **Fonte:** acervo do autor. **B.** esporocisto mãe ou primário (à fresco) obtido em condições axênicas (MARTINS-SOUZA et al., 2011), notar o processo de divisão celular no seu interior e ausência de cílios em sua superfície. **C.** Esporocisto filho ou secundário (à fresco) recuperado da região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* aos 20 dias de infecção. **Fonte:** acervo do autor. Barras = 50  $\mu$ m.

Em condições ideais de temperatura (entre 25°C e 28°C) ocorre a formação dos esporocistos secundários (**Figura 5.C**) por volta do 14º dia após a penetração do miracídio. Os esporocistos secundários possuem uma dupla camada muscular abaixo de uma cutícula preenchida por espinhos em sua camada mais superficial. Essas características permitem a migração intratecidual dessas larvas nos moluscos. A localização final do esporocisto secundário é principalmente nos espaços intertubulares da glândula digestiva, local com abundante riqueza nutritiva. Porém, os esporocistos também podem se instalar nas glândulas reprodutivas do molusco (ovotestis), ocasionando uma inibição da reprodução desses animais quando infectados (COELHO et al., 2008; LOVERDE, 2019).

Os esporocistos secundários sofrem ciclos de reprodução assexuada formando novas gerações de esporocistos ou as cercárias, formas larvárias de vida livre que também não se alimentam e são liberadas no ambiente aquático, sendo infectantes para o hospedeiro vertebrado (humanos e mamíferos silvestres). Os caramujos infectados com *S. mansoni* podem liberar centenas de cercárias, com uma quantidade aproximada entre 250 a 600 por dia, dependendo da susceptibilidade do hospedeiro (BRAUN; GRIMES; TEMPLETON, 2018). Condições como iluminação e temperatura da água exercem influência direta na liberação das cercárias nas coleções hídricas (BOGEA et al., 1996; WOLMARANS et al., 2002). As cercárias possuem curto período de vida, sendo bastante ativa nas primeiras oito horas, mas dependendo das condições ambientais pode permanecer viável após 24-48 horas de sua eliminação (LOVERDE, 2019). Dois segmentos principais são facilmente identificados nas cercárias: a parte anterior, denominado de corpo, região

que posteriormente se desenvolve no verme adulto e onde são identificadas duas ventosas (oral e a ventral ou acetabular). O corpo está ligado ao segundo segmento, denominado de cauda, que é bifurcada e extremamente muscular. A cauda serve para impulsionar a cercária através da coluna de água e serve como ponto de apoio para ajudar na sua penetração na pele do hospedeiro vertebrado. Morfologicamente, a cercária apresenta uma cauda bifurcada de aproximadamente 150-200  $\mu\text{m}$  e dimensões corporais totais em torno de 30-50  $\mu\text{m}$  de largura por 500  $\mu\text{m}$  de comprimento (**Figura 6**) (KATZ & ALMEIDA, 2003; NEVES et al., 2016). No corpo também são encontradas glândulas contendo secreções importantes para a sua penetração (MACHADO-SILVA et al., 2000; INGRAM et al. 2012; LOVERDE, 2019).



**Figura 6.** Larva cercária de *Schistosoma mansoni* recuperada de *Biomphalaria glabrata* aos 50 dias de infecção, e suas divisões corporais, observadas em microscopia de luz de campo claro. **Vo.** Ventosa oral. **Vv.** Ventosa ventral. (barra = 50  $\mu\text{m}$ ). Coloração: carmim clorídrico 2,5%.  
**Fonte:** acervo do autor.

As cercárias são atraídas por substâncias quimioatrativas, como: ácido linoleico (ácido graxo), e aminoácidos, como a arginina, presentes na pele do hospedeiro vertebrado (LOVERDE, 2019). Durante o processo de penetração no tegumento do hospedeiro, as cercárias perdem a cauda sofrem modificações estruturais, fisiológicas e bioquímicas, transformando-se em esquistossômulos (**Figura 7**) (STIREWALT 1974; STIREWALT; COUSIN; DORSEY, 1983; CURWEN; WILSON 2003; WHITFIELD et al., 2003). Os esquistossômulos então atingem a circulação sanguínea e/ou linfática em aproximadamente três dias pós-infecção (MILLER;

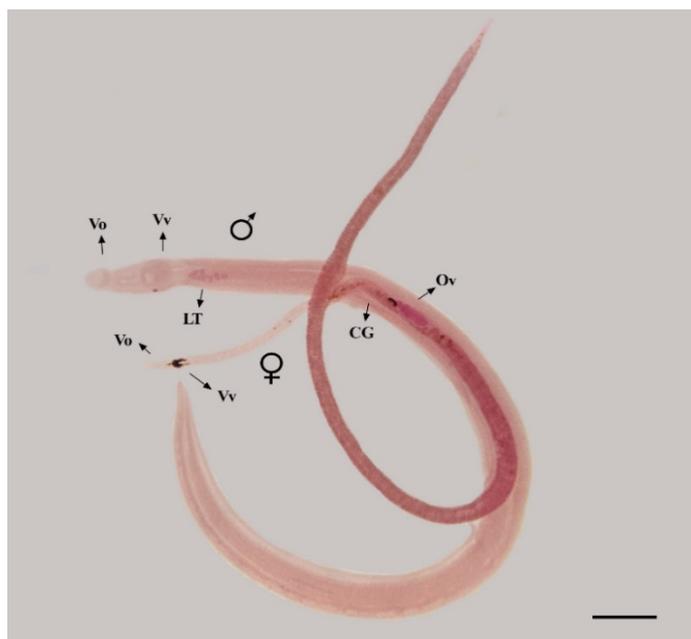
WILSON, 1978; MILLER; WILSON, 1980; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Por meio dessa circulação, os esquistossômulos chegam ao ventrículo direito e são levados, via artéria pulmonar, aos pulmões. Dos pulmões migram aos vasos intra-hepáticos, preferencialmente, via circulação passiva, pela aorta para o sistema porta-hepático pela veia porta, ou circulando sistemicamente por vários órgãos antes de atingirem artérias que derivam no sistema porta-hepático (MILLER; WILSON, 1980; LENZI et al., 2008). Entretanto, também se admite que uma pequena parte dos esquistossômulos possa atingir os vasos intra-hepáticos migrando ativamente pela da veia cava e artéria hepática, ou ainda, por migração transdiafragmática (LENZI et al., 2008).



**Figura 7.** Esquistossômulo pulmonar (à fresco) de *Schistosoma mansoni* recuperado de camundongos BALB/c aos 6 dias de infecção, observado em microscopia de luz de campo claro. Barra = 100µm. **Fonte:** acervo do autor.

Na veia porta hepática, os vermes adultos se alimentam de sangue (obtendo os nutrientes necessários para seu desenvolvimento), amadurecem sexualmente, acasalam-se e, só então migram para veia mesentérica inferior, onde a fêmea inicia a postura dos ovos entre 4 a 6 semanas após a penetração cercariana (BLOCH, 1980; ROLLINSON; SIMPSON, 1987; JENKINS-HOLICK; KAUL, 2013; SKELLY et al., 2014). Os machos e as fêmeas apresentam dimorfismo sexual (**Figura 8**). Os machos são menores (~ 1 centímetro), mais robustos e de coloração esbranquiçada quando comparado com as fêmeas, que são vermes mais delgados e alongados (~ 1,5 centímetros), de coloração escura (devido à presença de sangue semidigerido – hemozoína – presente no ceco). A estrutura mais robusta do macho permite que este carregue a fêmea em seu canal ginecóforo e

ancore o seu par de ventosas (oral e ventral) no endotélio vascular, vencendo a contracorrente do fluxo de sangue e permitindo que a fêmea chegue ao local da postura dos ovos (ramos mesentéricos inferiores). O macho pode se desenvolver completamente na ausência da fêmea, mas a fêmea torna-se atrofiada e não atinge maturidade sexual na ausência do macho (NEVES et al., 1998; LOVERDE; CARVALHO-QUEIROZ; COOK, 2004a; LOVERDE; NILES; OSMAN, 2004b; LOVERDE, 2019).



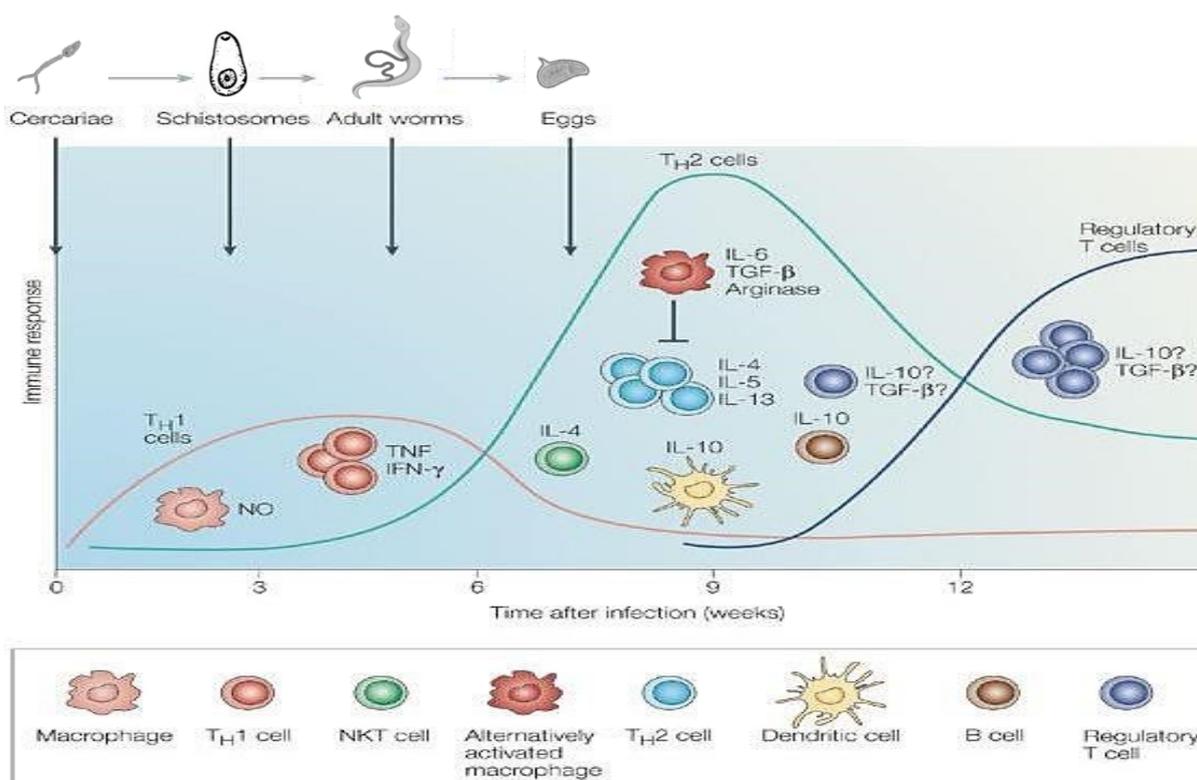
**Figura 8.** Vermes adultos macho e fêmea (acasalados) de *Schistosoma mansoni* recuperados do sistema circulatório de camundongos BALB/c com 8 semanas de infecção, observados em microscopia de luz de campo claro. **Vo.** Ventosa oral. **Vv.** Ventosa ventral. **LT.** Lobos testiculares. **CG.** Canal ginecóforo. **Ov.** Ovário (barra = 500µm). Coloração: carmin clorídrico 2,5%. **Fonte:** acervo do autor.

O número de ovos produzidos diariamente pela fêmea de *S. mansoni* varia de acordo com a espécie do hospedeiro e da linhagem do parasito, porém, a maioria dos estudos indica a produção de 150-400 ovos/fêmea/dia da infecção (LENZI et al., 2008), sendo eliminado aproximadamente um ovo a cada cinco minutos, um padrão que permanece constante por pelo menos um ano (CHEEVER et al., 1994). Do total de ovos eliminados pelo parasito, cerca de 40-50% são capazes de aderir e atravessar o endotélio e a membrana basal do vaso sanguíneo, atravessar a mucosa intestinal e alcançar a luz desse órgão, sendo eliminado nas fezes (PEARCE; MACDONALD, 2002; WYNN et al., 2004). Mais da metade dos ovos produzidos pelas fêmeas de *S. mansoni* fica retida na mucosa intestinal, ou quando não deixam os vasos, são carreados pelo fluxo sanguíneo e se acumulam nos órgãos internos, principalmente no fígado, onde se tornam alvo da resposta imune do hospedeiro (BOROS; WARREN, 1970; WARREN, 1982; BURKE et al., 2009; HAMS;

AVIELLO; FALLON, 2013; CHUAH et al., 2014). Quando recém-eliminados pelas fêmeas, os ovos ainda são imaturos; somente após um período de seis a sete dias eles completam a maturação, desenvolvendo uma larva viável denominada de miracídio (ASHTON et al., 2002). Os ovos do parasito são inicialmente encontrados nas fezes a partir de 40-44 dias da infecção, reiniciando o ciclo (SIQUEIRA-BATISTA et al., 1998; LENZI et al., 2008; SOUZA et al., 2011).

## 2.4 Interação *S. mansoni* e hospedeiro vertebrado: resposta imune e patologia

A morbidade da esquistossomose está associada às características inerentes ao parasito como, a cepa e seu potencial reprodutivo e de desenvolvimento, além das características do hospedeiro, como o status nutricional, presença de comorbidades, tipo e intensidade da resposta imunológica (KABATEREINE et al., 1999; DE JESUS et al., 2002; ABATH et al., 2006; EUZÉBIO et al., 2012). Essa resposta imunológica produzida pelo hospedeiro vertebrado no decorrer da infecção por *S. mansoni* foi bastante detalhada em modelos experimentais e encontra-se sintetizada na **figura 9**, a seguir.



**Figura 9.** Ativação de diferentes tipos celulares inatos e adaptativos e produção de suas moléculas microbicidas e de comunicação, com ênfase nos diferentes perfis de citocinas produzidas por linfócitos durante a infecção primária por *Schistosoma mansoni* em modelo murino. **Fonte:** Dunne e Cooke (2005) e modificado pelo autor.

Embora a resposta imune contra *S. mansoni* seja mais evidente a partir da 3ª semana de infecção, é conhecido que os momentos iniciais da penetração das cercárias e posterior transformação e migração dos esquistossômulos na pele, são capazes de darem início a uma série de eventos imunológicos essenciais tanto para a proteção do hospedeiro, como também para sobrevivência do parasito.

A entrada da cercária na pele induz uma resposta predominantemente inflamatória, caracterizada pelo recrutamento de células polimorfonucleares (PMNs) e mononucleares (WHEATER; WILSON, 1979; INCANI; MCLAREN, 1984). Esse perfil inflamatório também é caracterizado pela produção localizada de citocinas, incluindo, interleucina (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (HOGG et al., 2003a; HOGG; KUMKATE; MOUNTFORD, 2003b), principalmente por queratinócitos e células de Langerhans (LCs) ativadas, promovendo a polarizando de uma resposta imune celular do tipo 1 (WINZLER et al., 1997). Essa resposta inflamatória é efetiva contra as fases iniciais do parasito na pele; entretanto, como forma de escapar dessa barreira imunológica promovida pelo hospedeiro, antígenos produzidos pelas cercárias e esquistossômulos são capazes de induzir mecanismos imunomoduladores que controlam a intensidade da resposta inflamatória e favorecem a sobrevivência e migração do parasito (HESSE et al., 2004), especialmente em populações frequentemente expostas à infecção (CALDAS et al., 2008) e em modelos experimentais de reinfeção (SANIN et al., 2015). Nesse sentido, estudos demonstram que principalmente os produtos excretados/secretados (ES) pelas cercárias e esquistossômulos estimulam queratinócitos, macrófagos, células B e células dendríticas (DCs) a produzirem IL-10 (HESSE et al., 2004). Essa regulação via IL-10 atua nas células apresentadoras de antígenos (APCs), inibindo a produção de citocinas inflamatórias como IL-12, IL-23 e IL-27 (MAZZONI et al., 2001; PEARCE et al., 2004; JENKINS; MOUNTFORD, 2005; DE OLIVEIRA FRAGA et al., 2010), permitindo uma redução da intensidade da resposta Th1, danosa ao parasito. Os antígenos excretados-secretados (ES) pelo parasito também promovem a ativação de queratinócitos e produção de Prostaglandina 2 (PGE2) e Prostaglandina D2 (PGD2), que são moléculas indutoras na produção de IL-10, reforçando ainda mais a regulação do perfil Th1 (RAMASWAMY; KUMAR; HE, 2000; ANGELI et al., 2001; HARIZI et al., 2002). Além disso, já foi demonstrado que a PGE2 é uma importante molécula capaz de induzir vasodilatação, o que facilitaria a passagem dos esquistossômulos migrantes pelos pequenos vasos sanguíneos (RUZICKA; PRINTZ, 1984).

Após a passagem pela pele, os esquistossômulos já transformados, dispõem de uma série de estratégias para evadir-se do sistema imune no pulmão, como uma rápida troca de tegumento, mascaramento com antígenos adquiridos do hospedeiro e apresentação de antígenos com baixa

imunogenicidade (GOBERT et al., 2003; SKELLY; WILSON, 2006). Apesar disso, sua passagem pelo pulmão e migração por outros órgãos até atingirem sua localização final para realizarem a ovipostura, induz inflamação via ativação de receptores Toll-like (TLRs), principalmente de macrófagos e DCs, em resposta a antígenos do parasito (COULSON et al., 1998; DABBAGH; LEWIS, 2003; SILVEIRA-LEMOS et al., 2013). Assim como na pele, essa ativação induz a polarização de resposta imune celular do tipo 1 (Th1), com uma produção predominante de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) por linfócitos TCD4+ (SILVEIRA-LEMOS et al., 2013). Por sua vez, esses linfócitos capacitam as APCs a produzirem mais citocinas inflamatórias como IL-12, IL-23 e IL-2 (ROBINSON; O’GARRA, 2002). A ativação da resposta Th1 (principalmente via IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ou IL-12) é capaz de ativar classicamente macrófagos (CAMs), regulando positivamente a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é responsável por promover a hidrólise da L-arginina em óxido nítrico (NO) e citrulina (COULSON et al., 1998; GORDON, 2003).

Desta forma, no período que envolve a migração dos esquistossômulos até o momento de maturação dos vermes adultos, denominado de fase aguda pré-postural, o hospedeiro produz predominantemente uma resposta imune de perfil Th1, que atinge maior ativação entre a 3<sup>a</sup> e 5<sup>a</sup> semana após a exposição à cercária (GRZYCH et al., 1991; PEARCE et al., 1991). Dados obtidos com infecções em modelos experimentais deficientes na produção de uma resposta Th2 e Treg (IL-4<sup>-/-</sup> e IL-10<sup>-/-</sup>), demonstraram que a ativação da exacerbada da resposta Th1 está associada a intensa lesão tecidual, pois os camundongos apresentaram hemorragia intestinal, caquexia e intensa lesão hepática, que foi associada à produção excessiva de TNF- $\alpha$  (BRUNET et al., 1997; HOFFMAN, CHEEVER; WYNN, 2000).

Em população humana de área endêmica, os estudos indicam que os principais sintomas associados ao início da infecção, são os quadros de dermatite cercariana, que podem se manifestar como uma urticária local, minutos após a infecção pelas cercarias, que ocorre especialmente em alguns indivíduos previamente expostos à infecção (GRYSEELS et al., 2006; BURKE et al., 2009; LAMBERTUCCI, 2010). Em modelo experimental, foi demonstrado que essa inflamação local está relacionada ao quadro de hipersensibilidade associada ao perfil Th2, a qual eosinófilos parecem desempenhar um papel importante nessa reação (LICHTENBERG et al. 1976). Em contraste, a maioria desses indivíduos de área endêmica previamente expostos ao parasito, apresentam poucos sintomas clínicos durante a fase de migração dos esquistossômulos e maturação dos vermes adultos, devido a frequente exposição (RABELLO, 1995; LAMBERTUCCI, 2010). Entretanto, em humanos primo-infectados, durante esse período inicial da migração do parasito, podem surgir sintomas associados à inflamação sistêmica como, febre elevada acompanhada de calafrios e significativa sudorese, mal-estar geral, astenia, tosse não

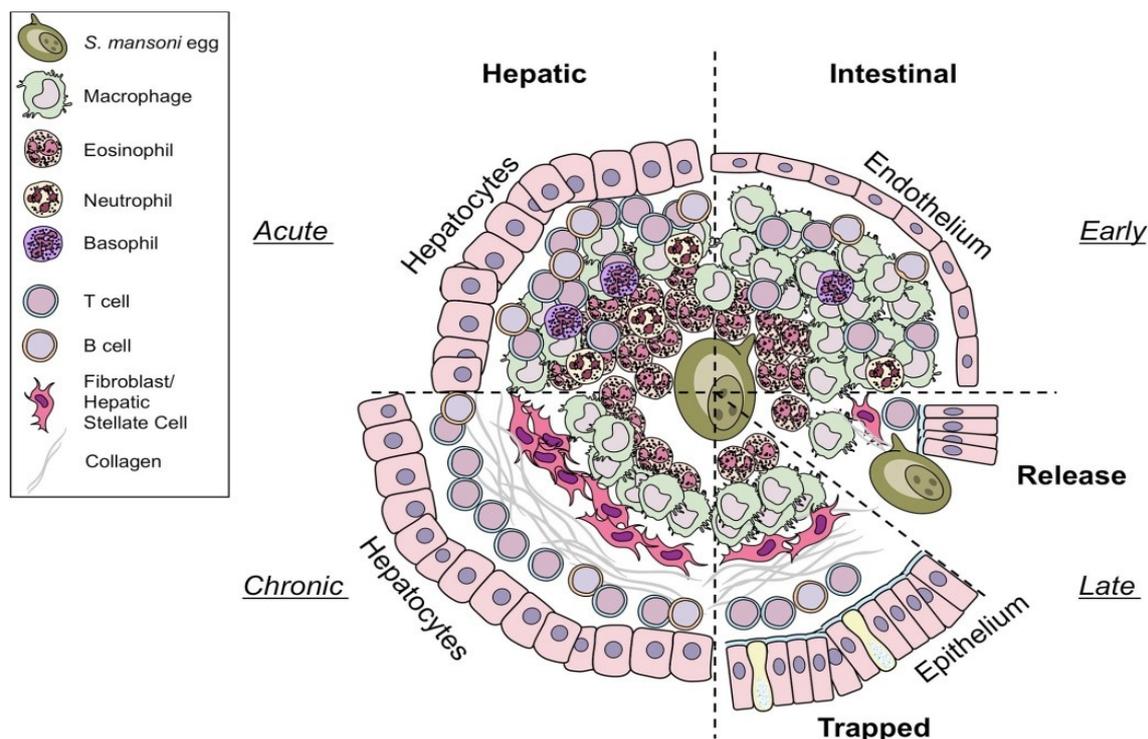
produtiva, sintomas estes que são conhecidos como Síndrome de Katayama ou forma toxêmica, e que estão associados a uma intensa resposta Th1 (COURA et al., 1970; GRYSEELS et al., 2006; CALDAS et al., 2008; BURKE et al., 2009; SOUZA et al., 2011).

Com o início da produção dos ovos (fase aguda postural), inicia uma mudança no perfil dos mediadores imunológicos produzidos pelo hospedeiro, sendo observado aumento de produção de citocinas do tipo 2, como IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13, de quimiocinas como CCL11 e CCL24, que estimulam eosinofilia, diferenciação de macrófagos alternativamente ativados e a produção de IgE (CHEEVER et al., 1987, CHEEVER; HOFFMANN; WYNN, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002; PEARCE et al., 2004; BARTLEY et al., 2006; BURKE et al., 2009; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013).

Em infecções experimentais unissexuais já foi demonstrado que tanto os vermes machos quanto as fêmeas podem promover individualmente uma resposta Th2 antes da postura dos ovos, a partir da indução de produção de IL-4 via linfócitos TCD4<sup>+</sup> (DE OLIVEIRA FRAGA et al., 2010). Entretanto, diversos autores demonstraram que são os antígenos secretados/excretados pelo ovo do parasito (*Soluble Egg Antigens – SEA*), devido a presença dos miracídios ainda biologicamente ativos, os verdadeiros responsáveis pela polarização da resposta Th2 detectada na fase pós-postural da infecção (PEARCE et al., 1991; STADECKER; HERNANDEZ, 1998; PEARCE; MACDONALD, 2002; MAIZELS; YAZDANBAKHS, 2003; PEARCE et al., 2004). Os principais antígenos responsáveis por essa potente indução de uma resposta Th2 são glicoproteínas denominadas de ômega 1 ( $\omega$ -1) e IPSE/alfa 1 ( $\alpha$ -1) que são capazes de estimular a produção de IL-4 por células da resposta imune inata, como Natural Killer (NK), eosinófilos e mastócitos, potencializando a estimulação da resposta Th2 (SABIN; KOPF; PEARCE, 1996; BROWN et al., 1996; DUNNE; COOKE, 2005). Além disto, antígenos que compõem SEA, como lacto-N-fucopentose III (LNFPIII) e  $\omega$ -1, também ativam a maturação de células dendríticas (DCs) não inflamatórias, via receptores de lectina do tipo C em conjunto com receptores do tipo Toll, e estas DCs maduras por sua vez promovem a diferenciação das células T virgens para um perfil Th2, responsáveis por parte da produção de citocinas do tipo 2, como IL-4, IL-5 e IL-13, na esquistossomose (HERVE et al., 2003; OKANO et al., 2001; EVERTS et al., 2009; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Tanto um ambiente de proliferação celular promovido por citocinas do tipo 2, quanto os próprios antígenos dos ovos de *S. mansoni*, estimulam a diferenciação de macrófagos alternativamente ativados (AAMacs), os quais desempenham um papel importante na regulação da inflamação e no reparo tecidual (HERBERT et al. 2004; BARRON; WYNN, 2011a, b; FU; ODEGAARD; HSIEH, 2015).

A estimulação da resposta do tipo 2 é a principal responsável pela formação dos granulomas nos tecidos onde os ovos do parasito ficam retidos, pois já se tem demonstrado experimentalmente que camundongos com deficiência na produção de IL-4 apresentam formação de granuloma significativamente prejudicada e aumento da mortalidade associada à patologia intestinal (BRUNET et al., 1997). Os granulomas são estruturas multicelulares altamente organizadas e compostas por uma variedade de células imunes ativadas e recrutadas pelo perfil de citocinas e quimiocinas do tipo 2, incluindo as próprias células Th2 (CD4+), células T citotóxicas (CD8+), macrófagos, eosinófilos e mastócitos. O recrutamento e ativação destas células levam a um acúmulo local de citocinas como IL-4, IL-13 e IL-5, que também afetam células teciduais, como é o caso das células hepáticas estreladas que se diferenciam em miofibroblastos e contribuem na deposição de matriz extracelular, essenciais para a formação do granuloma hepático (FALLON et al., 1998; HERBERT et al, 2004; BARRON; WYNN, 2011a, b; FU; ODEGAARD; HSIEH, 2015; COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018). Nessa fase inicial da formação dos granulomas costumam ocorrer os primeiros sintomas intestinais, devido à disseminação dos ovos no intestino, provocando necroses (ANDRADE, 2004). Esses granulomas evoluem progressivamente para depósitos de fibrose, principalmente no sistema porta hepático, e são responsáveis pela patologia grave da doença (LENZI et al. 1998; CHEEVER; HOFFMANN; WYNN, 2000).

É importante salientar que, mesmo sendo formados a partir de reações inflamatórias ao redor dos ovos retidos nos tecidos, existem diferenças entre os granulomas hepáticos e intestinais em termos de tamanho, composição celular e deposição de matriz extracelular (WEINSTOCK; BOROS, 1983; LINDER, 2017; SCHWARTZ; FALLON, 2018) (**Figura 10**).



**Figura 10.** Comparação da composição celular e perfil de deposição de matriz extracelular em granulomas do fígado e do intestino em fases iniciais e tardias de formação. **Fonte:** Schwartz e Fallon (2018).

Os granulomas intestinais são formados principalmente por DCs, macrófagos do perfil M2 (alternativamente ativados), e células Th2 (WEINSTOCK; BOROS, 1983; SCHWARTZ; FALLON, 2018). O processo imunológico de formação dos granulomas intestinais ainda não é completamente conhecido; entretanto é proposto que as células endoteliais das veias mesentéricas, via liberação de IL-33, e posteriormente produção de IL-13 e fator de crescimento tumoral (TGF)- $\beta$ , são capazes de iniciarem o seu processo inflamatório (COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018). Em relação à sua composição celular, os granulomas intestinais são semelhantes aos granulomas de hepáticos em fase inicial, porém possuem mais macrófagos e menos eosinófilos, células B e T (WEINSTOCK; BOROS, 1983; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Os granulomas intestinais podem ser divididos em fase recente e tardia, sendo esta última, caracterizada pela presença de fibroblastos, colágeno, ausência de basófilos e neutrófilos, quando comparado com as fases iniciais de sua formação (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Devido sua localização em outro tecido, o granuloma hepático é formado com a contribuição de populações de células hepáticas próprias, como células estreladas (HSCs), hepatócitos, células Kupffer e células endoteliais sinusoidais (CHUAH et al., 2014). Essas células ativadas são capazes de produzirem quimiocinas, tais como CCL2, CCL3, CCL4, CXCL1, CXCL2 e CXCL10 que promovem o recrutamento de leucócitos para o fígado em resposta à lesão hepática

promovida por antígenos secretados pelo ovo (WARMINGTON et al., 1999; SEKI et al., 2007; KARLMARK et al., 2008; SAIMAN; FRIEDMAN, 2012). Especificamente CCL2 é capaz de recrutar monócitos e macrófagos por meio do receptor CCR2, sendo os macrófagos capazes de comporem aproximadamente 30% da população de células do granuloma hepático (RAGHEB; BOROS, 1989; WARMINGTON et al., 1999; SEKI et al., 2007; KARLMARK et al., 2008; SAIMAN; FRIEDMAN, 2012). Por sua vez, os eosinófilos contribuem com aproximadamente 50% dessa população celular nas fases iniciais da formação do granuloma hepático (REIMAN et al., 2006) e sua migração da circulação para o local inflamatório da infecção é induzida principalmente pela quimiocina CCL11 (BEHM; OVINGTON, 2000; SHIN; LEE; MIN, 2009). O eosinófilo quando ativado é capaz de produzir IL-4 e IL-5 sustentando ainda esse perfil imune do tipo 2 (RUMBLEY et al., 1999). Embora por muito tempo tenha tido um papel controverso na formação dos granulomas, no desenvolvimento da fibrose ou carga parasitária de vermes recuperados (LENZI; LENZI; SOBRAL, 1987; SHER et al., 1990; SWARTZ et al., 2006), o nosso grupo de pesquisa demonstrou recentemente que os eosinófilos são importantes para o estabelecimento e/ou amplificação da resposta imune Th2 e regulatória no fígado durante a esquistossomose experimental, o que é essencial para modular a gravidade da doença (OLIVEIRA et al., 2022).

Ao contrário do intestino, o ovo retido no fígado não é eliminado e o granuloma formado ao seu redor evolui para fibrose. A principal citocina conhecida que está associada ao processo de formação de fibrose é a IL-13, que é produzida em grandes quantidades por células Th2 (PUNNONEN et al., 1998; LIU et al., 2012). Os mecanismos conhecidos pelo qual IL-13 é capaz de induzir fibrose envolvem a ativação alternativa de macrófagos e a transdiferenciação de HSCs para miofibroblastos produtores de colágeno (FALLON et al., 2000; HESSE et al., 2001; LIU et al., 2012; ANTHONY; RAMM; McMANUS, 2012; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Especificamente para macrófagos, IL-33 juntamente com IL-4, induzem a expressão de arginase, que cliva a L-arginina para formação de L-ornitina (LIU et al., 2012). A ornitina aminotransferase converte a L-ornitina em prolina, uma molécula chave na produção de colágeno e consequentemente no desenvolvimento de fibrose (HESSE et al., 2001). Esses macrófagos produtores de arginase são denominados de M2 e são conhecidos por expressarem altos níveis de transcrição gênica de arginase-1 (Arg-1), Ym-1 e Fizz-1/RELM- $\alpha$ , (HESSE et al., 2001; GORDON, 2003). Entretanto, estudos demonstram que algumas populações de macrófagos M2 também são capazes de expressarem elevados níveis transcricionais da proteína IL-13Ra2, que está envolvida na inibição da atividade de IL-13 e controle da fibrose (MENTINK-KANE et al., 2004; WILSON et al., 2007)

Uma importante subpopulação de linfócitos T auxiliares mais recentemente descrita, denominada de Th17, também está envolvida na formação do granuloma hepático e associada às patologias severas das principais esquistossomoses humanas (RUTITZKY; STADECKER, 2006; ZHANG et al., 2012; MBOW et al., 2013). Os linfócitos Th17 são estimulados a se diferenciarem pela presença de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-21, IL-23 e TGF- $\beta$  e produzem IL-17 como a principal citocina de assinatura, além de IL-22 e IL-23, que juntamente promovem principalmente o recrutamento de neutrófilos (MARTINEZ et al., 2008; KORN et al., 2009). Sua relação com a severidade da patologia da esquistossomose é devida seu papel na indução de inflamação, pois estudos demonstraram que quando a citocina IL-17 é bloqueada em modelos experimentais, a patologia inflamatória em resposta à infecção por *S. japonicum* e *S. mansoni* é reduzida (RUTITZKY; STADECKER, 2006; ZHANG et al., 2012). Além de induzir uma potente inflamação, IL-17 é descrita como tendo um papel fundamental no desenvolvimento de fibrose hepática em modelos experimentais de *S. mansoni* (WANG et al., 2015).

Após a resposta do tipo 2 atingir seu pico em aproximadamente oito semanas pós-infecção, ocorre uma progressiva modulação da resposta imune do hospedeiro, dando início ao estabelecimento da fase crônica da infecção (PEARCE et al., 1991; PEARCE; MACDONALD, 2002; WYNN et al., 2004; WILSON et al., 2007). Este processo de modulação ocorre principalmente via IL-10 e TGF- $\beta$ , que são produzidas por DCs e células regulatórias como Treg e Breg, que atingem máxima ativação por volta da 11-12<sup>a</sup> semanas de infecção (ARAÚJO; DE JESUS; BACELLAR, 1996; PEARCE; MACDONALD 2002; WYNN et al. 2004; WILSON et al. 2007). Essa produção de IL-10 por células B regulatórias ocorre principalmente pelo estímulo dos antígenos  $\alpha$ -1 e LNFPIII secretados pelo ovo do parasito, e favorece a indução de células TReg, outra fonte importante de IL-10 (CHEEVER et al., 1985; VELUPILLAI; HARN, 1994; EL RIDI; VELUPILLAI; HARN, 1996; HAEBERLEIN et al., 2017). Outros produtos derivados dos vermes adultos, como: ciclofilina-A e lisofosfatidilserina (liso-OS), também são capazes de ativar a maturação de DCs não inflamatórias que ativam uma expansão preferencial de Tregs produtoras de IL-10 (VAN DER KLEIJ et al., 2002; FLOUDAS et al., 2017).

Durante essa fase crônica, os ovos de *S. mansoni* continuam sendo produzidos continuamente; entretanto, devido à capacidade de seus antígenos estimularem uma rede de células reguladoras, a maioria dos indivíduos cronicamente infectados não desenvolvem uma patologia letal (COSTAIN; MACDONALD; SMITS, 2018). De fato, em estudos com humanos infectados, a presença sistêmica de IL-10 está inversamente relacionada com a presença de fibrose ou formas graves da doença (BOOTH et al., 2004; MARTINS-LEITE et al., 2008). Dessa forma, o processo

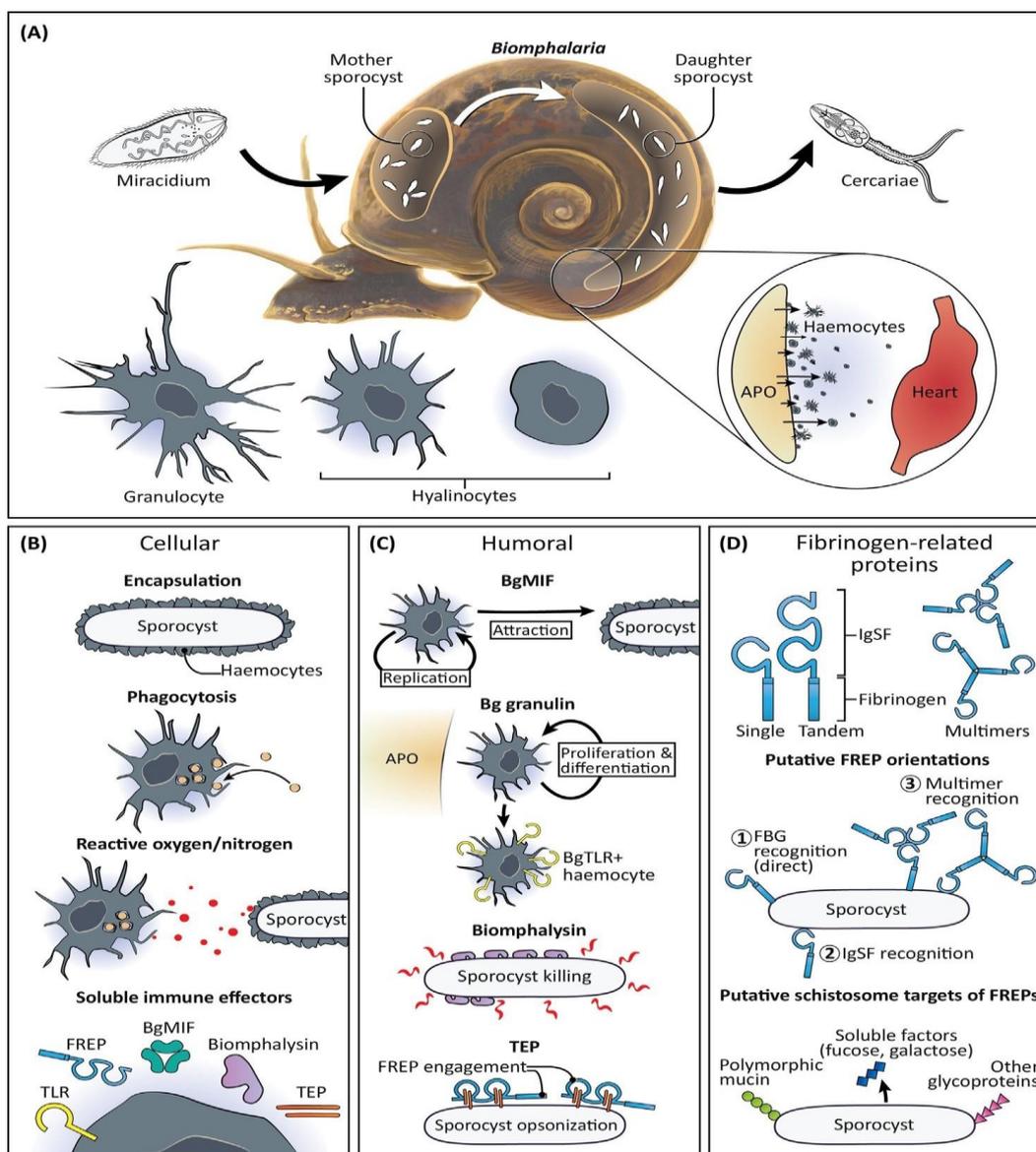
modulatório está envolvido com o prognóstico benigno da doença, uma vez que promove a redução do tamanho do granuloma (PEARCE; MACDONALD, 2002; LUNDY; LUKACS, 2013).

De acordo com estudos em populações humanas, três formas clínicas são bem evidentes e caracterizadas na esquistossomose crônica: intestinal, hepatointestinal e a forma mais grave denominada hepatoesplênica (BINA, 1996; BINA; PRATA, 2003; ANDRADE, 2004). Os sintomas clínicos da esquistossomose nessa fase são atribuídos à fibrose associada à intensidade da resposta granulomatosa induzida por substâncias líticas liberadas pelos ovos do parasito (antígenos solúveis) (LENZI et al., 1998; WILSON et al., 2007; ANDRADE, 2009). Entretanto, o granuloma ao mesmo tempo em que é danoso ao indivíduo, já que representa uma intensa reação celular, que pode evoluir para grave fibrose hepática, também é benéfico, na medida em que favorece a eliminação dos ovos pela mucosa intestinal (PEARCE; MACDONALD, 2002) e sequestra os antígenos liberados pelos ovos, os quais apresentam efeitos hepatotóxicos (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Assim, uma evolução mais benigna da esquistossomose depende de um balanço imunológico adequado, que favorece a formação e a modulação dos granulomas.

Dessa forma, o equilíbrio entre o papel protetor do granuloma e a intensidade da inflamação é determinante na evolução da morbidade associada à esquistossomose e diferentes linhagens do parasito, com possíveis novas composições antigênicas, podem alterar este equilíbrio e afetar a gravidade da esquistossomose.

## **2.5 Interação *S. mansoni* e *Biomphalaria* spp.: resposta imune e compatibilidade**

A interação entre *S. mansoni* e *Biomphalaria* spp. envolvem fatores como, condições ambientais, compatibilidade genética e mecanismos fisiológicos e imunológicos, que são determinantes para o sucesso ou o fracasso da infecção por parte do parasito (LOCKYE et al., 2004; COUSTAU; THÉRON, 2004; PILA et al., 2017). Os moluscos são capazes de utilizarem vários mecanismos imunes inatos que envolvem reações mediadas por células associadas à ativação de fatores solúveis presentes na hemolinfa que participam do reconhecimento e eliminação de patógenos invasores (LOKER et al., 2004; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2012; PILA et al., 2017). O principal modelo de estudo utilizado para elucidar esses mecanismos imunológicos envolvidos no processo de reconhecimento e destruição de esporocistos de *S. mansoni* é a infecção em caramujo da espécie *B. glabrata* (**Figura 11**).

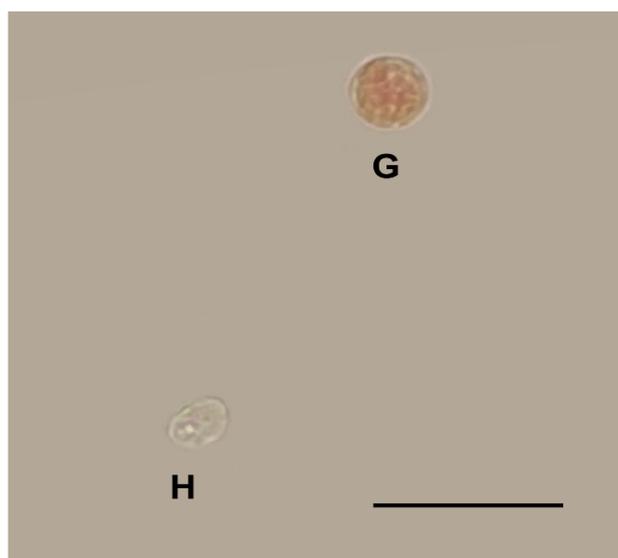


**Figura 11.** Descrição dos componentes do sistema interno de defesa de *Biomphalaria glabrata* e mecanismos de ação frente à infecção por *Schistosoma mansoni*, com ênfase nas funções efetoras das células de defesa circulantes na hemolinfa e nas respostas humorais que envolvem fatores solúveis presentes na hemolinfa acelular que participam no reconhecimento e destruição do patógeno e recrutamento e ativação de células. **Fonte:** Pila e colaboradores (2017).

Estudos demonstram que a ativação da resposta imune de *B. glabrata* têm início com a penetração do miracídio, que ao lesionar o tecido do molusco e também ao secretar/excretar produtos antigênicos, é capaz de sinalizar, via receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), a invasão de um possível patógeno. A partir desse momento, linhagens resistentes de *Biomphalaria* conseguem montar uma resposta rápida e eficiente capaz de eliminar o parasito logo nas primeiras horas de infecção (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2012; CASTILLO et al., 2020); entretanto, em linhagens susceptíveis, essa ação coordenada do sistema interno de defesa não é totalmente eficaz,

permitindo o desenvolvimento do parasito (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2012; CASTILLO et al., 2020).

Após a estimulação por meio de produtos excretados/secretados (ES) dos esporocistos, o órgão produtor de amebócitos (APO) (**Figura 11. A**) aumenta de tamanho visivelmente e exibe uma intensa atividade mitótica associada a produção de hemócitos (LIE; HEYNEMAN; JEONG, 1976; SULLIVAN; PIKIOS; ALONZO, 2004). Os hemócitos são as células de defesa presentes na hemolinfa desses caramujos ou aderidos aos tecidos, que possuem uma morfologia diversificada e mecanismos de ação semelhantes aos macrófagos de mamíferos (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2012). Essas células são frequentemente classificadas em dois morfotipos básicos, diferenciados por tamanho e granularidade, denominados de granulócitos e hialinócitos (MARTINS-SOUZA et al., 2009; ATAEV; KUDRYAVTSEV; POLEVSHCHIKOV, 2016) (**Figura 12**).



**Figura 12. Hemócitos encontrados na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*. H. hialinócito. G. granulócito. A coloração com vermelho neutro (0,04%) permite diferenciar células fagocitárias, como os granulócitos, que se tornam avermelhados ao englobar o corante particulado (barra = 50  $\mu$ m). Fonte: acervo do autor.**

A diferenciação dos hemócitos em células efectoras ocorre principalmente pela ação de granulinas, denominadas de BgGRN em *B. glabrata* (PILA et al., 2016c). Granulinas são fatores de crescimento que induzem a proliferação de células imunológicas em organismos, abrangendo todo o reino animal (PILA et al., 2016c). Estudos demonstram que BgGRN é capaz de induzir uma maior diferenciação de granulócitos (hemócitos aderentes), via sinalização MAPPK (proteínas-quinases ativadas por mitógeno) (PILA et al., 2016c). Esse subtipo de hemócito é conhecido por

atuar no encapsulamento (LOVERDE; SHOULBERG; GHERSON, 1984; MARTINS-SOUZA et al., 2009; PINA et al., 2017), fagocitose (HANINGTON, et al., 2010), e produção de espécies reativas de oxigênio (HUMPHRIES; YOSHINO, 2008; HAMBROOK et al., 2020), que são mecanismos importantes para a morte do parasito (MARTINS-ZOUZA et al., 2009; PILA et al., 2016c PINA et al., 2017).

Entretanto, as atividades efetoras promovidas por esses hemócitos somente são concretizadas quando há um efetivo reconhecimento do esporocisto de *S. mansoni*. Nesse sentido, moléculas de reconhecimento foram investigadas em caramujos *B. glabrata* e diferentes famílias de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) foram descritas, principalmente: receptores do tipo “toll” (*Toll-Like Receptors* - TLR) (PILA et al., 2016b, HUMPHRIES; DENECKERE, 2018) e proteínas relacionadas ao fibrinogênio (FREPs) (ZHANG; LOKER, 2003; HANINGTON; ZHANG, 2011). Em *B. glabrata*, Pila et al. (2016b) caracterizaram a presença de receptores homólogos a TLR, designado de BgTLR, e demonstraram que os TLRs de mamíferos com maior homologia com os de *B. glabrata* são TLR 4 (40%), TLR 3 (38%), além de TLR 13 (37%) presente em camundongos. Além disso, descreveram que BgTLR é detectado principalmente na superfície extracelular da membrana plasmática dos hemócitos, e menos frequentemente no seu citoplasma. Seu papel durante a infecção por *S. mansoni* também foi demonstrado, sendo que BgTLR, principalmente BgTLR1, aumenta a capacidade fagocítica dos hemócitos e a resistência à infecção (JOHNSTON; YOSHINO, 2001; PILA et al., 2016b). Estudos descrevem que esse reconhecimento via BgTLR ocorre principalmente com a interação entre esse receptor e carboidratos presentes no tegumento dos esporocistos (LEHR et al., 2007; LEHR et al., 2008; PETERSON et al., 2009), como também associado com produtos gerados pela transformação larval, como glicoproteínas (WU et al., 2009).

Após o reconhecimento do parasito, os hemócitos ligam-se ao tegumento dos esporocistos e formam uma cápsula celular de múltiplas camadas (LOKER et al., 1982). Os hemócitos presentes nessas camadas secretam compostos tóxicos, principalmente espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS), como  $H_2O_2$  e NO, respectivamente, que contribuem para a destruição do parasito (HAHN; BENDER; BAYNE, 2001a, b; BENDER et al., 2005). Essa produção de ROS/NOS pelos hemócitos é estimulada principalmente por antígenos de *S. mansoni* contendo manose, galactose e fucose, via sinalização de PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase) (HAHN; BENDER; BAYNE, 2000; HAHN; BENDER; BAYNE, 2001a; HUMPHRIES; YOSHINO, 2008). Nesse momento, o parasito pode evadir-se desse mecanismo citotóxico, inibindo principalmente a funcionalidade de hemócitos de caramujos susceptíveis, por meio da ação dos produtos de transformação larval (LTPs), que interferem em sua motilidade e disseminação

(LODES; YOSHINO, 1990), síntese de proteína intracelular (LODES; CONNORS; YOSHINO, 1991) e capacidade de produzir espécies de oxigênio reativo (ROS) (ZAHOR et al., 2009).

Esses hemócitos ativados que formaram uma multicamada celular em torno dos esporocistos também são capazes de coordenarem a atração de mais hemócitos para o local do encapsulamento, por meio de uma proteína homóloga à citocina MIF (fator inibidor da migração de macrófagos) dos mamíferos (~31% com humanos), denominada de BgMIF (BAEZA GARCIA et al., 2010). MIF foi uma das primeiras citocinas a ser descoberta em mamíferos e foi descrita como um regulador central da resposta imune e inflamatória inata (CALANDRA; ROGER, 2003). Nesse sentido, Baeza-Garcia e colaboradores (2010) caracterizam extensivamente essa citocina em *B. glabrata*, demonstrando que ela é produzida principalmente por granulócitos e funcionalmente é capaz de induzir a proliferação de hemócitos por meio da ativação da via ERK1/ERK2 (MAP quinase) e auxiliar na sobrevivência dessas células por meio da supressão de apoptose induzida pela produção de NO. Além disso, esses pesquisadores demonstraram que BgMIF fornece um sinal de migração para granulócitos circulantes em direção ao tecido invadido pelo esporocisto de *S. mansoni* e que o *knockdown* dessa citocina em *B. glabrata* leva a um maior sucesso de estabelecimento de *S. mansoni* e menor taxa de encapsulamento do parasito.

Além de BgMIF, outras proteínas com homologia às citocinas dos mamíferos também foram detectadas no genoma de *B. glabrata*, como: TNF- $\alpha$  e IL-17 (ADEMA et al., 2017). A presença de TNF- $\alpha$ -like já havia sido descrita por Ouwe-Missi-Oukem-Boyer e colaboradores (1994) no plasma de *B. glabrata* por meio da detecção homóloga com anticorpo humano. Estes autores demonstraram que os níveis TNF- $\alpha$ -like, assim como BgMIF, decaem ao longo da infecção, principalmente nas primeiras 24 horas, indicando que o parasito ou células ativadas podem estar realizando a inibição ou o consumo de TNF- $\alpha$ -like, respectivamente. Por outro lado, transcritos proteicos com homologia à IL-17 de mamíferos (IL-17-like) foram expressos em tecidos de *B. glabrata* (genitália e estômago) (CASTILLO et al., 2020). Além disso, estudos sugerem que IL-17-like só seja produzida frente à estímulos, diferente de TNF- $\alpha$ -like que é constantemente produzida (ZHANG et al., 2015; OUWE-MISSI-OUKEM-BOYER et al, 1994); entretanto, futuros estudos com *B. glabrata* frente à infecção por *S. mansoni* ainda devem ser realizados para esclarecer o verdadeiro papel de IL-17-like no sistema interno de defesa desse molusco. Apesar do genoma de *B. glabrata* não sustentar a presença de regiões codificadoras para proteínas com homologia à IL-1 $\beta$ , anticorpos humanos que reconhecem esta citocina reagem com o plasma de *B. glabrata* resistente à infecção. Além disto, a adição da proteína recombinante de IL-1 $\beta$  humano aumenta a produção de superóxido em hemócitos de *B. glabrata* resistentes, porém

não altera a produção desta molécula nos hemócitos dos caramujos suscetíveis (GRANATH; CONNORS; TARLETON, 1994).

A resposta imune celular inata de *B. glabrata* resistentes à infecção, são extremamente eficazes em reconhecer e destruir os esporocistos de *S. mansoni*, principalmente em infecções primárias. Entretanto, é bem conhecido que em infecções secundárias, a morte dos esporocistos pode ocorrer sem a necessidade de encapsulamento (SIRE; ROGNON; THÉRON, 1998; PINAUD et al., 2016). Assim, a partir dessa observação, diversos estudos propuseram que elementos solúveis na hemolinfa de *B. glabrata* são capazes de auxiliarem essa resposta celular, facilitando o reconhecimento de *S. mansoni*, promovendo a ativação de hemócitos, ou destruindo diretamente o parasito, caracterizando assim a resposta imune humoral.

As moléculas solúveis capazes de lesar diretamente os esporocistos de *S. mansoni* pertencem à família de toxinas formadoras de poros  $\beta$  ( $\beta$ -PFT) semelhante à de bactérias, e são denominadas de Biomphalisina e Glabralisina (GALINIER et al., 2013; LASSALLE et al., 2020). Em relação à Biomphalisina, seus níveis são constitutivamente expressos exclusivamente em hemócitos e não são regulados pela infecção por *S. mansoni*, sugerindo um papel sentinela dessa molécula. Entretanto, sua atividade citolítica só é efetiva quando na presença de plasma, sugerindo que outros fatores solúveis interagem com a Biomphalisina para ativá-la (GALINIER et al., 2013). Por sua vez, a Glabralisina foi recentemente descrita, sendo caracterizados cinco subtipos: Gla1Aa1, Gla1Aa2, Gla2Aa1, Gla1Ba1, Gla1Ca1 (LASSALLE et al., 2020). A maioria desses subtipos foram expressos em diferentes tecidos, como estômago, intestino, pé e ovotestis; entretanto, somente Gla1Aa1 foi exclusivamente expresso em hemócitos e seus níveis não foram regulados pela infecção por *S. mansoni*, sugerindo o mesmo papel sentinela e de defesa que a Biomphalisina.

Outros elementos solúveis presentes na hemolinfa de *B. glabrata* podem apresentar um duplo papel, ou seja, atuam no reconhecimento do parasito e também são capazes de modificar as moléculas presentes em seu tegumento, facilitando também o processo de encapsulamento e fagocitose. Nesse sentido, estudos demonstram que as glicosidases extracelulares secretadas por hemócitos podem desempenhar um papel importante na inflamação e nas reações de defesa humoral de *B. glabrata* (ZELCK; TRIPPENSEE; BECKER, 1996). É sugerido que essas glicosidades (principalmente N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase - NAG) podem atuar em todos os principais resíduos de açúcar terminais de patógenos, como a manose, galactose e N-acetilglucosamina presentes na superfície do tegumento de esporocistos de *S. mansoni* (ZELCK; BECKER, 1990; ZELCK, 1999), facilitando seu reconhecimento. Atualmente é bem estabelecido que NAG é uma molécula produzida por células mononucleares de vertebrados e sua dosagem é

utilizada para estimar indiretamente o recrutamento de macrófago nos tecidos (BOURBOUZE et al., 1991; BARCELOS et al., 2005), o que poderia indicar também, de modo análogo, infiltrado de hemócitos nos tecidos de *B. glabrata*. Entretanto, essa analogia no processo de infiltrado celular tecidual ainda não foi estabelecida e o verdadeiro papel de NAG na resistência de *B. glabrata* contra *S. mansoni* ainda não foi esclarecido.

Ao contrário das glicosidades, proteínas como as TEPs e FREPs presentes na fração solúvel da hemolinfa de *B. glabrata*, são atualmente bem caracterizadas e desempenham um importante papel em mediar o reconhecimento de *S. mansoni* a partir da interação entre elas, com outras moléculas solúveis e com os próprios hemócitos, para coordenarem uma série de eventos responsáveis pela resolução da infecção por *S. mansoni* (HANINGTON; ZHANG, 2011; PILA et al., 2017; PORTET et al., 2018).

As BgTEPs são proteínas caracterizadas pela presença de resíduos de cisteína na parte C-terminal e um motivo tioéster altamente conservado (MONÉ et al., 2010). Recentemente, Portet e colaboradores (2018) descreveram o papel dessas proteínas na imunidade protetora de *B. glabrata*, demonstrando que BgTEP é expressa em um subtipo bem particular de hemócitos, as células blásticas. Como as células blásticas não possuem o papel fagocítico, foi sugerido que BgTEP seja secretado por essas células para que se ligue na superfície dos esporocistos e realize a interação com células efectoras, como os granulócitos. Além disso, a expressão de BgTEP aumenta regularmente nas primeiras horas de infecção por *S. mansoni*, reafirmando seu papel no sistema interno de defesa de *B. glabrata*. Adicionalmente, sabe-se que BgTEP é capaz de inibir (de forma dependente de metilamina), a atividade das proteinases cisteínicas produzidas pelos miracídios e esporocistos de *S. mansoni* (BENDER et al., 1996). Estudos recentes demonstraram que o subtipo BgTEP2 é o mais expresso nos hemócitos e, portanto, pode ter um papel central na resposta imune de *B. glabrata* contra *S. mansoni* (WU et al., 2017; DUVAL et al., 2020).

Por sua vez as FREPs são proteínas compostas por um domínio de fibrinogênio C-terminal (FBG) e um ou dois domínios da superfamília de imunoglobulina N-terminal (IgSF) ligados ao domínio FBG por uma região de intercessão (ICR) (LE'ONARD et al., 2001; ZHANG et al., 2001; ADEMA et al., 1997; HANINGTON; ZHANG, 2011). Essas proteínas são altamente diversificadas e mostram variações de expressão de genes, mesmo entre indivíduos da mesma linhagem de molusco (ZHANG; LOKER, 2004), sendo capazes de reconhecerem componentes antigênicos polimórficos de *S. mansoni*, assemelhando-se, portanto, à capacidade dos anticorpos no sistema imunológico de vertebrados de reconhecer epítomos antigênicos altamente diversos expressos em patógenos (ALLAN et al., 2017; CASTILLO et al., 2020). Dentre os subtipos de FREPs já descritos, o 2, 3 e 12 são capazes de se ligarem às LTPs solúveis de *S. mansoni*

(GALINIER et al., 2017); entretanto, diversos estudos indicam que BgFREP3 (que possui dois domínios IgSF) tem um papel central na resistência de *B. glabrata* contra *S. mansoni* (HANINGTON; FORYS; LOKER, 2012; LOCKYER et al., 2012; PILA et al., 2017).

A resposta imune desenvolvida por diversas espécies de caramujos hospedeiros de *S. mansoni*, dentre outros fatores, é responsável pelo polimorfismo de compatibilidade entre parasito-hospedeiro. A compatibilidade é uma característica de um sistema onde o parasito é capaz de estabelecer a infecção e conseguir a transmissão usando esta espécie hospedeira, devendo, portanto, evadir-se do sistema de defesa do hospedeiro para completar seu ciclo de vida (VAN DER KNAAP; LOKER, 1990; COUSTAU; THÉRON, 2004).

Estudos demonstram que diversas linhagens laboratoriais de *B. glabrata* apresentam vários graus de susceptibilidade a infecção por *S. mansoni* (THÉRON; PAGES; ROGNON, 1997) e diferentes cepas de *S. mansoni* apresentam diferentes níveis de infectividade para uma variedade particular de populações de *Biomphalaria* spp. (THÉRON et al., 2014). Os padrões geográficos de compatibilidade entre *S. mansoni* e seus hospedeiros intermediários sugerem que as combinações de simpátricas sejam mais compatíveis do que as combinações alopátricas (SANDLAND et al., 2009).

Assim, é proposto que diferentes linhagens de *S. mansoni* apresentem uma diversidade de antígenos que compartilham características com moléculas da família das mucinas (ROGER et al., 2008b), denominadas de mucinas polimórficas (SmPoMuc). Essas proteínas são altamente glicosiladas e são apenas expressas durante os estágios evolutivos de *S. mansoni* intramolusco (glândula apical de miracídios e esporocistos) (ROGER et al., 2008a) e são as principais responsáveis pelos diferentes níveis de adaptação entre cepas de *S. mansoni* e de caramujos *Biomphalaria* spp. Nesse sentido, entender como diferentes linhagens de *S. mansoni* interagem com seus hospedeiros intermediários, é um pré-requisito para novas abordagens de controle da esquistossomose.

## **2.6 Interação entre as espécies de *Schistosoma* de humanos e as de animais silvestres ou de criação: a ascensão dos híbridos**

Apesar das espécies de *Schistosoma* interesse médico estarem relacionadas com infecções humanas, diversos relatos já demonstraram que elas também infectam animais silvestres (incluindo redores) ou de criação, sendo em alguns casos, capazes de continuarem seu ciclo de vida; nesse contexto, destacando-se as espécies: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. malayensis* (LEGER; WEBSTER, 2017; McMANUS et al., 2018). Destas, *S. japonicum* é a principal espécie

comprovadamente de caráter zoonótico, sendo que mais de 40 mamíferos selvagens e domésticos foram descritos com a infecção por esse parasito (HE et al., 2001; ZHOU et al., 2010). Entre os hospedeiros de maior importância epidemiológica estão os bovinos, particularmente os búfalos semiaquáticos (*Bubalus bubalis*), que participam do ciclo de transmissão de *S. japonicum* na China (MCMANUS et al., 2018; COLLEY; LOKER, 2018). Além desses animais, foi demonstrado que roedores selvagens também participam da transmissão de *S. japonicum* na China e nas Filipinas (LU et al., 2010; LU et al., 2009; RUDGE et al., 2013), além de ser um elo importante na cadeia de infecção de *S. malayensis* na Malásia (GREER et al., 1988) e *S. mansoni* em áreas da África, Caribe e América do Sul (REY, 1993; DUPLANTIER; SÈNE, 2006; GENTILE et al., 2010; MIRANDA et al., 2017; MCMANUS et al., 2018; CHUAH et al., 2019).

Também é importante salientar que os animais de produção são os hospedeiros definitivos naturais de muitas outras espécies de *Schistosoma*, como: *S. bovis* e *S. curassoni* Brumpt, 1931 que infectam bovinos, ovinos e caprinos (MOUCHET, 1992; KINCAID-SMITH et al., 2016; LÉGER; WEBSTER, 2017); *S. mattheei* Veglia & Le Roux, 1929, que parasita bovinos (MONRAD et al., 2006), e *S. spindale* Montgomery, 1906, *S. nasale* Rao, 1933 e *S. indicum* Montgomery, 1906, que naturalmente infectam diferentes espécies de ruminantes (DE BONT et al., 1989; DE BONT et al., 1991; OKPALA et al., 2004; YIHUNIE et al., 2019). Além disso, alguns roedores selvagens também são hospedeiros definitivos de diferentes espécies de *Schistosoma*, incluindo: *S. sinensium* Bao, 1958 (AGATSUMA et al., 2001), *S. ovuncatum* (ATTWOOD et al. 2002), *S. kisumuensis* (HANELT et al., 2009), *S. incognitum* Chandler, 1926 (BUNNAG et al., 1983), e *S. rodhaini* Brumpt, 1931 (ROLLINSON; SIMPSON, 1987; DUPLANTIER; SÈNE, 2006; HANELT et al., 2010). Porém, devido à crescente proximidade entre populações humanas e animais silvestres e de criação, potencializada por perda de habitat original desses animais, mudanças climáticas, novas práticas agrícolas e migrações populacionais, a interação entre essas espécies de *Schistosoma* é constantemente favorecida na natureza (KING et al. 2015; LEGER; WEBSTER, 2017) o que pode permitir a fecundação cruzada entre essas diferentes espécies com geração de descendentes viáveis, que são denominados de híbridos por diversos autores (LEROUX, 1954a; MORGAN et al., 2003; HUYSE et al., 2009; WEBSTER et al., 2013b; LEGER; WEBSTER, 2017).

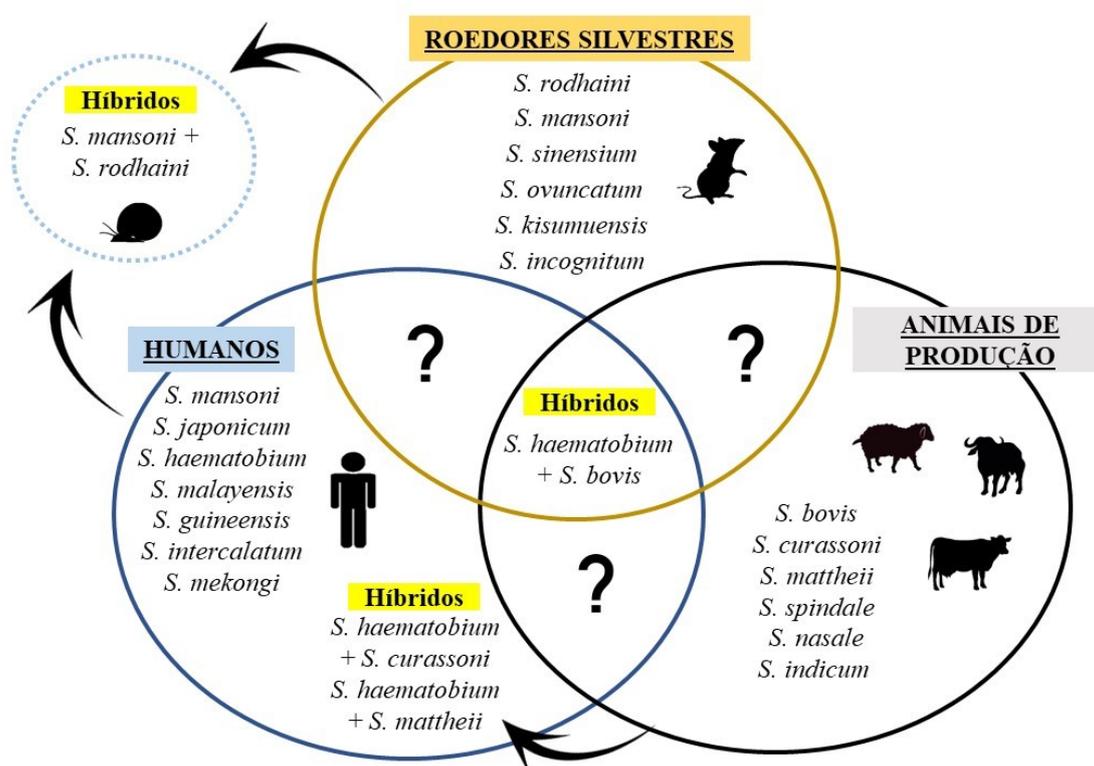
A hibridização é um fenômeno biológico bem estabelecido para algumas espécies de plantas e animais e ocorre quando duas espécies diferentes, mas filogeneticamente próximas, se cruzam; no entanto, parece ter uma ocorrência pouco frequente em parasitos, especialmente em helmintos (BARTON, 2001; ARNOLD, 2004). No entanto, a formação de híbridos tem sido descrita nos últimos anos para as espécies de *Schistosoma* (LÉGER; WEBSTER, 2017), *Fasciola*

(ICHIKAWA-SEKI et al., 2017) e *Ascaris* (EASTON et al., 2020). As principais preocupações em relação à hibridização em organismos patogênicos estão relacionadas à modificação da virulência e a possibilidade de expansão de suas áreas de transmissão devido à inclusão de novos hospedeiros (ARNOLD, 2004). Portanto, a hibridização entre espécies de *Schistosoma* poderia ter um impacto na morbidade do hospedeiro e nas áreas de transmissão da esquistossomose em todo o mundo (BOON et al., 2019).

Os relatos iniciais da formação de híbridos de *Schistosoma* foram baseados na variação morfológica dos ovos do parasito encontrados em amostras fecais, combinados com observações sobre manifestações clínicas atípicas em humanos (ALVES, 1948; LÉGER; WEBSTER, 2017). Ao longo dos anos, os métodos para a detecção de híbridos começaram a utilizar marcadores bioquímicos, especialmente padrões de enzimas diferencialmente expressas, como a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) e fosfoglucomutase (PGM) (WRIGHT; ROSS, 1980; LÉGER; WEBSTER, 2017). Atualmente, técnicas de biologia molecular que avaliam tanto as regiões nucleares (espaçador transcrito interno – ITS) quanto as mitocondriais (citocromo c oxidase – *cox*), têm sido realizadas para identificar com mais precisão híbridos de *Schistosoma* (NORTON et al., 2008 a, b; HUYSE et al., 2013; MONÉ et al., 2015; LÉGER; WEBSTER, 2017). A região do ITS é um marcador particularmente eficiente para detectar introgressão e, conseqüentemente, formação de híbridos (LÉGER; WEBSTER, 2017), pois pode reter ambas as cópias parentais por várias gerações antes de ser homogeneizada no curso da evolução. A partir dessa análise, picos duplos em regiões específicas de um cromatograma de DNA nuclear representam locais onde é possível identificar um híbrido de *Schistosoma* (NORTON et al., 2008a; HUYSE et al., 2013; MONÉ et al., 2015). Regiões localizadas no gene *cox1*, apesar de mais variáveis, também podem ser utilizadas para complementar a identificação de híbridos de esquistossomos (HUYSE et al., 2009; MONÉ et al., 2012; HUYSE et al., 2013; WEBSTER et al., 2013b).

Desde que essas ferramentas foram desenvolvidas, foi possível verificar a ocorrência natural de híbridos de *Schistosoma* em humanos infectados, conforme ilustrado na **figura 13**. A espécie *S. haematobium* promove os mais diversificados cruzamentos heterólogos, principalmente com *S. intercalatum* (BURCHARD; KERN, 1985), *S. mansoni* (HUYSE et al., 2013; LE GOVIC et al., 2019) e *S. guineensis* (WEBSTER et al., 2005; MONÉ et al., 2012). Além disso, *S. haematobium* também é capaz de hibridizar com esquistossomos que infectam animais selvagens e de produção, como *S. bovis* (MONÉ et al., 2015, WEBSTER et al., 2013b; HUYSE et al., 2009; CATALANO et al., 2018; REY et al., 2021; SAVASSI et al., 2021), *S. mattheei* (PITCHFORD et al., 1961; WEBSTER et al., 2019) e *S. curassoni* (WEBSTER et al., 2013b). Entre essas interações, destacam-se relatos recentes sobre a existência de híbridos de *S. haematobium* e *S. bovis*,

principalmente em roedores selvagens na África (**figura 13**) (CATALANO et al., 2018; SAVASSI et al., 2021). Esses relatos demonstraram que os roedores fornecem um importante sistema biológico para interações bem-sucedidas entre diferentes espécies de *Schistosoma* de importância médica e veterinária, além de serem suscetíveis a infecções por híbridos resultantes desses pares heterólogos e possivelmente participarem de sua transmissão. É importante ressaltar que *S. haematobium* não costuma utilizar roedores silvestres como hospedeiros; no entanto, foi demonstrado que os híbridos de *S. haematobium/S. bovis* são capazes de ultrapassar essa fronteira e infectar esses animais (CATALANO et al., 2018; SAVASSI et al., 2021). Outro aspecto de preocupação é que apesar das espécies de *S. bovis* e *S. curassoni* não completarem seu desenvolvimento em humanos, o híbrido entre essas duas espécies já foi encontrado em humanos infectados no Níger, África Ocidental (LÉGER et al., 2016), indicando que a hibridização em espécies de esquistossomos aumenta as possibilidades de transmissão desse parasito.



**Figura 13. Interações entre espécies de *Schistosoma* que infectam humanos, animais de produção e roedores silvestres.** Os cruzamentos mais frequentes e diversos são atribuídos a *S. haematobium*, especialmente com *S. bovis*, espécie de grande relevância veterinária. Híbridos de *S. haematobium/S. bovis* foram identificados em humanos, animais de produção e roedores selvagens (intersecção central no diagrama de Venn), demonstrando seu potencial de infectar diferentes hospedeiros vertebrados, incluindo aqueles que não eram compatíveis com as espécies parentais. Por outro lado, híbridos de *S. haematobium/S. curassoni* e *S. haematobium/S. mattheii* foram encontrados somente em humanos. Para *S. mansoni*, foi comprovada a existência de hibridização natural com *S. rodhaini* a partir de amostras de cercárias eliminadas por caramujos *Biomphalaria* em algumas regiões da África, onde a distribuição dessas duas espécies se sobrepõe. Apesar do potencial de interação entre esquistossomos de roedores silvestres e dos animais de produção, ainda não há relatos de hibridização natural entre eles. **Fonte:** autor.

Embora existam muitos relatos de hibridização com diferentes espécies do gênero *Schistosoma*, estudos experimentais (WEBSTER et al., 1999) e em humanos (CUNIN et al., 2003; CNOPS et al., 2021) mostram que esses híbridos de *Schistosoma* nem sempre são capazes de gerar descendentes férteis, especialmente híbridos formados com espécies filogeneticamente mais distantes. Apesar disso, essa barreira foi superada, uma vez que uma infecção humana na Costa do Marfim (África Ocidental) mostrou a presença de ovos com genótipo indicativo de hibridização entre *S. mansoni*/*S. haematobium*, que pertencem a dois clados distintos (LE GOVIC et al., 2019). Além disso, dados publicados sobre híbridos de *Schistosoma* sugerem que eles apresentam maior fecundidade, maior patogenicidade e melhor capacidade de infectar ambas as espécies parentais de hospedeiros intermediários (caramujos). Como consequência desses ganhos adaptativos, há relatos recentes de expansão da transmissão da esquistossomose em uma área não endêmica localizada na Ilha da Córsega, na França, que ocorreu devido à infecção por híbridos de *S. haematobium*/*S. bovis* (MONÉ et al., 2015; BOISSIER et al., 2016).

Embora os dados sobre infecções humanas por híbridos de *Schistosoma* spp. tenham crescido nos últimos anos, o impacto dessa nova variante do parasito na morbidade da esquistossomose ainda é desconhecido. Um estudo recente (FALL et al., 2021) demonstrou que humanos infectados com híbridos de *S. haematobium*/*S. bovis* no Senegal, África, apresentaram aumento da patologia hepática (hepatomegalia), mas redução da morbidade urogenital (lesão uretral) quando comparados aos indivíduos com infecções não híbridas por *Schistosoma*. Nestes casos, o tratamento com PZQ foi menos eficaz na redução da morbidade urogenital em crianças infectadas com híbridos de *S. haematobium*/*S. bovis*, mesmo um ano após o tratamento (FALL et al., 2021).

Diante desse novo cenário, fica claro que os híbridos de *Schistosoma* podem impactar diretamente em diversos aspectos da epidemiologia, controle e morbidade da esquistossomose. Portanto, é necessário investigar a presença de híbridos em regiões onde a transmissão da esquistossomose ainda permanece ativa e descontrolada, principalmente onde há transmissões sobrepostas de diferentes espécies de *Schistosoma* e a presença de reservatórios silvestres. Além dessa problemática, as sucessivas infecções em reservatórios selvagens também podem criar um ambiente que favoreça novos processos evolutivos e adaptativos que contribuam para o surgimento de distintas linhagens de esquistossomos, que também podem impactar na transmissão e gravidade da esquistossomose humana.

## 2.7 O papel de roedores silvestres no contexto da esquistossomose mansoni: evidências do surgimento de novas linhagens

O primeiro estudo publicado sobre a infecção natural de *S. mansoni* em roedores silvestres foi realizado por Kuntz em 1952, na África, onde o autor demonstrou a infecção natural de *Gerbilus pyramidum* (gerbil do Egito), com o trematódeo. Pouco depois, Amorim (1953) relatou a presença de roedores silvestres das espécies *N. squamipes* e *H. sciureus* naturalmente infectados por *S. mansoni* em áreas endêmicas de esquistossomose do estado de Alagoas, no Brasil. Desde então, vários estudos foram realizados na África (DUPLANTIER; SÈNE, 2000; HANELT et al., 2010; CATALANO et al., 2018), e nas Américas (THÉRON, 1984; THÉRON et al., 1992; GENTILE et al., 2006; DO CARMO-SILVA et al., 2019) para avaliar a participação desses roedores silvestres na transmissão de *S. mansoni*, visando identificar se esses animais eram capazes de manter o desenvolvimento do parasito independentemente da infecção humana. Foi somente na década de 80 que pesquisadores, estudando focos urbanos e silvestres de transmissão de *S. mansoni* na ilha de Guadalupe (Caribe), conseguiram provar que *Rattus rattus* poderia sustentar o ciclo de vida do parasito em lugares sem habitação humana (THÉRON, 1984; THÉRON et al., 1992; MORAND et al., 1999). Essas conclusões só foram possíveis porque, nessas áreas, os focos de transmissão (urbano e silvestre) estavam isolados uns dos outros, algo bastante incomum em outras áreas endêmicas de *S. mansoni*.

Na África, estudos que avaliaram a esquistossomose em roedores silvestres mostraram que as taxas de infecção variam de 1,4% a 40% (DUPLANTIER; SÈNE, 2000; HANELT et al., 2010; CATALANO et al., 2018). Entre esses roedores, *Mastomys huberti* e *Arvicanthis niloticus* parecem desempenhar um papel central como hospedeiros definitivos alternativos de *S. mansoni* na África (DUPLANTIER; SÈNE, 2000; CATALANO et al., 2018; CATALANO et al., 2020). No entanto, diferente dos dados obtidos em Guadalupe, onde foi demonstrado que roedores infectados por *S. mansoni* são capazes de manter a transmissão do parasito independentemente da infecção humana (THÉRON, 1984; THÉRON et al., 1992; MORAND et al., 1999), um estudo filogenético recente descrito por Catalano et al. (2020) demonstrou que, na região da Bacia do Rio Senegal (África Ocidental), genótipos de *S. mansoni* isoladas de roedores selvagens naturalmente infectados e da população humana infectada, são geneticamente semelhantes, sugerindo que é improvável que o desenvolvimento do parasito em roedores selvagens ocorra independentemente da infecção humana, caracterizando a esquistossomose nesta área como uma anfixenose/zoonose.

No Brasil, apesar de muitas espécies de roedores serem encontradas naturalmente infectadas por *S. mansoni*, apenas *N. squamipes* e *H. sciureus* mostraram alta suscetibilidade à

infecção experimental com diferentes cepas brasileiras do parasito (SOUZA et al. 1992, MALDONADO et al. 1994; SILVA-SOUZA; VASCONCELOS, 2005; MARTINEZ et al., 2008; MIRANDA et al., 2019). Além disso, esses animais quando infectados naturalmente ou experimentalmente apresentam grande quantidade de ovos viáveis eliminados nas fezes (PIVA; RUBENS; BARROS, 1966; DIAS et al., 1978; PICOT, 1992; SOUZA et al., 1992; MIRANDA et al., 2019), alta persistência da infecção (SOUZA et al., 1992) e maior tolerância à patologia da doença (SILVA; ANDRADE 1989; COSTA NETO et al., 2013; AMARAL et al., 2016; MIRANDA et al., 2019). De fato, em condições naturais, a infecção por *S. mansoni* em *N. squamipes* não afeta significativamente a sua sobrevivência, capacidade de reprodução e mobilidade, garantindo, assim, a continuidade do ciclo do helminto (D'ANDREA et al., 2000; GENTILE; COSTA-NETO; D'ANDREA, 2010). Adicionalmente, foi comprovado também que em ambiente semi natural, os roedores *H. brasiliensis* e *N. squamipes* foram capazes de completar o ciclo de transmissão sem interferência direta do ser humano, principalmente utilizando o caramujo *B. glabrata* como hospedeiro intermediário (ANTUNES et al. 1973, CARVALHO; ANDRADE; CORTÊS, 1976, KAWAZOE; PINTO, 1983).

No Brasil, *H. sciureus* (**Figura 14**) constitui uma das principais espécies com potencial de manter a infecção por *S. mansoni* na natureza. Ao todo, existem quatro espécies desses roedores presentes no território brasileiro (BRANDÃO; NASCIMENTO, 2015): *H. brasiliensis* Wagner, 1842, *H. sciureus* Wagner, 1842, *H. chacarius* Thomas, 1906 e a recém descrita *H. lagigliai* Pardiñas, Teta, Voglino e Fernández, 2013. Esses animais possuem uma pelagem curta, com a coloração que varia do amarelado ao castanho no dorso, com áreas mais claras nas laterais (BARRETO; GARCÍA- RANGEL, 2005). Devido aos seus hábitos semiaquáticos, esses roedores possuem membranas interdigitais que facilitam seu deslocamento na água (BONVICINO et al., 2008). Os machos são maiores (33-36cm) e mais pesados (~200g) que as fêmeas (~150g; 27-30cm) (LIRA et al., 2016), e a dieta alimentar de ambos é constituída por gramíneas, sementes e pequenos invertebrados (TWICE, 1962; MARTINO; AGUILERA, 1993). Com três meses de vida esses roedores estão aptos ao acasalamento, sendo que a gestação dura em torno de 21 dias com a produção de 5–10 filhotes por ninhada (BONVICINO et al., 2008; LIRA et al., 2016). O período reprodutivo desses animais está intimamente relacionado ao período chuvoso, provavelmente devido à abundância de alimentos disponíveis nessa estação do ano (LIRA et al., 2016). Os ninhos são construídos em formato elipsoidal com restos de madeira e a própria vegetação, acima da lâmina d'água (SAUTHIER et al., 2010).



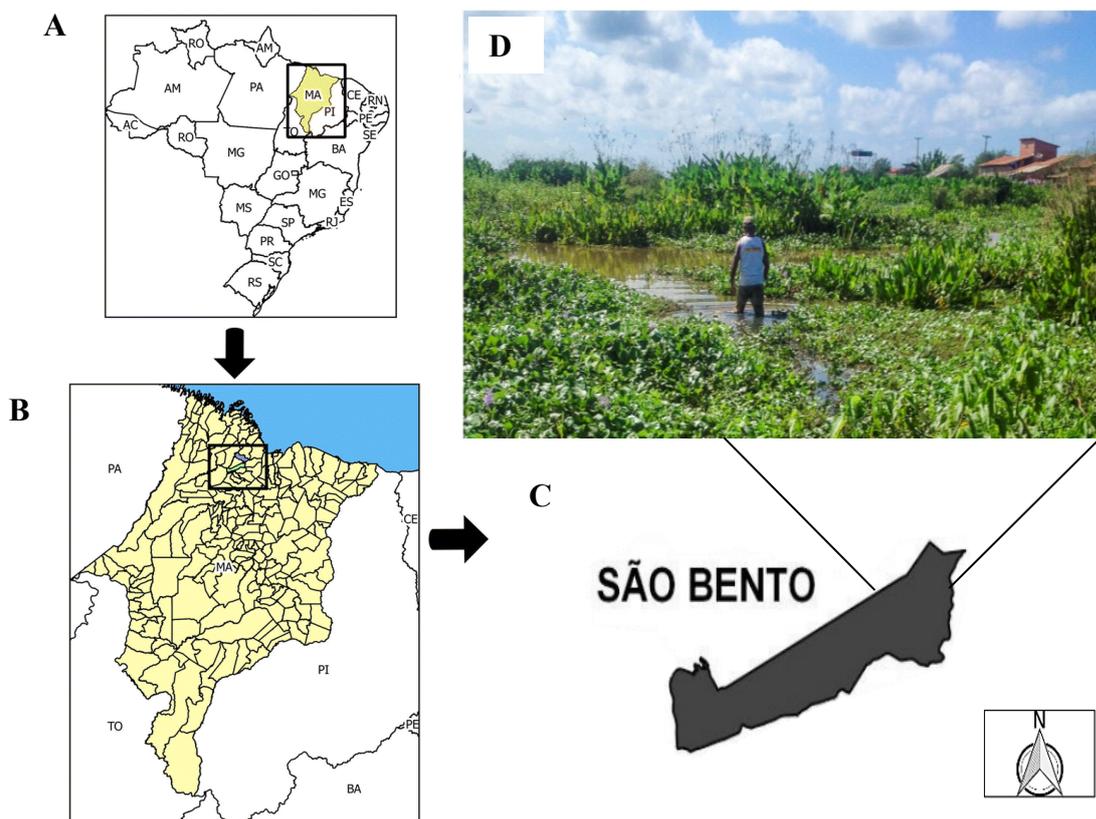
**Figura 14.** Exemplos de *H. sciureus* capturados na cidade de São Bento e mantidos em laboratório. **Fonte:** acervo do autor.

Das espécies anteriormente mencionadas que ocorrem no Brasil, apenas *H. sciureus* e *H. brasiliensis* foram registradas em áreas endêmicas de esquistossomose do Nordeste e Sudeste do Brasil, respectivamente (REY et al., 1993; GENTILE et al., 2012; MIRANDA et al., 2017). Infecções naturais de *S. mansoni* nessas duas espécies foram relatadas nos estados de Pernambuco, Alagoas, Maranhão, Minas Gerais e São Paulo com taxas de infecção variando entre 18,2-75% (REY et al., 1993; MIRANDA et al., 2017; LICÁ et al., 2018; DO CARMO-SILVA et al., 2019).

Dentre as regiões brasileiras mais estudadas e que existem os mais antigos relatos da presença do roedor *Holochilus* atuando como reservatório de *S. mansoni*, destaca-se a Baixada Ocidental Maranhense (02°41'45"S 44°49'17"O) (VEIGA-BORGEAUD et al., 1986). Essa região fica localizada no Nordeste do Brasil, na Amazônia Legal e é composta por 21 municípios com características ecológicas semelhantes, com destaque para os campos naturais alagados, devido a uma topografia levemente inclinada e drenagem superficial deficiente (COSTA-NETO et al., 2001). Essas características ambientais favorecem a ocorrência tanto dos roedores silvestres com comportamentos semiaquáticos quanto dos caramujos suscetíveis à infecção por *S. mansoni* (CANTANHEDE et al., 2014; DO CARMO-SILVA et al., 2019). A principal atividade econômica da região é a pesca, e o contato constante com os corpos d'água potencialmente contaminados promove a interação entre reservatórios silvestres, humanos e hospedeiros intermediários.

Os primeiros estudos de vigilância epidemiológica na região foram realizados por Veiga-Borgeaud et al. (1986), que confirmaram que *H. sciureus* coletado em São Bento, município da Baixada Maranhense (**Figura 15**), apresentou taxa de infecção de 30%, com grande quantidade de vermes adultos nas veias mesentéricas e eliminação de ovos viáveis nas fezes durante a maior parte do ano, indicando seu potencial como reservatório de *S. mansoni*. Três décadas após esse estudo pioneiro, o roedor *H. sciureus*, coletado na mesma região, ainda apresenta taxas de infecção

elevadas, variando de 20% a 64%, segundo diferentes estudos (MIRANDA et al., 2015; LIRA et al., 2016, LICÁ et al. , 2018; DO CARMO-SILVA et al., 2019; SILVA-SOUZA et al., 2019), e notavelmente maior do que na população humana local, cuja taxa de infecção foi de 5% (217/4.608), conforme relatado em um levantamento realizado em 2016 (BRASIL, 2016). Recentemente, foi possível verificar que as taxas de infecção em *H. sciureus* não são influenciadas pela distância entre o local de captura e a região urbana de São Bento, bem como não variam sazonalmente (DO CARMO-SILVA et al., 2019). Curiosamente, o mesmo estudo confirmou a presença de *H. sciureus* fora dos limites do município de São Bento, indicando que esses roedores poderiam atuar como reservatórios de *S. mansoni* em uma área ainda maior do que a atualmente descrita.



**Figura 15.** Localização geográfica (A-C) e características ecológicas da cidade São Bento, Baixada Ocidental Maranhense, Maranhão, Brasil (D). **Fonte:** adaptado de Do Carmo-Silva et al. (2019).

As sucessivas infecções nesses reservatórios silvestres também podem possibilitar um ambiente que favoreça o intercâmbio genético entre diferentes linhagens de *Schistosoma* e o surgimento de novas variantes do parasito com possíveis características aprimoradas associadas à

sua adaptabilidade e virulência (D'ANDREA et al., 2000; COLLEY; LOKER, 2018), o que poderia impactar diretamente a morbidade da doença em humanos. Apesar dos dados de mortalidade e morbidade em humanos infectados na região de São Bento serem incertos, estudos epidemiológicos prévios (COURA et al., 1992; CUTRIM et al., 1998) conduzidos na comunidade de Alegre, localizada na cidade de São Bento, demonstraram que indivíduos infectados residentes desse local apresentaram mais formas graves da esquistossomose (hepatoesplênica), mesmo após esquemas de tratamento em massa, quando comparado com as demais localidades da Baixada Maranhense (Cururupu e Coroatá) avaliadas no estudo. Esses dados sugerem que a linhagem de *S. mansoni* que circula nesse local pode ter sofrido diferentes pressões seletivas associadas às sucessivas infecções em roedores silvestres que atuam como reservatórios do parasito nessa região e possivelmente pode ter alterado a patologia da esquistossomose nos residentes do município de São Bento, Maranhão.

Os primeiros relatos de que variedades diferentes de *S. mansoni* poderiam ocorrer em roedores foram descritos por Schwetz (1953, 1954) que identificou uma nova variedade denominada de *S. mansoni* var. *rodentorum*, em roedores silvestres da região de Kalemie (anteriormente Albertville), República Democrática do Congo, a partir da análise morfológica de ovos eliminados nas fezes. Entretanto, Le Roux (1954) observou que ovos de híbridos entre *S. mansoni* e *S. rodhaini* apresentava uma grande semelhança com os ovos de *S. mansoni* var. *rodentorum* descrito por Schwetz (1953,1954), concluindo que não se tratava de uma nova linhagem, mas um possível híbrido entre essas duas espécies.

Atualmente existem fortes evidências de que novas linhagens de *S. mansoni* podem ter surgido em áreas endêmicas para esquistossomose onde a presença de roedores silvestres naturalmente infectados é frequentemente reportada. Em Guadalupe, foi demonstrado que padrões de eliminação crepusculares de cercárias em *B. glabrata* ocorria nos focos com a presença de *R. rattus* naturalmente infectado, sendo considerado uma possível adaptação do parasito aos hábitos crepusculares/noturnos dos roedores (THÉRON, 1984). Além disso, padrões moleculares de *S. mansoni* isolados de roedores silvestres em Guadalupe (BARRAL et al., 1996; SIRE et al., 1999) e na África (CATALANO et al., 2020), também indicaram a presença de genótipos distintos circulando nesses animais. No Brasil, a existência de linhagens de *S. mansoni* próprias de roedores silvestres também foram sugeridas, sendo inicialmente denominada de linhagem silvestre (LS) (BASTOS et al., 1978; BASTOS et al., 1982). Essa hipótese foi sustentada por alguns dados obtidos experimentalmente utilizando cepas humanas como forma de comparação, destacando-se: diferenças em aspectos morfológicos de vermes adultos (MACHADO-SILVA et al., 1994), patogenicidade em camundongos (BASTOS et al., 1984, SILVA; ANDRADE, 1989),

compatibilidade e virulência em caramujos *Biomphalaria* (BASTOS et al., 1982) e sensibilidade ao Praziquantel (PZQ) (COSTA-SILVA et al., 2012).

Dentre os poucos estudos utilizando isolados de *S. mansoni* a partir de infecções em roedores *Holochilus*, Dias e Piedrabuena (1980) observaram que os vermes adultos e ovos de *S. mansoni* recuperados de infecções naturais em *H. brasiliensis leucogaster* capturados no Estado de São Paulo, não apresentaram diferenças morfológicas quando comparado com isolados humanos clássicos do parasito. No entanto, estudos realizados com o isolado de *S. mansoni* obtido a partir de *H. sciureus* da Baixada Maranhense, verificaram que essa linhagem foi três vezes mais virulenta (ocasionando maior mortalidade) em *B. glabrata*, do que a linhagem humana isolada da mesma região (BASTOS et al., 1982). Além disso, Carneiro et al. (1991) demonstraram a existência de possíveis diferenças antigênicas na linhagem de *S. mansoni* isolada de *H. sciureus* do Maranhão. Neste estudo os autores verificaram a reatividade do soro de 29 pacientes da Baixada Maranhense infectados por *S. mansoni* frente a antígenos do isolado humano e silvestre do parasito. Os autores identificaram, através da técnica de Western Blot, muitas proteínas antigênicas comuns aos dois isolados, sendo as frações 38, 32 e 31 kilodaltons (kDa) as que reagiram mais intensamente. A proteína de 42kDa do isolado humano foi reconhecida em 27,5 % dos soros de pessoas infectadas, enquanto que a mesma proteína do isolado silvestre foi reconhecida em 69% dos soros dos pacientes. Dessa forma, os autores sugerem que o roedor *H. sciureus* esteja diretamente associado com a manutenção da transmissão desta parasitose com consequências epidemiológicas importantes, além de possivelmente poder impactar diretamente na patologia da doença em humanos, devido à existência de composições antigênicas próprias desse isolado.

A presença de roedores silvestres também pode representar um dos principais entraves para a eliminação da esquistossomose e pode impactar diretamente os programas de controle baseados apenas no tratamento de humanos infectados. Enquanto o papel dos reservatórios silvestres de *S. mansoni* não estiver completamente elucidado e esses animais continuam negligenciados pelas estratégias de controle, as metas propostas pela Organização Mundial de Saúde de eliminação da transmissão da esquistossomose em áreas endêmicas dificilmente serão atingidas. Além disso, diante das evidências que sugerem a existência de uma possível linhagem de *S. mansoni* proveniente do roedor *H. sciureus*, acreditamos ser necessário o isolamento dessa linhagem em laboratório para permitir a realização de estudos experimentais mais detalhados em hospedeiros vertebrado e invertebrado, com o objetivo de melhor caracterizar aspectos morfológicos, genéticos, biológicos, parasitológicos e imunopatológicos dessa linhagem. Assim, será possível esclarecer melhor o verdadeiro impacto dessa linhagem de *S. mansoni* isolada de *H. sciureus* na morbidade, transmissão e controle da esquistossomose.

### ***3. Justificativa***

---

A esquistossomose mansoni é uma doença tropical negligenciada de grande impacto para a saúde pública mundial, pois induz grave morbidade em populações humanas infectadas. Apesar da Organização Mundial de Saúde ter estabelecido a meta de eliminação da esquistossomose em países selecionados até o ano de 2030 (NTD MODELING CONSORTIUM SCHISTOSOMIASIS GROUP, 2019), essa doença permanece com transmissão ativa em muitas áreas endêmicas no mundo, o que indica que o parasito causador dessa doença pode estar utilizando estratégias de transmissão que não estão sendo consideradas nas medidas de controle adotadas. De fato, em regiões da África e das Américas, animais silvestres, especialmente roedores, são encontrados naturalmente infectados por *S. mansoni* (THÉRON et al., 1992; REY, 1993; HANELT et al., 2010; MIRANDA et al., 2017; CATALANO et al., 2018), e podem estar contribuindo para a transmissão da esquistossomose. Além disso, é proposto que esses roedores fornecem um importante ambiente natural de interação entre diversas espécies de esquistossomos, criando a possibilidade de surgimento de híbridos (LÉGER; WEBSTER, 2017). Adicionalmente, estudos demonstram que isolados de *S. mansoni* obtidos de infecções naturais em roedores silvestres apresentaram genótipos variados (BARRAL et al., 1996; SIRE et al., 1999; CATALANO et al., 2020) e que, portanto, as sucessivas infecções nesses animais poderiam estar selecionando linhagens silvestres do parasito (BASTOS et al., 1978; BASTOS et al., 1982; MIRANDA et al., 2017). Entretanto, as consequências dessas novas variantes de *S. mansoni* na transmissão e gravidade da esquistossomose, ainda não são totalmente conhecidas.

No Brasil, *H. sciureus* é uma das principais espécies de roedores silvestres encontrada naturalmente infectada por *S. mansoni*, em importantes áreas endêmicas para esquistossomose (VEIGA-BORGEAUD et al., 1986; MIRANDA et al., 2017, DO CARMO-SILVA et al., 2019). Apesar de análises morfológicas prévias terem caracterizado alguns aspectos morfológicos de vermes adultos e ovos de *S. mansoni* obtido de *Holochilus* (DIAS; PIEDRABUENA, 1980), ainda é necessário realizar estudos mais detalhados da morfologia das diferentes formas evolutivas do parasito, além de descrever o seu perfil genético, como forma de confirmar a possível existência de genótipos, linhagens e híbridos de *S. mansoni* no Brasil. Além disso, avaliações prévias demonstraram que *S. mansoni* isolado de *H. sciureus* apresenta um perfil proteômico distinto das tradicionais linhagens humanas (CARNEIRO et al., 1991), sugerindo uma provável alteração em sua composição antigênica, o que poderia impactar diretamente na clássica imunopatologia da esquistossomose em humanos. Portanto, a investigação de infecções experimentais em modelos vertebrados de laboratório, utilizando isolados de *S. mansoni* obtidos de *H. sciureus*, são essenciais para esclarecer essas questões.

Características próprias de isolados silvestres de *S. mansoni* também foram observadas na interação com os hospedeiros invertebrados. Estudos preliminares demonstraram que isolados de *S. mansoni* de *H. sciureus* foram mais virulentos em *B. glabrata*, quando comparado com isolados humanos. Entretanto, *B. glabrata* foi a única espécie capaz de manter o desenvolvimento desse isolado de *S. mansoni* em condições seminaturais, utilizando *H. sciureus* em substituição ao ser humano (CARVALHO; ANDRADE; CORTÊS, 1976; BASTOS et al., 1982). Esses dados prévios claramente demonstram uma possível adaptação desse isolado de *S. mansoni* a populações específicas de hospedeiros intermediários e que possíveis diferenças no padrão de resposta imune nesses caramujos poderiam ser a chave para melhor compreender a compatibilidade e o padrão de propagação desse isolado em *B. glabrata* na natureza.

Dessa forma, nossa hipótese de trabalho é que a participação de roedores silvestres no ciclo de transmissão da esquistossomose pode alterar características morfológicas, genéticas e biológicas de *S. mansoni* e que esses novos atributos do parasito podem afetar a transmissão e a patologia da doença. Portanto, torna-se ainda necessário esclarecer diversos aspectos morfológicos das diferentes formas evolutivas de *S. mansoni* isolado do roedor *H. sciureus*, além de uma caracterização parasitológica, genética e imunopatológicas mais detalhada da infecção gerada por esse isolado em modelos experimentais vertebrado e invertebrado, quando comparado com uma linhagem humana referência. Entretanto, para que essas perguntas sejam esclarecidas, é essencial o isolamento bem sucedido dessa linhagem de *S. mansoni* obtida de *H. sciureus*, em laboratório. Somente a partir desses dados será possível compreender melhor o papel de *H. sciureus* no ciclo de transmissão de *S. mansoni* e seu impacto na morbidade da esquistossomose.

## ***4. Objetivos***

---

## 4.1 Geral

Isolar e caracterizar comparativamente aspectos morfológicos, genéticos, parasitológicos e imunopatológicos da linhagem de *Schistosoma mansoni* isolada do roedor silvestre *Holochilus sciureus* (HS) e de uma linhagem do parasito isolada de infecção humana (LE), durante infecções experimentais em camundongos BALB/c e caramujos *B. glabrata*.

## 4.2 Específicos

### Capítulo I:

- Isolar e caracterizar geneticamente a linhagem HS de *S. mansoni*;
- Descrever o perfil parasitológico da linhagem HS de *S. mansoni* em infecções experimentais de caramujos *B. glabrata* de populações simpátricas (SB) e alopátricas (BH) ao parasito e camundongos BALB/c;

### Capítulo II:

- Caracterizar morfológicamente e morfometricamente, ovos, miracídios, cercárias e vermes adultos (machos e fêmeas) de *S. mansoni* da linhagem HS de *S. mansoni* em comparação à linhagem humana referência (LE);

### Capítulo III:

- Analisar a curva de sobrevivência e ganho de peso em camundongos BALB/c controles e infectados com *S. mansoni* HS e LE durante 12 semanas de infecção;
- Realizar hemograma em camundongos BALB/c controles e infectados por *S. mansoni* HS e LE durante a fase aguda (8ª semana) e crônica (12ª semana) da infecção;
- Avaliar a carga parasitária, pelo número de vermes adultos recuperados do sistema circulatório e pelo número de ovos eliminados nas fezes e retidos nos tecidos, em camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *S. mansoni* HS e LE durante a fase aguda (8ª semana) e crônica (12ª semana) da infecção;
- Quantificar o infiltrado de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos (verificando seus diferentes perfis de ativação) no fígado e intestino delgado de camundongos BALB/c controles e experimentalmente infectados por *S. mansoni* HS e LE durante a fase aguda (8ª semana) e crônica (12ª semana) da infecção;
- Avaliar a produção de citocinas dos perfis Th1, Th2, Th17 e Treg no fígado e intestino delgado de camundongos BALB/c controles e experimentalmente infectados por *S. mansoni* HS e LE durante a fase aguda (8ª semana) e crônica (12ª semana) da infecção;

- Verificar o nível de alteração hepática a partir da dosagem de transaminases (ALT e AST), mensuração da área dos granulomas e quantificação de hidroxiprolina em camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *S. mansoni* HS e LE durante a fase aguda (8ª semana) e crônica (12ª semana) da infecção;
- Verificar o nível de alteração intestinal a partir da análise da presença de sangue oculto nas fezes, mensuração da área dos granulomas e quantificação de hidroxiprolina em camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *S. mansoni* HS e LE durante a fase aguda (8ª semana) e crônica (12ª semana) da infecção;

#### Capítulo IV:

- Analisar a curva de sobrevivência e a fecundidade em caramujos *B. glabrata* controles e experimentalmente infectados por *S. mansoni* HS e LE, durante 91 dias de infecção;
- Avaliar a cinética de migração de esporocistos secundários na região cefalopodal e o potencial de produção de cercárias em *B. glabrata* experimentalmente infectados por *S. mansoni* HS e LE, durante 65 e 91 dias de infecção, respectivamente;
- Caracterizar o perfil de células circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* controles e experimentalmente infectados por *S. mansoni* HS e LE, durante 6–48 horas e 5–30 dias de infecção;
- Quantificar os níveis de proteínas homólogas as citocinas MIF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17 de humanos, na fração acelular da hemolinfa de *B. glabrata* controles e experimentalmente infectados por *S. mansoni* HS e LE;
- Avaliar a presença e quantificar os níveis de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), nitrito (produto final de NO), arginase e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) no tecido de *B. glabrata* controles e experimentalmente infectados por *S. mansoni* HS e LE;

**CAPÍTULO I: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO PARASITOLÓGICA E GENÉTICA DO ISOLADO HS DE *Schistosoma mansoni* OBTIDO DE ROEDORES *Holochilus sciureus* NATURALMENTE INFECTADOS**

---

## 1. INTRODUÇÃO

O parasito *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 é o agente etiológico da esquistossomose intestinal, doença tropical negligenciada com grande impacto global na saúde pública, devido à sua grave patologia em humanos de áreas endêmicas (GRYSEELS et al., 2006; McMANUS et al., 2018). As esquistossomoses humanas afetam 250 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente em países da África, Ásia e América Latina (GRYSEELS et al., 2006; WEERAKOON et al. 2015). Somente *S. mansoni* afeta mais de 54 milhões de pessoas, especialmente na África Subsaariana, ilhas do Caribe, Porto Rico, Suriname, Venezuela e Brasil (WHO, 2013; McMANUS et al., 2018; GUNDA et al., 2020).

Apesar dos esforços da Organização Mundial da Saúde (OMS) para eliminação da transmissão de *S. mansoni* nas principais áreas endêmicas mundiais, as taxas de infecção humana persistem ao longo dos anos (ROLLINSON et al., 2013; SECOR, 2014), indicando que as medidas de controle adotadas ainda não são suficientes. Embora esteja bem documentado que humanos são os hospedeiros definitivos de maior importância epidemiológica na transmissão de *S. mansoni* na maioria das áreas endêmicas (GRYSEELS et al., 2006; McMANUS et al., 2018; LOVERDE, 2019), algumas espécies de roedores silvestres de áreas endêmicas para esquistossomose são frequentemente encontradas naturalmente infectadas (THÉRON et al., 1992; Rey, 1993; MIRANDA et al., 2017; CATALANO et al., 2018). Essa possível dinâmica de transmissão de *S. mansoni* associada à fauna silvestre, resultou no surgimento de híbridos (LEGER; WEBSTER 2017), novos genótipos (CATALANO et al., 2020) e linhagens (MIRANDA et al., 2017), causando um impacto negativo nas atuais metas de eliminação da esquistossomose para o ano de 2030 (NTD MODELING CONSORTIUM SCHISTOSOMIASIS GROUP, 2019). Portanto, é muito importante implementar uma abordagem coletiva e coordenada de saúde única no controle da esquistossomose, que considere os determinantes ecológicos e sociais da saúde humana e as infecções naturais de roedores silvestres por *S. mansoni*.

No Brasil, roedores silvestres semi-aquáticos das espécies *Nectomys squamipes* e *Holochilus sciureus* (Rodentia, Cricetidae), são considerados potenciais fontes de transmissão de *S. mansoni* (REY, 1993; GENTILE et al., 2010; MIRANDA et al., 2017). Esses animais são altamente suscetíveis à infecção (SOUZA et al., 1992; MALDONADO et al., 1994; MIRANDA et al., 2019), eliminam elevado número de ovos viáveis nas fezes (PIVA, 1966; DIAS et al., 1978; PICOT, 1992; SOUZA et al., 1992), as infecções naturais são persistentes (SOUZA et al., 1992) e estes hospedeiros desenvolvem poucos sinais clínicos de esquistossomose e baixa mortalidade (SILVA; ANDRADE, 1989; AMARAL et al., 2016; MIRANDA et al., 2019). Estudos

experimentais prévios utilizando *S. mansoni* coletado de *N. squamipes* e *H. sciureus* naturalmente infectados, demonstraram a existência de características morfológicas e biológicas distintas quando comparadas aos parasitos isoladas de infecções humanas, especialmente com relação à morfologia de vermes adultos (MACHADO-SILVA et al., 1994), patogenicidade provocada em infecções experimentais em camundongos (BASTOS et al., 1984, SILVA; ANDRADE, 1989), compatibilidade e virulência em infecções de caramujos do gênero *Biomphalaria* (BASTOS et al., 1982) e sensibilidade ao tratamento com Praziquantel (PZQ) (COSTA-SILVA et al., 2012). No entanto, para avançar no conhecimento sobre aspectos parasitológicos, genéticos e patológicos associados aos esquistossomos de roedores silvestres brasileiros, é importante isolar o parasita em condições de laboratório. Portanto, o presente trabalho utiliza abordagens de campo e laboratório para descrever o processo de isolamento de *S. mansoni* de *H. sciureus* naturalmente infectado, e avaliar o perfil genético e comportamento parasitológico desta linhagem do parasito, em infecção experimental de modelos de vertebrados e invertebrados.

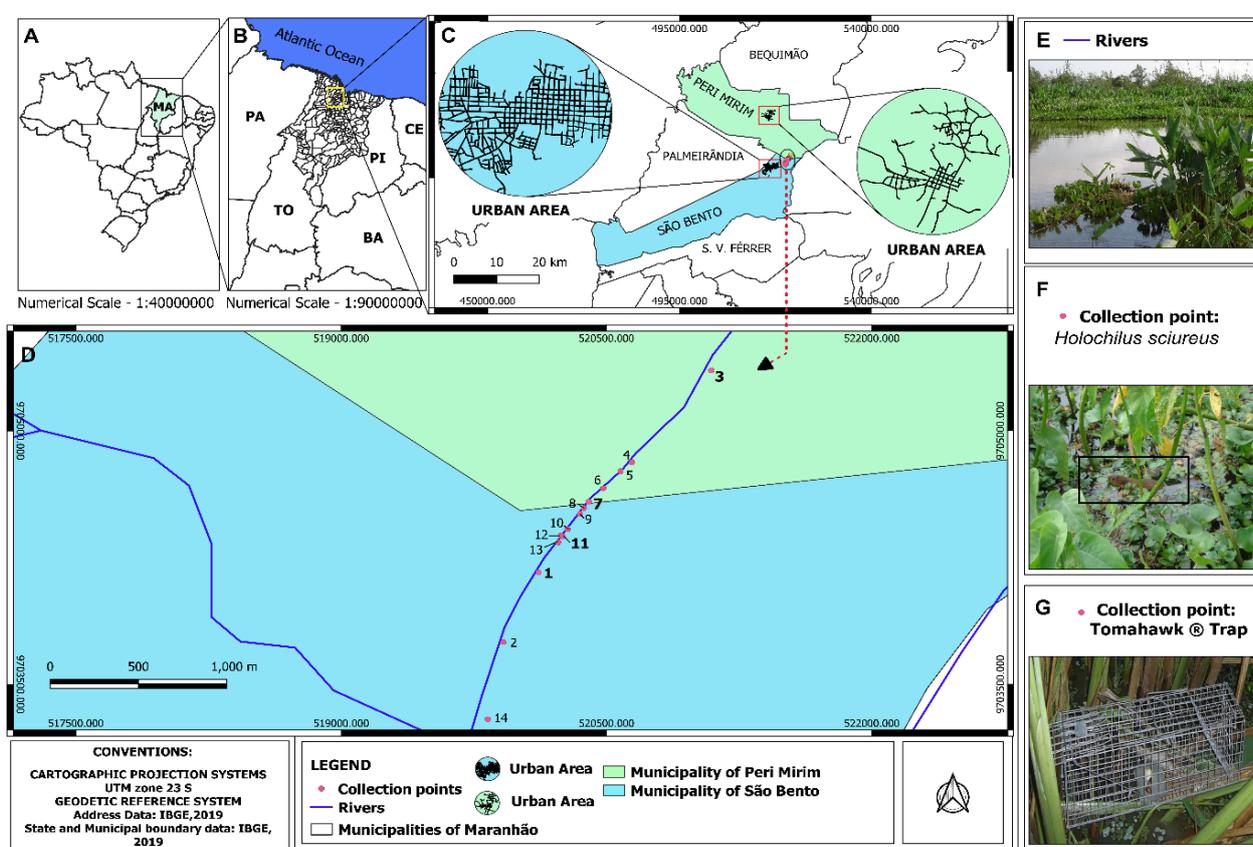
## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Capturas de *H. sciureus*

A linhagem silvestre de *S. mansoni* utilizada neste estudo foi obtida a partir de roedores da espécie *H. sciureus* (Rodentia, Cricetidae) naturalmente infectados capturados entre os anos de 2017 e 2018 nos municípios de São Bento (02°41'45"S 44°49'17"O) e Peri Mirim (02°34'40"S 44°51'14"O), estado do Maranhão, em pontos de coleta localizados nos campos naturalmente alagados característicos da região, conhecida como Baixada Ocidental Maranhense (DO CARMO-SILVA et al., 2019). A esquistossomose humana é endêmica em ambos os municípios, mas as taxas de infecção são baixas, com prevalência estimada de 4,96% (217/4.374) entre os moradores de São Bento e 2,35% (58/2.462) entre os de Peri Mirim, segundo dados apresentados em 2016 (BRASIL, 2016).

O estudo sobre *H. sciureus* no Maranhão fez parte de um projeto que teve início em 2017, coordenado pelo prof. Dr. Nêuton Silva-Souza da Universidade Estadual do Maranhão, com o objetivo de compreender a distribuição espacial e sazonal de *H. sciureus* naturalmente infectados nos campos alagados na Baixada Ocidental Maranhense. A captura e manipulação dos roedores foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO (n°67253-1, **anexo A**) e o projeto está registrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados (registro número AB9E2EC, **anexo B**).

Durante o período de julho de 2017 a junho de 2018, os roedores *H. sciureus* foram capturados mensalmente com auxílio de armadilhas Tomahawk (Jeetekno, Hazelhurst, WI, USA), sendo utilizado uma mistura de banana e pasta de amendoim como isca. Um total de 10 armadilhas, com uma distância de 10 metros entre elas, foram distribuídas em 14 pontos de coleta (**Figura 16**). Pela manhã (cerca de 14–16h após a colocação em campo), as armadilhas foram verificadas e roedores com característica morfológica e biológica de *H. sciureus*, a espécie mais comum encontrada nesta região (BRANDÃO; NASCIMENTO, 2015; MIRANDA et al. 2017), foram levados ao laboratório para confirmação da espécie e realização das necropsias.



**Figura 16.** Áreas de amostragem de *Holochilus sciureus*, localizadas em região endêmica para esquistossomose intestinal, no Nordeste do Brasil. **A.** Mapa do Brasil. **B.** do Estado do Maranhão. **C.** e dos Municípios de São Bento e Peri Mirim, indicando a área de coleta. **D.** Pontos de coleta em áreas alagadas entre São Bento e Peri Mirim, com destaque para os pontos 1, 3, 7 e 11, investigados neste estudo. **E** e **F.** Ecosistema típico da área estudada (retângulo preto na figura E indica a presença de *H. sciureus* em habitat natural). **G.** Armadilhas montadas à noite nos pontos de coleta.

## 2.2 Obtenção dos miracídios

Em laboratório, os animais foram eutanasiados com sobredose de anestésico (300mg/Kg de cetamina e 30 mg/kg de xilazina) e necropsiados para a coleta dos fígados (Conselho de Ética

e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA; protocolo nº03/2017). Após a necropsia, a identificação específica de *H. sciureus* foi confirmada com base nas características cranianas e mandibulares (ROCHA et al. 2011; BRANDÃO; NASCIMENTO, 2015).

Somente os fígados dos animais com a presença de vermes adultos semelhantes à *S. mansoni* ou com alterações macroscópicas hepáticas sugestivas da infecção, foram utilizados para a recuperação dos miracídios, que foi realizada conforme descrito por Standen (1952). Resumidamente, a homogeneização do tecido hepático foi realizada em salina concentrada (2%) resfriada e submetida a decantação no escuro por 1 hora a 4°C. Após decantação, o sobrenadante foi retirado e ao sedimento contendo os ovos do parasito foi adicionada água desclorada em temperatura ambiente, sendo essa suspensão exposta à luz e ao calor de lâmpadas incandescentes por 30 minutos para estimular a eclosão dos miracídios. Os miracídios foram concentrados em um balão volumétrico lacrado, para permitir a iluminação artificial apenas em seu topo, segundo Chaia (1956). Devido ao fototropismo positivo (COELHO et al., 2008; LOVERDE, 2019), os miracídios ficam concentrados no topo do balão volumétrico. Em seguida, essas larvas foram recuperadas, contadas com auxílio de estereomicroscópio (Zeiss Stemi Dv4, Jena, Alemanha) e utilizadas para a infecção experimental de caramujos. Em referência ao nome genérico e epíteto específico do roedor *H. sciureus*, a linhagem de *S. mansoni* isolada desse animal foi denominada de HS neste estudo.

### 2.3 Processo de isolamento em caramujos

Caramujos *B. glabrata* (5-6mm) descendentes de espécimes coletados no município de São Bento (SB - linhagem simpátrica) e de espécimes coletados em Belo Horizonte (cepa BH - linhagem alopátrica) foram utilizados para o isolamento da linhagem HS de *S. mansoni*. As linhagens foram criadas e mantidas separadamente no moluscário do Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia (Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal de Minas Gerais, ICB/UFMG), em aquários contendo água sem cloro e alimentados com alface (*Lectuca sativa*) previamente limpas em solução de ácido acético (0,01%). A dieta dos caramujos foi complementada com uma ração previamente descrita (ROSA et al., 2003).

A infecção em massa dos caramujos foi realizada quando houve um baixo número de miracídios recuperados do fígado de *H. sciureus*, pois dificultava a estimativa numérica para infecção individual. Portanto, todo o sobrenadante limpo obtido do homogenato do fígado de *H. sciureus* infectados foi coletado e transferido para recipientes de vidro de 2L. Um total de 8–15 *B.*

*glabrata* foi colocado nesta solução e mantido por um período de 12h sob luz direta (STANDEN, 1952).

Para infecção individual, cada caramujo foi colocado em um poço de placas de cultura de 6 poços (Plate Flat Bottom - SARSTEDT, Inc. USA), contendo cerca de 6 mL de água desclorada e um número definido de miracídios obtidos do homogenato hepático (5–8 miracídios/poço). As placas foram mantidas por 12 h sob luz direta.

Caramujos de infecções individuais ou em massa foram avaliados entre 28-80 dias após a exposição aos miracídios para identificar e quantificar a eliminação de cercárias. Resumidamente, uma vez por semana os caramujos foram colocados individualmente em placas de cultura de 6 poços (Sarstedt), contendo 6 ml de água sem cloro e expostos à luz incandescente por 4 h (BRASIL, 2008). A presença de cercárias foi verificada usando um estereomicroscópio (Zeiss Stemi Dv4), e os caramujos comprovadamente infectados foram separados em ambiente escuro a 23°C. Esses caramujos foram usados como fonte de larvas infectantes em infecções experimentais posteriores.

#### **2.4 Processo de isolamento em camundongos e hamsters**

Hamsters heterogênicos (*Mesocricetus auratus*) e camundongos BALB/c isogênicos, com idade entre 6–8 semanas, machos, foram utilizados como modelo vertebrado para infecções experimentais com *S. mansoni* da linhagem HS. Os animais experimentais foram mantidos no biotério para animais infectados do Departamento de Parasitologia – UFMG, alimentados com ração padrão (Presença, Primor, Brasil) e com fornecimento de água *ad libitum*. Os experimentos com esses animais foram aprovados pelo Conselho de Ética e Experimentação Animal da UFMG (nº46/2019, **anexo C**). Esses dois modelos experimentais foram escolhidos pois são os mais utilizados para a manutenção de diferentes linhagens de *S. mansoni* em laboratório (CHEEVER et al., 2002; LOMBARDO et al., 2019)

As cercárias utilizadas para a infecção de hamsters e camundongos foram obtidas de *B. glabrata* infectados com a linhagem HS de *S. mansoni*. Esses caramujos infectados foram colocados em um béquer de vidro contendo 100mL de água sem cloro e expostos à luz e ao calor por 4 horas (BRASIL, 2008). Em seguida, os caramujos foram retirados do béquer e o líquido foi inicialmente filtrado em uma tela de arame (40 malhas/polegada) para obtenção de uma suspensão limpa. Essa suspensão contendo as cercárias foi então concentrada em um funil de Buchner com 20–30µm de porosidade, sob vácuo (PELLEGRINO; MACEDO 1955).

Em algumas infecções, principalmente quando o número de cercárias eliminadas pelos caramujos era baixo (dificultando uma estimativa numérica por mL), o método de infecção em

massa foi realizado conforme descrito por Brener (1956, 1959). Resumidamente, os camundongos foram deixados individualmente em gaiolas de polipropileno (13x30x20cm) por 1h em contato com 500mL de água sem cloro contendo as cercárias previamente obtidas pelo método de concentração. A luz artificial foi mantida próxima às gaiolas para estimular a ativação e penetração das cercárias. Quando os caramujos eliminaram grande número de cercárias, permitindo concentração e quantificação, um número definido (entre 20–120 cercárias/animal) foi diluído em 500µL de solução salina (0,9% NaCl) que foi inoculada por via subcutânea em cada modelo experimental vertebrado (PELLEGRINO; MACEDO, 1956).

Para confirmação qualitativa da infecção nos camundongos e hamsters, as fezes desses animais foram coletadas semanalmente de 35 a 62 dias pós-infecção (dpi) e examinadas pela técnica de sedimentação (HPJ) (HOFFMAN et al., 1934). Após 8 semanas da infecção (spi), os camundongos e hamsters expostos às cercárias foram eutanasiados e submetidos à perfusão do sistema circulatório, para a recuperação dos vermes adultos, conforme Pellegrino e Siqueira (1956). Resumidamente, a cavidade abdominal dos animais devidamente anestesiados e eutanasiados foi exposta e a região distal do intestino grosso foi amarrada. Em seguida, uma agulha acoplada a uma bomba de perfusão (Automatic Pippeting Brewer Machine, B.D.) foi introduzida na aorta torácica para perfusão do sistema circulatório, utilizando soro fisiológico 0,85% contendo 80 U/L de heparina. A solução contendo os vermes adultos foi transbordada pela veia porta (previamente seccionada) e coletada individualmente de cada animal. Os vermes foram lavados várias vezes com solução salina 0,85% e deixados decantar por 20 min. para limpeza completa do material. Em seguida, os vermes foram contados separadamente em machos e fêmeas, conforme Neves et al. (1998), com auxílio de um estereomicroscópio (Zeiss). Após contagem, os vermes foram preservados individualmente em microtubos a -20°C, para posterior análise molecular.

## 2.5 Extração de DNA, PCR e sequenciamento

O DNA genômico de vermes machos adultos, obtido pela técnica de perfusão, foi isolado usando o mini kit QIAamp® DNA (Qiagen, Alemanha), de acordo com as orientações do fabricante. A extração de DNA de parasitos fêmeas foi evitada devido a possível presença de ovos no seu sistema reprodutivo, o que resultaria na obtenção de material genético de mais de um indivíduo.

Ensaio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e sequenciamento foram focados na região 16S-12S do mtDNA (referido aqui como 16S), usando os iniciadores 16SF2 (F) 5' GTG CTA AGG TAG CAT AAT AT 3' e 16SR3 (R) 5' AGA AGC AGT TTA ACC GCG AC 3'; e na região da subunidade I (*cox1*) do citocromo c oxidase, usando os primers CO1F (F) 5' GGC ATA

TCT GTA TGA GTC TA 3' e CO1R3 (R) 5' GCA TTT AAA TAR TCA ACA TG 3' (MORGAN et al., 2005). Ambos os conjuntos de primers amplificam um fragmento de 730 pb. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µL, consistindo em 1,25µL de cada primer (concentração final de 0,5µM), 12,5µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, EUA), 1µL de molde de DNA (cerca de 20ng/µL) e 9 µL de água ultrapura. Os ciclos térmicos foram os seguintes: 1 min a 95°C, 45s a 50°C e 90s a 70°C, seguidos por 29 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 50°C e 90s a 72°C, e por uma extensão final a 72°C por 7 min (MORGAN et al., 2003). Nas reações também foi incluído o controle negativo (DNA substituído por água ultrapura utilizada na reação), para avaliar a presença de possíveis contaminantes. Em seguida, um volume de 4 µL do produto da PCR e 5 µL de peso molecular (1kb DNA Ladder, Promega) foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% (m/v) (Midsci, Estados Unidos), com tampão Tris-Acetato-EDTA-TAE (tris base 0,02M, 6% de ácido acético e 0,0001M de EDTA) e corado com GelRed® (Biotium, Estados Unidos), para confirmação da amplificação e tamanho do amplicon.

Os produtos da PCR com amplificação confirmada foram purificados por meio de tratamento enzimático com ExoSAP-IT™ Express (Thermo Fisher, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. Os produtos purificados foram encaminhados para sequenciamento no CT vacinas (BHtec, Brasil), utilizando os conjuntos de primers da PCR. As sequências contíguas foram montadas no Geneious (Geneious Prime ver. 2022 criado pela Biomatters, disponível em <http://www.geneious.com/>), seu consenso foi extraído e a sequência depositada no GenBank. A busca preliminar do Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) no banco de dados GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) foi realizada para confirmar a proximidade genética entre as sequências obtidas nesse estudo e as de representantes a família Schistosomatidae.

## 2.6 Análise filogenética

As sequências escolhidas para as reconstruções filogenéticas foram de todos os representantes do gênero *Schistosoma*, cujas regiões genéticas eram congruentes com as do presente estudo (consultar **Tabela I e II**). Sequências de mesmos isolados (clones ou outros com 100% de similaridade genética), amostras não identificadas em nível de espécie e com comprimento muito curto não foram incluídas. As sequências foram alinhadas usando M-Coffee (NOTREDAME et al., 2000), depois avaliadas pelo escore de consistência transitiva, para verificar a confiabilidade das posições alinhadas, e com base nesses valores, as posições alinhadas de forma ambígua foram retiradas (CHANG et al., 2014). Os conjuntos de dados (ou seja, alinhamentos de acordo com cada marcador genético) foram submetidos a análises de máxima verossimilhança

(ML) e inferência bayesiana, usando PHYML e MrBayes, respectivamente (HUELSENBECK; RONQUIST 2001; GUINDON; GASCUEL 2003).

**Tabela I.** Sequências de nucleotídeos de diferentes espécies de *Schistosoma* obtidas do GenBank e utilizadas em reconstruções filogenéticas associadas a seus hospedeiros, origem geográfica, número de acesso e região genética 16S (rDNA).

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem geográfica</b>	<b>Número do Genbank</b>
<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Mesocricetus auratus</i> (lab)	NI	DQ157222
<i>Schistosoma indicum</i>	Bovino	Bangladesh	NC_047240
<i>Schistosoma japonicum</i>	NI	NI	KU196336
<i>Schistosoma mansoni</i>	NI	NI	AF130787
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	AY446205
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Biomphalaria pfeifferi</i>	Quênia	AY446210
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Homo sapiens</i>	Guadalupe	AY446211
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Biomphalaria pfeifferi</i>	Tanzânia	AY446241
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Homo sapiens</i>	Madagascar	AY446261
<i>Schistosoma mansoni</i>	NI	Nigeria	AY896581
<i>Schistosoma mansoni</i>	NI	Senegal	AY896594
<i>Schistosoma mansoni</i>	NI	Gana	AY896607
<i>Schistosoma mansoni</i>	NI	Porto Rico	HE601612
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>H. sciureus</i> *	Brasil	HS_7_16S
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>H. sciureus</i> *	Brasil	HS_12_16S
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>H. sciureus</i> *	Brasil	HS_13_16S
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>H. sciureus</i> *	Brasil	HS_15_16S
<i>Schistosoma mansoni</i>	NI	NI	NC_002545
<i>Schistosoma rodhaini</i>	<i>Biomphalaria sudanica</i>	Quênia	AF531309
<i>Schistosoma rodhaini</i>	<i>Biomphalaria sudanica</i>	Quênia	AY446264
<i>Schistosoma rodhaini</i>	<i>Biomphalaria sudanica</i>	Quênia	AY446265
<i>Schistosoma spindale</i>	Bovino	NI	NC_008067
<i>Trichobilharzia regenti</i> <sup>a</sup>	<i>Radix peregra</i>	NI	NC_009680

a= grupo externo usado nas análises filogenéticas;

lab= cepa mantida em animais de laboratório, mas o hospedeiro original não foi informado;

\*= linhagem mantida em camundongos de laboratório, mas originalmente isolada de *H. sciureus*;

NI= não informado.

**Tabela II.** Sequências de nucleotídeos de diferentes espécies de *Schistosoma* obtidas do GenBank e utilizadas em reconstruções filogenéticas associadas a seus hospedeiros, origem geográfica, número de acesso e região genética *cox1* (mtDNA).

<b>Espécie</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Origem geográfica</b>	<b>Número do Genbank</b>
<i>Orientobilharzia turkestanicum</i> <sup>c</sup>	Caprino	China	EU436657
<i>Schistosoma bovis</i>	NI	Tanzânia	AY157212
<i>Schistosoma curassoni</i>	NI	Senegal	AY157210
<i>Schistosoma edwardiense</i>	NI	Uganda	AY197347
<i>Schistosoma guineensis</i>	NI	São Tomé e Príncipe	AJ519517
<i>Schistosoma haematobium</i>	<i>Mesocricetus auratus</i> (lab)	NI	DQ157222
<i>Schistosoma hippopotami</i>	NI	Uganda	AY197346
<i>Schistosoma incognitum</i>	NI	Tailândia	AY157201
<i>Schistosoma incognitum</i>	Caprino	Índia	JQ408708
<i>Schistosoma indicum</i>	Bovino	Bangladesh	NC_047240
<i>Schistosoma intercalatum</i>	NI	Sao Tome and Principe	AY157208
<i>Schistosoma japonicum</i>	NI	China	KU196336
<i>Schistosoma kisumuensis</i>	<i>Pelomys isseli</i>	Quênia	FJ897158
<i>Schistosoma malayensis</i>	NI	Malásia	AY157198
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Homo sapiens</i>	Brasil	AY446083
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Biomphalaria pfeifferi</i>	Quênia	AY446088
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Homo sapiens</i>	Guadalupe	AY446089
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>Biomphalaria pfeifferi</i>	Tanzânia	AY446119
<i>Schistosoma mansoni</i>	NI	Nigéria	AY896620
<i>Schistosoma mansoni</i>	NI	Senegal	AY896634
<i>Schistosoma mansoni</i>	NI	Gana	AY896646
<i>Schistosoma mansoni</i>	NI	Porto Rico	HE601612
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>H. sciureus</i> *	Brasil	HS_12_CO1
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>H. sciureus</i> *	Brasil	HS_13_CO1
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>H. sciureus</i> *	Brasil	HS_15_CO1
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>H. sciureus</i> *	Brasil	HS_16_CO1
<i>Schistosoma mansoni</i>	<i>H. sciureus</i> *	Brasil	HS_18_CO1
<i>Schistosoma mansoni</i>	NI	NI	NC_002545
<i>Schistosoma margrebowiei</i>	NI	Zâmbia	AY157206
<i>Schistosoma mattheei</i>	NI	Zâmbia	AY157211

<i>Schistosoma mekongi</i>	<i>Homo sapiens</i>	Laos	MT181752
<i>Schistosoma nasale</i>	NI	Sri Lanka	AY157205
<i>Schistosoma rodhaini</i>	<i>Mus musculus</i> (lab)	NI	AY157202
<i>Schistosoma rodhaini</i>	<i>Biomphalaria sudanica</i>	Quênia	AY446142
<i>Schistosoma rodhaini</i>	NI	Quênia	GU294838
<i>Schistosoma sinensium</i>	NI	China	AY157197
<i>Schistosoma spindale</i>	Bovino	NI	NC_008067
<i>Trichobilharzia regenti</i> <sup>a</sup>	<i>Radix peregra</i>	NI	NC_009680

a= grupo externo usado nas análises filogenéticas;

b= agora conhecida por pertencer ao gênero *Schistosoma*;

lab= cepa mantida em animais de laboratório, mas o hospedeiro original não foi informado;

\*= linhagem mantida em camundongos de laboratório, mas originalmente isolada de *H. sciureus*;

NI= não informado.

O modelo de evolução e seus parâmetros fixos foram escolhidos e estimados sob o critério de informação de Akaike, usando jModelTest 2 (GUINDON; GASCUEL, 2003; DARRIBA et al., 2012) e estão detalhados na **tabela III**. Suportes nodais de ML foram baseados em 1.000 replicações não paramétricas de bootstrap. Suportes nodais para valores de probabilidade posterior da inferência Bayesiana (BI) foram determinados após executar a cadeia de Markov Monte Carlo (2 corridas e 4 cadeias) por  $1 \times 10^6$  gerações, com frequência de amostragem a cada  $1 \times 10^3$  gerações e descartando o  $\frac{1}{4}$  inicial de árvores amostradas ( $1 \times 10^6$ ). O grupo externo escolhido foi a espécie *Trichobilharzia regenti* Horak, Dvorak e Kolarova, 1998, com base em filogenias prévias (WEBSTER et al., 2006).

**Tabela III.** Modelos de evolução e seus parâmetros fixos, escolhidos de acordo com o critério de informação de Akaike usando o software jModelTest, para as reconstruções filogenéticas do presente estudo, associadas ao seu respectivo conjunto de dados.

Conjunto de dados	Modelo evolutivo	Gamma shape	Proporção de sítios invariáveis	Frequência de nucleotídeos	Taxas de substituição
16S	TVM+G	0.3710	-	A=0.3094 C=0.0928 G=0.2251 T=0.3727	[AC]= 0.7205 [AG]= 6.0224 [AT]= 1.7765 [CG]= 0.0181 [CT]= 6.0224 [GT] = 1.0000
<i>cox1</i>	TVM+I+G	0.4310	0.3700	A = 0.2443 C = 0.0508 G = 0.1775 T = 0.5274	[AC]=0.9279 [AG]=10.7500 [AT]=0.7075 [CG]=3.3859 [CT]=10.7500 [GT]=1.0000

Também foram geradas matrizes de distâncias patrísticas de acordo com cada marcador genético, utilizando o software MEGA 7.0 (KUMAR et al., 2016), para avaliar divergências intra e interespecíficas entre amostras. O Kimura de dois parâmetros (K2P) (KIMURA, 1980) foi usado como métrica de distância.

## 2.7 Perfil parasitológico da linhagem HS de *S. mansoni* em condições de laboratório

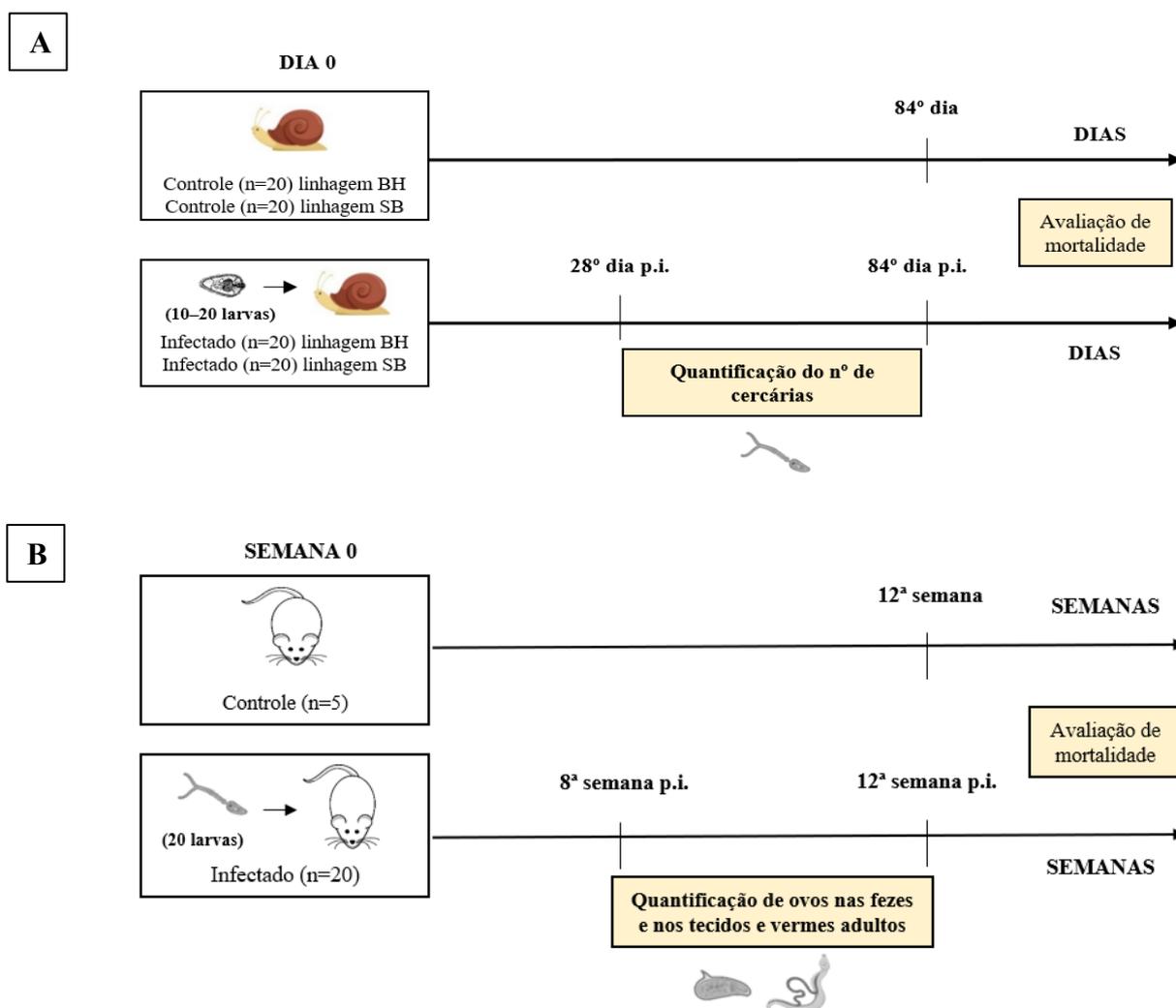
Após isolar a linhagem HS de *S. mansoni* e confirmar sua identificação específica por análise genética, o próximo passo foi descrever melhor o seu perfil parasitológico. Para tanto, realizamos infecções experimentais padronizadas em caramujos *B. glabrata* (linhagens BH e SB,

medindo 5-6mm), com três doses de infecção (10, 15 e 20 miracídios), seguindo o protocolo de infecção proposto por Standen (1952); bem como infecções experimentais em camundongos BALB/c machos (~ 20 gramas, 6–8 semanas de idade), com 20 cercárias por 500µL de solução salina (0,9% NaCl), que foi inoculada subcutaneamente (PELLEGRINO; MACEDO, 1956). A utilização dos camundongos para esse experimento foi previamente aprovada pelo Conselho de Ética e Experimentação Animal da UFMG nº 46/2019.

## 2.8 Delineamento experimental

O curso da infecção das diferentes doses de miracídio da linhagem HS de *S. mansoni* em *B. glabrata* (SB e BH) foi avaliado usando 8 grupos experimentais: 2 controles compostos por caramujos não infectados, um de cada linhagem (n = 20/grupo); e *B. glabrata* BH e SB infectados com três cargas diferentes de miracídios (10, 15 ou 20), sendo utilizado 20 caramujos de cada linhagem e por dose avaliada, totalizando 6 grupos. Os caramujos foram monitorados por até 84 dias, para avaliar a taxa de mortalidade e o número de cercárias eliminadas (grupos infectados) (**figura 17.A**).

Para avaliar a infecção em camundongos, foram criados dois grupos: um grupo controle composto por camundongos BALB/c não infectados (n=5), e um grupo infectado composto por camundongos BALB/c (n=20) infectados subcutaneamente com 20 cercárias da linhagem HS de *S. mansoni*. Os animais foram monitorados semanalmente por 12 semanas (84 dias) para avaliar a taxa de mortalidade e o número de ovos eliminados nas fezes (grupo infectado). Grupos de 8 a 10 camundongos infectados na fase aguda (8<sup>a</sup> semanas pi.) e crônica (12<sup>a</sup> semanas pi.) da esquistossomose, foram eutanasiados por sobredose anestésica (300 mg/kg de cetamina e 30 mg/kg de xilazina) e necropsiados para recuperação de vermes adultos, utilizando a técnica da perfusão do sistema circulatório. Além disso, pulmões, fígado, baço e intestinos foram removidos e processados para estimar o número de ovos retidos (**figura 17.B**).



**Figura 17. Delineamento experimental do capítulo I.** Descrição das metodologias utilizadas em caramujos *Biomphalaria glabrata* (BH e SB) infectados ou não (controle) com diferentes cargas (n=10-20) de miráciidios HS de *Schistosoma mansoni* (A) e em camundongos BALB/c infectados com 20 cercárias HS do mesmo parasito e seu respectivo grupo controle (não infectado) (B).

## 2.9 Mortalidade e produção cercária em *B. glabrata*

Grupos de caramujos infectados e controle foram observados semanalmente por 84 dias (12 semanas), nos quais os animais mortos foram contados por grupo e utilizados para a avaliação da curva de mortalidade. Durante este período, o número de cercárias eliminadas dos moluscos infectados também foi monitorado semanalmente de 28 a 84 dpi, a partir da técnica do fotoestímulo que foi previamente descrita (BRASIL, 2008). Duas alíquotas de 500µL dos poços contendo cercárias (em volume final de 6ml) foram misturadas com lugol e observadas ao microscópio óptico (Nikon), para quantificar a produção semanal dessas larvas, de acordo com a **fórmula I**, a seguir.

$$\boxed{\text{I}} \quad \underline{x} \cdot 12 = \text{número de cercárias por caramujo infectado}$$

= média do número de cercárias/alíquota;  
12 = fator de diluição.

## 2.10 Mortalidade e carga parasitária em camundongos BALB/c

Ao longo de 12 semanas de infecção, camundongos mortos dos grupos infectados e controle foram contados e utilizados para avaliação da curva de mortalidade. Animais com piloereção, perda expressiva de peso e sinais de apatia, como dificuldade de se alimentar, foram eutanasiados e também foram contabilizados. A carga parasitária foi estimada pelo número de vermes presentes no sistema circulatório e ovos eliminados nas fezes e retidos nos tecidos. As amostras fecais foram processadas para a contagem de ovos/g de fezes de modo análogo ao descrito por Negrão-Corrêa (2004). Para tanto, camundongos experimentalmente infectados entre 6 e 12 semanas pós-infecção, foram colocados individualmente em béqueres de plástico de 500mL, durante 10 minutos, para a coleta do material fecal, que foram inicialmente pesadas (Bioprecisa – FA2104N, Curitiba, Brasil). Em seguida, as fezes foram diluídas em dois mL de solução fisiológica (0,85% NaCl) à 4°C e homogeneizadas com um bastão de vidro. Em seguida, imediatamente foi acrescido 3mL de formol tamponado a 10%, resultando na morte e fixação do miracídio no interior dos ovos para realização da contagem. Duas alíquotas de 200µL de cada amostra contendo 5mL de volume final foram analisadas em microscópio óptico (Nickon eclipse E200) e a média do número de ovos por alíquota de fezes ( $\underline{x}$ ) foi extrapolado ao número total de ovos por grama de fezes, de acordo com a **fórmula II**, a seguir.

$$\boxed{\text{II}} \quad \frac{\underline{x} \cdot 25}{\text{gramas de fezes}} = \text{número de ovos/gramas de fezes}$$

= média do número de ovos/alíquota;  
25 = fator de diluição.

Vermes adultos da linhagem HS de *S. mansoni* presentes no sistema porta-hepático de camundongos foram recuperados e contabilizados conforme a técnica proposta por Pellegrino e Siqueira (1956), que foi previamente detalhada (**subitem 2.3**).

Para a recuperação e contabilização dos ovos retidos nos diferentes tecidos dos animais infectados, utilizou-se a técnica de digestão, descrita por Cheever (1968). Após a perfusão, os

pulmões, o fígado, o baço e os intestinos (delgado e grosso), foram retirados, armazenados em tubos de centrifugação de 15mL, picotados e digeridos individualmente em solução de hidróxido de potássio (KOH – 5% a 37 °C), por até quatro horas. O produto da digestão tecidual de cada animal foi centrifugado a 1000g por cinco minutos e o sobrenadante desprezado. O sedimento contendo os ovos foi lavado cinco vezes com solução fisiológica. Após as lavagens, o sedimento final foi ressuspendido em 5 mL de solução fisiológica contendo 10% de formaldeído e armazenado a 4 °C até a contagem dos ovos. Para a contagem, duas alíquotas de 200µL de cada amostra foram analisadas em microscópio óptico (Nikon eclipse E200) e a média do número de ovos por alíquota de solução de tecido digerido foi multiplicada pelo fator de diluição (conforme a **fórmula III**) e resultado final expresso em ovos/órgão (MAGGI et al., 2021).

$$\boxed{\text{III}} \quad \bar{x} \cdot 25 = \text{número de ovos por tecido digerido}$$

= média do número de ovos/alíquota;  
25 = fator de diluição.

## 2.11 Análise estatística

A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Dados contínuos com distribuição normal foram expressos como média e erro padrão, e os dados sem distribuição normal foram expressos como mediana e intervalo interquartil. As frequências de dados categóricos foram comparadas usando o teste exato de Fisher. Os dados da curva de sobrevivência foram analisados pelo teste de Log-Rank. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Essas análises juntamente com a construção gráfica foram realizadas nos softwares GraphPad Prism versão 8 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA) e STATA versão 11 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Isolamento de *Schistosoma* spp. a partir de *H. sciureus* naturalmente infectado

Conforme demonstrado anteriormente (DO CARMO-SILVA et al., 2019), foram realizadas 14 coletadas em campo nas áreas alagadas dos municípios de São Bento e Peri Mirim entre 2017–2018. Nesse período, foram coletados 99 *H. sciureus*, dos quais 45 apresentavam ovos nas fezes que se assemelham morfológicamente a ovos de *Schistosoma* (**tabela IV**). Durante a

necropsia, esses roedores apresentaram alterações patológicas macroscópicas no fígado, que são tipicamente induzidas pela infecção por *Schistosoma* (**figura 18A**). Vermes adultos recuperados do sistema porta hepático (**figura 18B**) e ovos observados em homogenato de fígado (**figura 18C**) de *H. sciureus* apresentaram a morfologia característica de espécies do gênero *Schistosoma*.



**Figura 18.** Infecção natural de *Schistosoma* sp. em *Holochilus sciureus* capturados no Estado do Maranhão, Brasil. **A.** Aspecto macroscópico da parte posterior dos lobos hepáticos, mostrando alterações características induzidas pela infecção por *S. mansoni*. **B.** Vermes adultos coletados do sistema circulatório hepático portal, com morfologia típica de *S. mansoni*. **C.** Ovo maduro obtido de homogenato de fígado, com aspecto morfológico clássico de *S. mansoni*, ressaltando a presença do espículo lateral (seta).

Quinze fígados de *H. sciureus* naturalmente infectados, coletados nos pontos 1, 3, 7 e 11 foram obtidos para este estudo (ver **figura 18** e **tabela IV**). Esses órgãos foram processados para isolar a linhagem de *Schistosoma* que infecta *H. sciureus* na região. Na primeira tentativa de isolar esta linhagem de esquistossomos, utilizamos fígados de *H. sciureus* capturados no ponto de coleta 1, localizado a 1.894 metros da área urbana do município de São Bento. Após o processamento, poucos miracídios viáveis foram obtidos dos fígados, permitindo apenas a infecção em massa de oito *B. glabrata* SB. Os caramujos foram examinados semanalmente até 70 dpi para detecção de cercárias; entretanto, todos permaneceram negativos para infecção por *Schistosoma* (**tabela IV**).

Na segunda tentativa de isolamento, utilizamos fígados de quatro animais, capturados no ponto de coleta 3 (3.267 metros de distância da área urbana). O processamento do fígado destes animais também resultou na recuperação de poucos miracídios; portanto, realizamos a infecção em massa de 27 *B. glabrata* SB. Adicionalmente, foi realizada uma infecção individual de dois exemplares de *B. glabrata* SB com cinco miracídios cada. O exame semanal de avaliação da eliminação de cercárias mostrou que a infecção pelo parasito bem sucedida de um *B. glabrata* exposto aos miracídios de forma individual. As cercárias recuperadas deste caramujo foram utilizadas (n=100 larvas/500µL soro fisiológico) para infectar três hamsters machos. Um hamster

morreu após oito semanas da infecção, e nos dois animais restantes foi confirmada a presença de ovos de *Schistosoma* nas fezes e vermes adultos no sistema circulatório hepático. Após o processamento do fígado desses dois animais, um grande número de miracídios foi obtido e utilizado para a infecção individual de 100 *B. glabrata* BH (15 miracídios/500uL de água sem cloro). Após 70 dias de avaliação parasitológica semanal, nenhuma cercária foi eliminada pelos caramujos (**tabela IV**).

Devido ao sucesso da infecção individual, esta técnica foi utilizada nas duas tentativas subsequentes para infectar caramujos *B. glabrata*, como forma de isolar a linhagem HS de *Schistosoma*. Na terceira tentativa, foram utilizados quatro fígados de *H. sciureus* naturalmente infectados coletados no ponto 7 (2.297 metros da área urbana). Poucos miracídios foram obtidos desses fígados, que foram utilizados para infectar dois *B. glabrata* SB, com seis larvas cada. No entanto, após sucessivas análises parasitológicas semanais, não houve eliminação de cercárias pelos moluscos (**tabela IV**).

Na quarta tentativa, foram utilizados fígados de quatro *H. sciureus* naturalmente infectados coletados no ponto de coleta 11 (2.060 metros da área urbana). Após o processamento do tecido, uma boa quantidade de miracídios foi recuperada e utilizada para infecção individual de 40 *B. glabrata* SB, com oito miracídios cada. Aos 56 dpi, seis dos 26 moluscos vivos (23%) começaram a eliminar cercárias. Em laboratório, esses caramujos foram examinados semanalmente e as cercárias recuperadas foram utilizadas para infecção individual de seis hamsters com cerca de 90 cercárias em cada. Essas cercárias também foram usadas para infecção em massa de cinco camundongos BALB/c (**tabela IV**). Sessenta e dois dpi (8 semanas), apenas um hamster apresentou fígado com lesões características decorrentes da infecção por *Schistosoma*. Após o processamento, vários miracídios foram obtidos deste fígado, e as larvas (n=8/caramujo) foram utilizadas para infecção individual de 30 *B. glabrata* BH. No entanto, após 80 dias de análises parasitológicas semanais, nenhum desses caramujos eliminaram cercárias (**tabela IV**). Por outro lado, todos os camundongos infectados em massa tinham fígados com lesões características da infecção por espécies do gênero *Schistosoma*. Vários miracídios foram obtidos desses fígados e usados para infecção individual de 18 *B. glabrata* SB, com 10–15 larvas em cada. Exames parasitológicos semanais mostraram que as cercárias foram eliminadas aos 35 dpi por quatro caramujos (4/18; 22%). Portanto, as infecções experimentais em camundongos BALB/c e *B. glabrata* SB, permitiram o isolamento bem sucedido da linhagem HS de *Schistosoma* em condições de laboratório (**tabela IV**).

**Tabela IV.** Detalhamento do isolamento de uma linhagem de *Schistosoma* obtida do roedor *Holochilus sciureus* naturalmente infectado, capturado nos municípios de São Bento e Peri Mirim, Maranhão, Brasil, áreas endêmicas para esquistossomose.

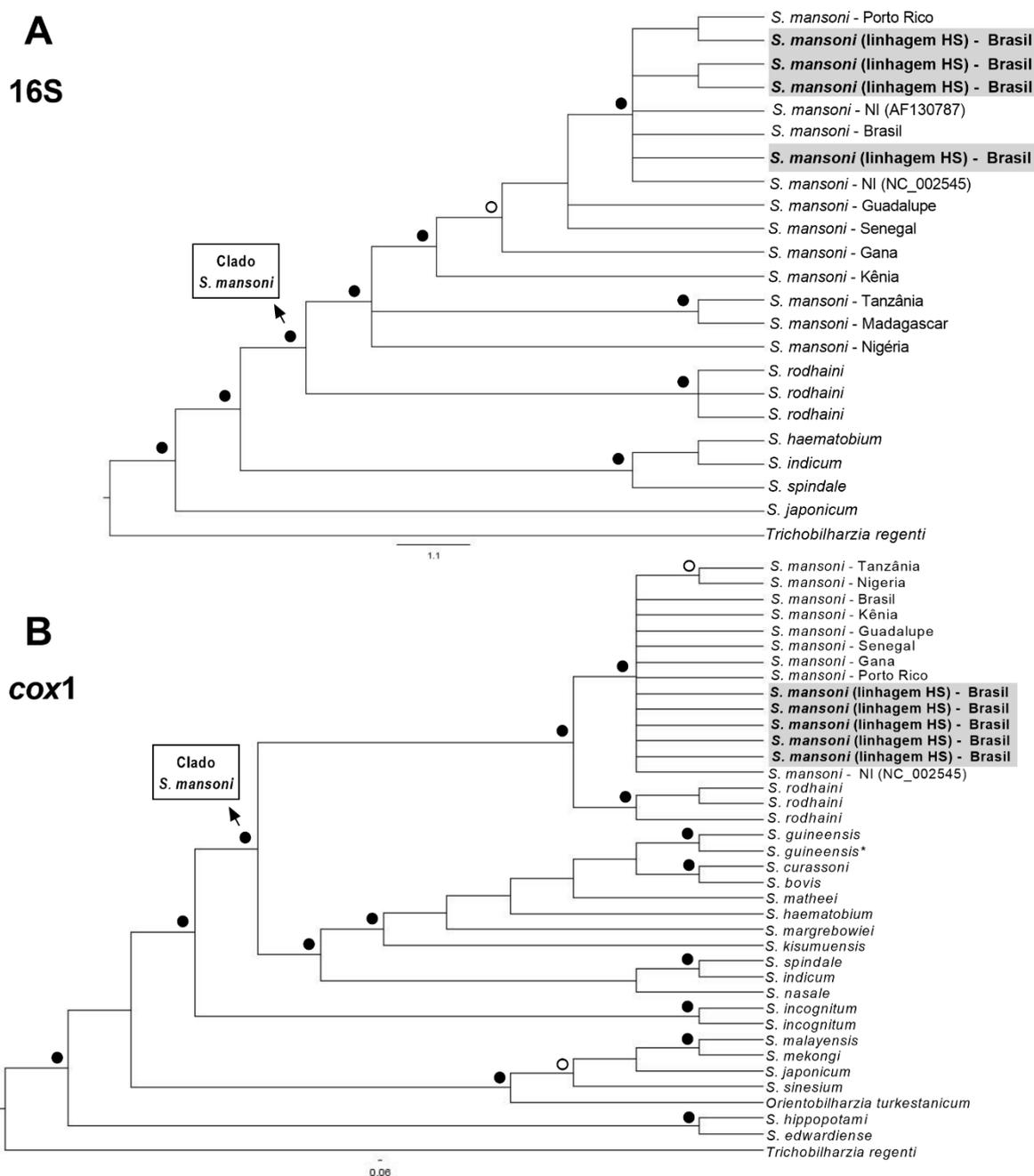
Pontos de coleta	Nº de <i>H. sciureus</i> capturados	Taxa de infecção N (%) <sup>a</sup>	Recuperação de miracídio/tipo de infecção	<i>B. glabrata</i> SB infectado <sup>b</sup>	Hamster infectado <sup>c</sup>	Camundongo BALB/c infectado <sup>c</sup>
P1=2°40'39.1"S 44°48'25.8"O	6	3 (50)	+ (em massa)	-	NR	NR
P2=2°40'43.0"S 44°49'07.1"O	7	4 (57,14)	NR	NR	NR	NR
P3=2°39'56.5"S 44°48'36.9"O	7	4 (57,14)	+ (individual/em massa)	+	+ *	NR
P4=2°40'14.2"S 44°48'51.4"O	7	3 (42,85)	NR	NR	NR	NR
P5=2°40'15.9"S 44°48'53.5"O	5	1 (20)	NR	NR	NR	NR
P6=2°40'19.2"S 44°48'56.6"O	8	4 (50)	NR	NR	NR	NR
P7=2°40'21.8"S 44°48'59.3"O	8	4 (50)	+ (individual)	-	NR	NR
P8=2°40'23.0"S 44°49'00.2"O	7	2 (28,57)	NR	NR	NR	NR
P9=2°40'24.1"S 44°49'00.9"O	8	5 (62,5)	NR	NR	NR	NR
P10=2°40'27.1"S 44°49'03.2"O	7	3 (42,85)	NR	NR	NR	NR
P11=2°40'28.5"S 44°49'04.1"O	8	4 (50)	+ (individual)	+	+ *	+
P12=2°40'28.3"S 44°49'04.4"O	6	2 (33,33)	NR	NR	NR	NR
P13=2°40'29.6"S 44°49'04.9"O	7	3 (42,85)	NR	NR	NR	NR
P14=2°41'03.7"S 44°49'17.8"O	8	2 (25)	NR	NR	NR	NR

<sup>a</sup>= baseado na presença de vermes adultos, em alterações macroscópicas do fígado e na presença de ovos nesse tecido; <sup>b</sup>=baseado na eliminação de cercárias; <sup>c</sup>= baseado na presença de ovos nas fezes. \*não foi possível continuar o isolamento da linhagem HS de *Schistosoma*. SB = São Bento (município), local de procedência de *B. glabrata* utilizado para o isolamento da linhagem de *Schistosoma* obtido de *H. sciureus*. NR: procedimento não realizado.

### 3.2 Caracterização genética e análises filogenéticas

Quatro sequências do mtDNA 16S (671–695bp) e cinco do *cox1* (657–708bp) foram obtidas de adultos de *Schistosoma mansoni* HS, mostrando 100% de similaridade genética entre elas e com sequências de *S. mansoni* depositados no GenBank, de diferentes origens geográficas. Reconstruções filogenéticas usando ML e BI mostraram padrões semelhantes de suporte nodal e topologia de árvore; portanto, apenas as árvores BI foram aqui representadas (**figura 19.A e B**). Árvores geradas de ambas as regiões genéticas agruparam todas as sequências de *S. mansoni*, incluindo as recém-isoladas de *H. sciureus*, em um grupo monofilético com alto suporte nodal, bem como colocaram *S. rodhaini* como um grupo irmão (**figura 19.A e B**). No entanto, o clado de *S. mansoni* formou uma politomia na árvore gerada para a região *cox1*, enquanto que para a região 16S, ele foi dividido em diferentes grupos (**figura 19.A**). Nesse sentido, as nossas sequências agruparam-se com linhagens de *S. mansoni* do Novo Mundo, ou seja, Porto Rico e Brasil. Além disso, outros isolados de *S. mansoni* formaram linhagens monofiléticas bem suportadas, como os de Gana, Quênia e Nigéria, bem como os da Tanzânia associados com Madagascar (**figura 19.A**).

As distâncias patrísticas entre as atuais sequências da linhagem HS de *S. mansoni* para 16S e *cox1* foram nulas ( $P=0$ ), indicando 100% de similaridade entre elas, conforme comentado anteriormente (**ver figuras 20 e 21**). Em relação à região 16S, sequências de *S. mansoni* da Tanzânia ( $P=0,033$ ), Madagascar ( $P=0,031$ ), Nigéria ( $P=0,029$ ), Quênia ( $P=0,009$ ), Gana ( $P=0,007$ ), Senegal ( $P = 0,004$ ) e Guadalupe ( $P=0,002$ ) apresentaram valores de K2P diferentes de 0 quando comparados às sequências obtidas para a linhagem HS de *S. mansoni*. Por outro lado, as sequências do Brasil, Porto Rico e outras duas amostras com origens geográficas não identificadas (AF130787 e NC\_002545), apresentaram distâncias nulas ( $P=0$ ), quando comparadas com as nossas sequências obtidas neste estudo (**figura 20**). Em relação à região *cox1*, sequências de *S. mansoni* da Tanzânia ( $P=0,045$ ), Nigéria ( $P=0,034$ ), Senegal ( $P=0,003$ ) e Gana ( $P=0,003$ ) apresentaram valores de K2P diferentes de 0 quando comparados com as sequências obtidas em nosso estudo. No entanto, sequências de *S. mansoni* de Porto Rico, Guadalupe, Brasil, Quênia e de uma amostra de origem não identificada (NC\_002545), apresentaram valores nulos de distância patrística ( $P=0$ ), quando comparadas com as atuais sequências da linhagem HS de *S. mansoni* (**figura 21**).



**Figura 19. Árvores geradas por inferência Bayesiana de seqüências de regiões genéticas de mtDNA 16S (A) e *cox1* (B) de Schistosomatidae.** Os círculos cheios indicam suportes nodais > 0,96 de probabilidade posterior Bayesiana (BPP) (cadeia de Markov Monte Carlo, cadeias = 4, corridas = 2, gerações =  $1 \times 10^6$ , frequência de amostragem =  $1 \times 10^6$ , “burnin” em fração = 25%) e > 90% de máxima verossimilhança (ML), com base em 1.000 replicações de bootstrap não paramétricas. Os círculos vazios indicam valores entre 0,90-0,96 para BPP e 70-90% para ML. Valores de BPP e ML abaixo dos descritos (suportes nodais baixos) não foram indicados e não foram aceitos. As seqüências obtidas no presente estudo estão em negrito e destacadas em cinza.

Parasite species - geographic origin (Genbank number)	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
<i>Trichobilharzia regentei</i> - NI (NC_009680)																						
<i>Schistosoma japonicum</i> - NI (KU196336)	0,636																					
<i>Schistosoma indicum</i> - Bangladesh (KU196336)	1,120	0,553																				
<i>Schistosoma spindale</i> - NI (NC_008067)	0,922	0,543	0,160																			
<i>Schistosoma haematobium</i> - NI (DQ157222)	1,114	0,639	0,230	0,257																		
<i>Schistosoma rodhaini</i> - Kenya (AF531309)	0,876	0,673	0,506	0,374	0,346																	
<i>Schistosoma rodhaini</i> - Kenya (AY446264)	0,876	0,673	0,506	0,374	0,346	0,000																
<i>Schistosoma rodhaini</i> - Kenya (AY446265)	0,876	0,673	0,506	0,374	0,346	0,000	0,000															
<i>Schistosoma mansoni</i> - Tanzania (AY446241)	0,934	0,627	0,412	0,369	0,355	0,136	0,136	0,136														
<i>Schistosoma mansoni</i> - Madagascar (AY446261)	0,934	0,616	0,412	0,369	0,355	0,133	0,133	0,133	0,002													
<i>Schistosoma mansoni</i> - Nigeria (AY896581)	0,915	0,587	0,371	0,344	0,344	0,133	0,133	0,133	0,026	0,024												
<i>Schistosoma mansoni</i> - Kenya (AY446210)	0,995	0,627	0,366	0,330	0,345	0,144	0,144	0,144	0,035	0,033	0,019											
<i>Schistosoma mansoni</i> - Ghana (AY896607)	0,955	0,624	0,385	0,348	0,350	0,147	0,147	0,147	0,033	0,031	0,024	0,009										
<i>Schistosoma mansoni</i> - Senegal (AY896594)	1,008	0,646	0,378	0,354	0,344	0,140	0,140	0,140	0,037	0,035	0,029	0,009	0,007									
<i>Schistosoma mansoni</i> - Guadeloupe (AY446211)	0,990	0,635	0,378	0,354	0,344	0,144	0,144	0,144	0,035	0,033	0,027	0,007	0,005	0,002								
<i>Schistosoma mansoni</i> - Brazil (AY446205)	0,990	0,624	0,378	0,354	0,338	0,140	0,140	0,140	0,033	0,031	0,029	0,009	0,007	0,004	0,002							
<i>Schistosoma mansoni</i> - NI (AF130787)	0,990	0,624	0,378	0,354	0,338	0,140	0,140	0,140	0,033	0,031	0,029	0,009	0,007	0,004	0,002	0,000						
<i>Schistosoma mansoni</i> - Puerto Rico (HE601612)	0,990	0,624	0,378	0,354	0,338	0,140	0,140	0,140	0,033	0,031	0,029	0,009	0,007	0,004	0,002	0,000	0,000					
<i>Schistosoma mansoni</i> - NI (NC_002545)	0,990	0,624	0,378	0,354	0,338	0,140	0,140	0,140	0,033	0,031	0,029	0,009	0,007	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000				
<i>Schistosoma mansoni</i> HS 7	0,990	0,624	0,378	0,354	0,338	0,140	0,140	0,140	0,033	0,031	0,029	0,009	0,007	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000			
<i>Schistosoma mansoni</i> HS 12	0,990	0,624	0,378	0,354	0,338	0,140	0,140	0,140	0,033	0,031	0,029	0,009	0,007	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	
<i>Schistosoma mansoni</i> HS 13	0,990	0,624	0,378	0,354	0,338	0,140	0,140	0,140	0,033	0,031	0,029	0,009	0,007	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
<i>Schistosoma mansoni</i> HS 15	0,990	0,624	0,378	0,354	0,338	0,140	0,140	0,140	0,033	0,031	0,029	0,009	0,007	0,004	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Figura 20. Matriz pairwise gerada entre as sequências de *Schistosoma* utilizadas neste estudo para a região 16S.

Parasite species - geografic origin (Genbank number)	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0	11,0	12,0	13,0	14,0	15,0	16,0	17,0	18,0	19,0	20,0	21,0	22,0	23,0	24,0	25,0	26,0	27,0	28,0	29,0	30,0	31,0	32,0	33,0	34,0	35,0	36,0	37,0	38,0	
<i>Trichobilharzia regenti</i> - NI (NC_009680)																																						
<i>Schistosoma sinensium</i> - China (AY157197)	0,5																																					
<i>Orientobilharzia turkestanicum</i> - China (EU436657)	0,6	0,4																																				
<i>Schistosoma hippopotami</i> - Uganda (AY197346)	0,5	0,4	0,5																																			
<i>Schistosoma incognitum</i> - Thailand (AY157201)	0,5	0,6	0,5	0,5																																		
<i>Schistosoma japonicum</i> - China (KU196336)	0,4	0,3	0,4	0,3	0,5																																	
<i>Schistosoma malayensis</i> - Malaysia (AY157198)	0,5	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2																																
<i>Schistosoma incognitum</i> - India (JQ408708)	0,5	0,5	0,4	0,5	0,2	0,4	0,4																															
<i>Schistosoma curassoni</i> - Senegal (AY157210)	0,6	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5																														
<i>Schistosoma bovis</i> - Tanzania (AY157212)	0,6	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	0,1																													
<i>Schistosoma margrebowiei</i> - Zambia (AY157206)	0,5	0,6	0,5	0,4	0,5	0,4	0,4	0,6	0,2	0,2																												
<i>Schistosoma indicum</i> - Bangladesh (NC_047240)	0,6	0,6	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3																											
<i>Schistosoma guineensis</i> - Sao Tome and Principe (AJ519517)	0,5	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,1	0,1	0,2	0,3																										
<i>Schistosoma intercalatum</i> - Sao Tome and Principe (AY157208)	0,5	0,6	0,4	0,5	0,4	0,4	0,4	0,5	0,1	0,1	0,2	0,3	0,0																									
<i>Schistosoma edwardiense</i> - Uganda (AY197347)	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,4	0,5	0,5	0,5	0,4	0,5	0,5																								
<i>Schistosoma kisuumuensis</i> - Kenya (FJ897158)	0,6	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,2	0,2	0,2	0,3	0,2	0,2	0,4																							
<i>Schistosoma mekongi</i> - Laos (MT181752)	0,5	0,3	0,4	0,4	0,5	0,2	0,1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,5	0,4	0,4	0,3	0,4																						
<i>Schistosoma spindale</i> - NI (MT181752)	0,7	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3	0,3	0,5	0,3	0,5																					
<i>Schistosoma nasale</i> - Sri Lanka (AY157205)	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,4	0,3																				
<i>Schistosoma haematobium</i> - NI (DQ157222)	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,2	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,4	0,1	0,3	0,3	0,2																			
<i>Schistosoma mattheei</i> - Zambia (AY157211)	0,6	0,5	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2	0,4	0,3	0,3	0,2																		
<i>Schistosoma rodhaini</i> - Kenya (GU294838)	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	
<i>Schistosoma rodhaini</i> - Kenya (AY446142)	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Schistosoma rodhaini</i> - NI (AY157202)	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Schistosoma mansoni</i> - Tanzania (AY446119)	0,6	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Schistosoma mansoni</i> - Nigeria (AY896620)	0,6	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Schistosoma mansoni</i> - Senegal (AY896620)	0,7	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Schistosoma mansoni</i> - Ghana (AY896646)	0,7	0,6	0,5	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Schistosoma mansoni</i> - Puerto Rico (HE601612)	0,7	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Schistosoma mansoni</i> - Brazil (AY446083)	0,7	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Schistosoma mansoni</i> - Kenya (AY446088)	0,7	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Schistosoma mansoni</i> - Guadeloupe (AY446089)	0,7	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<i>Schistosoma mansoni</i> - NI (NC_002545)	0,7	0,6	0,5	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
<b><i>Schistosoma mansoni</i> HS 12</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>																																	
<b><i>Schistosoma mansoni</i> HS 13</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>																																	
<b><i>Schistosoma mansoni</i> HS 15</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>																																	
<b><i>Schistosoma mansoni</i> HS 16</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>																																	
<b><i>Schistosoma mansoni</i> HS 18</b>	<b>0,7</b>	<b>0,6</b>	<b>0,5</b>	<b>0,4</b>	<b>0,3</b>																																	

Figura 21. Matriz pairwise gerada entre as sequências de *Schistosoma* utilizadas neste estudo para a região *cox1*.

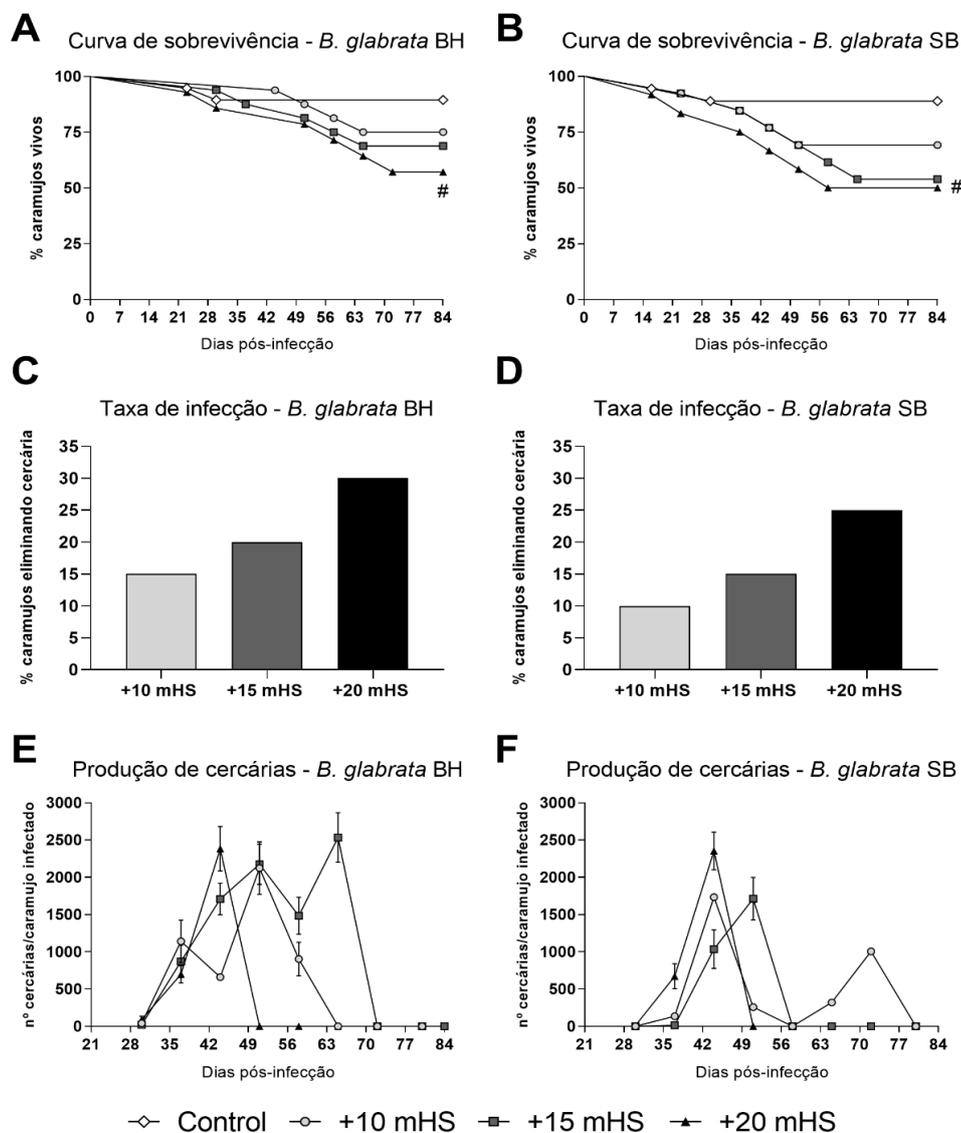
### 3.3 Interação parasito-hospedeiro entre *S. mansoni* HS e *B. glabrata*

A **figura 22** mostra as curvas de sobrevivência de *B. glabrata* BH e SB, durante a infecção com doses crescentes de miracídios (10, 15 ou 20 miracídios/caramujo) de *S. mansoni* da linhagem HS. Em geral, a mortalidade nos grupos infectados iniciou-se entre 15–20 dpi (período estimado para migração de esporocistos secundários), e intensificou-se após 30–40 dpi (período de formação e liberação de cercárias) (**figura 22.A e B**). Em ambas as linhagens de *B. glabrata* avaliadas, a taxa de mortalidade induzida pela infecção por *S. mansoni* HS foi dose-dependente em relação à quantidade de miracídios utilizada (**figura 22.A e B**). Em *B. glabrata* BH, a infecção com 20 miracídios foi a única que induziu uma taxa de mortalidade significativamente maior que a do controle (**figura 22.A**). Além da dose de 20 miracídios, àquela com 15 miracídios também foi capaz de causar maior mortalidade em *B. glabrata* SB, quando comparado ao controle (**figura 22.B**). Além disso, a mortalidade iniciou antes em *B. glabrata* SB, aos 15 dpi, quando comparada com *B. glabrata* BH, cuja mortalidade iniciou após 20 dpi.

A suscetibilidade de ambas as linhagens de moluscos à infecção experimental com *S. mansoni* HS também aumentou seguindo um padrão dose-dependente, embora a proporção de moluscos infectados (eliminando cercárias) tenha sido sempre maior em *B. glabrata* BH, mas sem diferenças estatísticas. Nesta linhagem, a porcentagem de moluscos que eliminaram cercárias aumentou de 15%, em moluscos infectados com 10 miracídios, até 30% em moluscos infectados com 20 miracídios (**figura 22.C**), enquanto que na linhagem SB a taxa de suscetibilidade variou de 10 a 25%, dependendo da dose de miracídios utilizada para a infecção (**figura 22.D**).

A eliminação de cercárias foi detectada primeiramente aos 30 dpi em *B. glabrata* BH, independentemente da dose infectante (**figura 22.E**). No entanto, a cinética de eliminação cercariana foi dependente da dose infectante. *B. glabrata* BH infectados com 20 miracídios apresentaram um pico de eliminação de cercárias aos 44 dpi e nenhuma larva foi detectada após 51 dpi; entretanto, caramujos infectados com 10 ou 15 miracídios apresentaram pico máximo de eliminação de cercárias após 51 dpi. Os caramujos BH infectados com 15 miracídios foram capazes de manter a eliminação cercariana por mais tempo, até 65 dpi. Após 80 dpi, não houve eliminação de larvas por *B. glabrata* BH. Da mesma forma, *B. glabrata* SB infectado com 20 miracídios, iniciou a eliminação cercariana aos 30 dpi, atingindo um pico aos 44 dpi. Os caramujos SB infectados com 15 miracídios apresentaram um pico de eliminação cercariana aos 51 dpi (**figura 22.D**). Interessantemente, *B. glabrata* SB infectados com 10 miracídios

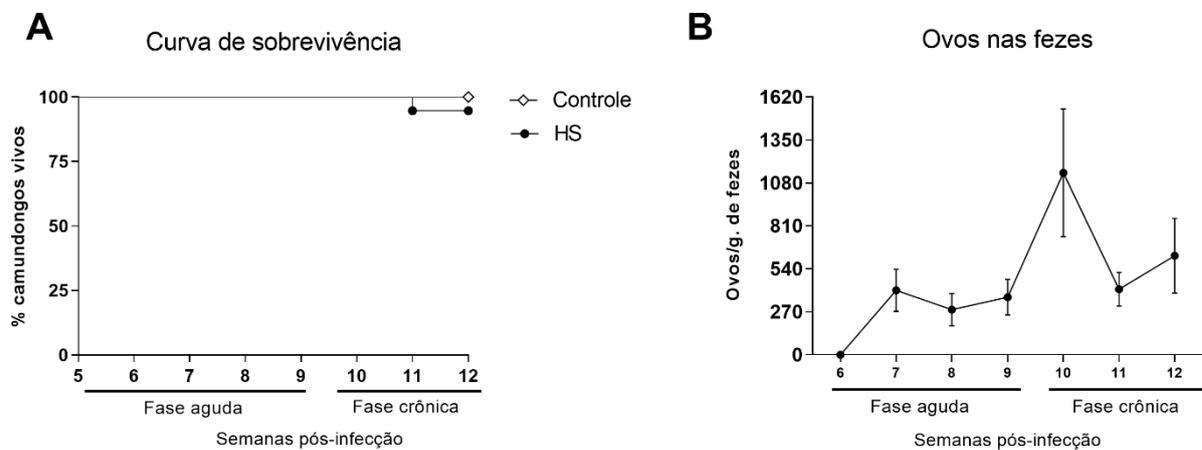
apresentaram dois picos de eliminação de cercárias, um inicial aos 44 dpi e outro tardio aos 72 dpi (figura 22.D).



**Figura 22. Parâmetro de infectividade da infecção experimental com *Schistosoma mansoni* da linhagem HS em *Biomphalaria glabrata* BH (linhagem alopátrica) e SB (linhagem simpátrica).** Curva de sobrevivência de *Biomphalaria glabrata* BH (A) e SB (B) não infectadas (grupo controle) e experimentalmente infectados com 10, 15 ou 20 miracídeos da linhagem HS de *S. mansoni*. Taxa de infecção (%) de caramujos *B. glabrata* BH (C) ou SB (D) infectados com diferentes doses (10, 15 ou 20 miracídeos/caramujo) da linhagem HS de *S. mansoni*. Número de cercárias eliminadas por *B. glabrata* BH (E) e SB (F) durante a infecção experimental com diferentes doses (10, 15 ou 20 miracídeos/caramujo) da cepa linhagem HS de *S. mansoni*. Os caramujos foram infectados individualmente com 10 (representada pela cor cinza claro ou pelo símbolo do círculo), 15 (cor cinza escuro ou símbolo do quadrado) ou 20 (cor preta ou símbolo do triângulo) miracídeos da linhagem HS de *S. mansoni* e examinados semanalmente por 84 dias de infecção. Os dados representam valores de 20 caramujos/grupo. Os dados de produção de cercárias foram expressos em média e erro padrão. A curva de sobrevivência foi analisada pelo teste Log-Rank e o símbolo # indica valor estatisticamente diferente em relação ao grupo controle (não infectado). mHS = miracídio da linhagem HS de *S. mansoni*.

### 3.4 Interação parasito-hospedeiro entre *S. mansoni* HS e camundongos BALB/c

Durante o monitoramento de camundongos não infectados (controle) e infectados experimentalmente por 12 semanas (84 dias) ocorreram duas mortes (20%) em camundongos cronicamente infectados (**figura 23.A**). A eliminação de ovos de *S. mansoni* da linhagem HS nas fezes estava ausente das amostras fecais em 40–42 dpi. Os ovos nas fezes foram confirmados somente após 50 dpi., atingindo um pico aos 70 dpi. (início da fase crônica). Após esse período, o número de ovos eliminados reduziu e permaneceu semelhante ao observado na fase aguda da infecção (**figura 23.B**).



**Figura 23. Taxa de mortalidade e carga parasitária em camundongos BALB/c.** Curva de sobrevivência (A) e número de ovos eliminados nas fezes (B) de camundongos BALB/c não infectados e infectados experimentalmente pela linhagem HS de *Schistosoma mansoni*. Camundongos BALB/c foram infectados por via subcutânea com 20 cercárias de *S. mansoni* da linhagem HS do parasito e foram monitorados por 12 semanas (84 dias). O teste Log-Rank foi aplicado para comparar as curvas de mortalidade nos grupos controle e infectado, sem diferenças significativas entre eles. Os dados de eliminação de ovos nas fezes foram expressos como média e erro padrão.

Após a perfusão do sistema circulatório dos animais experimentalmente infectados pela linhagem HS de *S. mansoni*, durante as fases aguda e crônica da infecção, foram recuperados um total de  $2,8 \pm 1,2$  e  $2,5 \pm 0,46$  vermes adultos/camundongo, respectivamente. Esses números representam cerca de 12,5–14% da dose total de cercárias inoculadas (**tabela II**). Além disso, foi possível observar que o número de vermes adultos machos foi maior que o de fêmeas, nos dois estágios da doença, mas sem diferenças estatísticas (**tabela II**). A proporção de vermes fêmeas em relação ao número de vermes machos foi de 1:1,15 e 1:2,33 nas fases aguda e crônica, respectivamente. O número de ovos do parasito retidos nos intestinos e do fígado aumenta progressivamente entre a fase aguda e crônica da infecção experimental (**tabela VII**).

Por outro lado, no pulmão e baço a retenção de ovos do parasito foi baixa e irregular. No baço a retenção de ovos foi constatada na fase aguda, em apenas dois animais (20%). Nos pulmões, a retenção de ovos foi observada apenas na fase crônica, também em apenas dois animais (25%).

**Tabela V.** Número de vermes adultos recuperados do sistema circulatório e número de ovos retidos em diferentes órgãos de camundongos BALB/c infectados experimentalmente pela linhagem HS de *Schistosoma mansoni*.

<b>Vermes adultos recuperados <sup>a</sup></b>		
	<b>Fase aguda (n=10)</b>	<b>Fase crônica (n=8)</b>
<b>Machos</b>	1,5 ± 0,64	1,75 ± 0,37
<b>Fêmeas</b>	1,3 ± 0,58	0,75 ± 0,46
<b>Total</b>	2,8 ± 1,2	2,5 ± 0,46
<b>Ovos retidos <sup>b</sup></b>		
	<b>Fase aguda (n=10)</b>	<b>Fase crônica (n=8)</b>
<b>Pulmão</b>	0	0 (0-25)
<b>Baço</b>	0 (0-6,25)	50 (6,25-168,8)
<b>Fígado</b>	1.613 (956,3-1.969)	1.875 (1.035-3.556)
<b>Intestino</b>	3.175,5 (1.506-6.700)	4.975 (3.556-8.956)

Dados apresentados na forma de média e erro padrão (<sup>a</sup>) e mediana e intervalo interquartil (<sup>b</sup>)

#### 4. DISCUSSÃO

Diversos trabalhos (THÉRON et al., 1992; REY, 1993; MIRANDA et al., 2017; CATALANO et al., 2018) demonstram que espécies de roedores silvestres também são suscetíveis à infecção natural por *S. mansoni*, o que pode impactar no controle efetivo da esquistossomose. No Brasil, os principais roedores silvestres frequentemente encontrados com altas taxas de infecção natural são *H. sciureus* e *N. squamipes* (REY, 1993; GENTILE et al., 2010; MIRANDA et al., 2017). Estudos anteriores mostraram que esses animais têm alta tolerância à patologia da esquistossomose (SILVA; ANDRADE, 1989; AMARAL et al., 2016; MIRANDA et al., 2019) e eliminam um grande número de ovos viáveis em suas fezes (PIVA, 1966; DIAS et al. al., 1978; PICOT, 1992; SOUZA et al., 1992); entretanto, pouco se sabe sobre a biologia e a diversidade genética das linhagens do parasito que infectam esses roedores. No presente estudo, descrevemos o processo de isolamento de *S. mansoni* obtido de *H. sciureus* naturalmente infectado (linhagem HS) capturado em uma área endêmica para esquistossomose no Nordeste do Brasil. A caracterização genética do parasito isolado de *H. sciureus* confirmou a identificação específica de *S. mansoni* e sua similaridade genética com outros parasitos

isolados do Brasil, Porto Rico, Guadalupe e Quênia. Além disso, a linhagem HS de *S. mansoni* pode ser mantida em condições de laboratório usando uma população simpátrica de *B. glabrata* (linhagem SB), como hospedeiro intermediário, e camundongos BALB/c, mas não hamsters, como hospedeiro definitivo.

Embora estudos anteriores tenham demonstrado a existência de diferentes linhagens de *S. mansoni* isoladas de humanos que vivem em diferentes regiões geográficas (WARREN et al., 1967; ANDERSON; CHEEVER, 1972; MARTINEZ et al., 2003; EUZÉBIO et al. 2012), o conhecimento sobre as características parasitológicas, genéticas e patológicas de isolados de parasitas obtidos de roedores silvestres permanece incerto e pode impactar na gravidade da esquistossomose em humanos. Portanto, o isolamento e caracterização laboratorial de linhagens de *S. mansoni* obtidas desses outros hospedeiros vertebrados, é essencial para melhor avaliar a diversidade deste parasito e seu papel na esquistossomose humana. Neste estudo, conseguimos isolar com sucesso a linhagem HS de *S. mansoni* apenas quando *B. glabrata* de populações simpátricas – SB foram usados como hospedeiros intermediários. De fato, existem diferentes níveis de compatibilidade entre caramujos e esquistossomos de diferentes regiões geográficas, sendo as interações simpátricas mais compatíveis que as alopátricas (LIVELY, 1989; PORTET et al., 2019). Além disso, possíveis alterações genéticas de *S. mansoni* recuperados de *H. sciureus* também podem gerar modificações na compatibilidade do parasito com diferentes linhagens de caramujos e espécies de hospedeiros vertebrados. Curiosamente, ao contrário da grande maioria dos estudos que mostram que os hamsters são bons modelos para a manutenção de *S. mansoni* em condições de laboratório (MOORE et al., 1949; CHEEVER et al., 2002; LOMBARDO et al., 2019), miracídios de hamsters infectados não produziram cercárias após a infecção de *B. glabrata* e não nos permitiu manter o desenvolvimento do parasito em condições de laboratório usando esse modelo experimental. Esses dados sugerem que linhagens de *S. mansoni* que infectam naturalmente *H. sciureus* podem afetar a transmissão da esquistossomose.

Outro ponto importante que deve ser discutido é o fato de não termos conseguido isolar *S. mansoni* da maioria dos *H. sciureus* infectados que capturamos (ver **tabela IV**). Embora *S. mansoni* seja a única espécie de esquistossomo encontrada em roedores silvestres coletados no Brasil até o momento (MORGAN et al., 2005), existe a possibilidade de *S. rodhaini* ou híbridos de *S. mansoni*/*S. rodhaini* também terem chegado às Américas, em roedores naturalmente infectados que habitavam os navios utilizados para o tráfico de escravos (MARR; CATHEY, 2010; ETOUGBÉTCHÉ et al., 2020) durante os séculos XVII-XIX (CRELLEN et al. 2016). Portanto, nossas tentativas mal sucedidas de isolar esquistossomos de *H. sciureus* capturados

no Estado do Maranhão, Brasil, podem indicar a ocorrência de uma grande variedade do parasito nesta região (por exemplo, novos genótipos, híbridos e espécies), o que precisa ser melhor investigado com estudos genéticos utilizando amostras coletadas em campo.

No presente estudo, também usamos marcadores genéticos das regiões genéticas *cox1* e 16S, para confirmar a espécie de *Schistosoma* que isolamos de *H. sciureus* e descrever sua relação filogenética com outras espécies de esquistossomos. Confirmando os dados morfológicos de ovos e vermes obtidos de infecções naturais de *H. sciureus*, as sequências obtidas de vermes machos adultos recuperados de BALB/c infectados experimentalmente indicaram 100% de homologia com sequências de *S. mansoni*. Embora nossos dados para a região genética *cox1* tenham gerado um clado politômico entre todas as sequências de *S. mansoni* avaliadas, a reconstrução filogenética usando a região 16S demonstrou a formação de diferentes grupos. Portanto, as sequências da linhagem HS de *S. mansoni* foram agrupadas com isolados de Porto Rico e Brasil, o que está de acordo com estudos anteriores que demonstram a similaridade entre isolados de *S. mansoni* das Américas (MORGAN et al. 2005; WEBSTER et al. 2013). Além disso, a grande similaridade da linhagem HS de *S. mansoni* com outros isolados do parasito de humanos e caramujos no Brasil e Porto Rico, também favorece a hipótese de que há intercâmbio de infecção parasitária entre humanos e roedores nessas regiões. Adicionalmente, os valores de K2P obtidos para as sequências *cox1* demonstraram que a linhagem HS de *S. mansoni* possui grande similaridade com isolados humanos do parasito provenientes do Quênia, África Oriental. Atualmente, há fortes evidências de que *S. mansoni* chegou ao Novo Mundo entre os séculos XVI e XIX através do tráfico de negros escravizados trazidos da África Ocidental (LOCKYER et al., 2003; MORGAN et al., 2005; CRELLEN et al., 2016). Entretanto, estudos filogenéticos prévios também mostraram que isolados de *S. mansoni* das Américas apresentavam grande similaridade com parasitos isolados da África Oriental (MORGAN et al., 2013; CRELLEN et al., 2016), como também da África Central (PLATT et al., 2022). Esses achados sugerem que *S. mansoni* possa ter chegado no Novo Mundo a partir de diferentes regiões geográficas da África.

Após isolamento e caracterização genética, investigamos ainda os aspectos parasitológicos da infecção pela linhagem HS de *S. mansoni* em caramujos *B. glabrata* das linhagens SB (simpátricas) e BH (alopátricas), bem como em camundongos BALB/c. Nossos dados demonstraram que camundongos BALB/c foram totalmente suscetíveis à infecção, pois todos os camundongos que foram inoculados com as cercárias desenvolveram vermes adultos e apresentam ovos do parasito nas fezes, e a evolução da esquistossomose experimental apresentou padrões parasitológicos clássicos àqueles previamente demonstrados em

camundongos infectados por outras linhagens de *S. mansoni* (ANDERSON; CHEEVER, 1972; ALVES et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2022), incluindo o início da eliminação de ovos nas fezes por volta da 6ª semana de infecção e o aumento progressivo do número de ovos retidos nos tecidos, principalmente no fígado e intestinos. No entanto, apenas 12,5% das cercárias inoculadas foram recuperadas como vermes adultos, e essa taxa de recuperação foi muito menor quando comparada a camundongos infectados por outras linhagens de *S. mansoni* (WARREN et al., 1967; ANDERSON; CHEEVER, 1972; MARTINEZ et al., 2003; FREIRE et al., 1967; ANDERSON; CHEEVER, 1972; MARTINEZ et al., 2003; FREIRE et al., 2003), o que indica que a linhagem HS de *S. mansoni* ainda está em processo de adaptação no hospedeiro vertebrado que utilizamos no laboratório ou que camundongos BALB/c ainda não proporcionam um ambiente totalmente favorável para o desenvolvimento desta linhagem.

Durante o processo de isolamento do parasito, obtivemos cercárias viáveis de *S. mansoni* da linhagem HS apenas na infecção experimental utilizando *B. glabrata* SB (simpátrico) como hospedeiro intermediário. No entanto, após o estabelecimento do parasito em camundongos, os miracídios foram capazes de infectar ambas as linhagens de *B. glabrata*, a SB e a BH. Além disso, a infecção experimental em *B. glabrata* SB resultou em uma maior taxa de mortalidade em relação à infecção experimental utilizando a linhagem BH de *B. glabrata* (alopátrica), principalmente em doses mais altas de infecção. Nossos achados estão de acordo com Bastos et al. (1982), que demonstraram que um isolado de *S. mansoni* obtido de roedores silvestres também coletados em São Bento, Maranhão, induziu maior mortalidade em caramujos *B. glabrata* de populações simpátricas, sugerindo que a interação entre *S. mansoni* de roedores silvestres e *B. glabrata* poderia ser mais recente na região. Embora as taxas de infecção tenham sido semelhantes entre as duas populações de moluscos, a alta taxa de mortalidade apresentada para *B. glabrata* SB poderia sugerir uma alta suscetibilidade à infecção pela linhagem HS, pois estaria permitindo maior multiplicação assexuada de esporocistos e, conseqüentemente, maiores danos ao caramujo (GUARALDO et al. 1981; PORTET et al. 2019). Entretanto, mais experimentos são necessários para desvendar o desenvolvimento intra molusco da linhagem HS de *S. mansoni*.

Curiosamente, nossos dados também revelaram um padrão não convencional de eliminação de cercárias em *B. glabrata* SB infectado com 10 miracídios de *S. mansoni* HS. Nesta situação foram observados dois picos de eliminação de cercárias, um aos 45 dpi e outro pico posterior aos 70 dpi. Bastos et al. (1982) também demonstraram picos tardios de eliminação de cercárias semelhantes em caramujos *B. glabrata* de populações simpátricas infectadas por um isolado humano de *S. mansoni* da cidade de São Bento, Maranhão. Além

disso, essa eliminação tardia de cercárias observada em *B. glabrata* SB infectada com *S. mansoni* HS também pode representar uma adaptação do parasito às condições climáticas da Baixada Maranhense. Os campos alagados de São Bento e Peri Mirim secam quase completamente durante a estação seca que ocorre de agosto a janeiro (COSTA-NETO et al., 2011), o que pode submeter os caramujos ao fenômeno biológico de diapausa e anidrobiose (DANNEMANN; PIERI, 1989), e conseqüentemente afetar a propagação de *S. mansoni*. Portanto, essa assincronia na eliminação de cercárias pode estar associada a estratégias desenvolvidas pela linhagem HS de *S. mansoni* para contornar a seca sazonal na região; entretanto, esse possível mecanismo utilizado por essa linhagem ainda precisa ser melhor comprovado.

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste capítulo demonstram o sucesso do isolamento da linhagem de *S. mansoni* proveniente de infecções naturais de *H. sciureus* capturados em uma área endêmica para esquistossomose do Nordeste brasileiro, utilizando *B. glabrata* da linhagem SB e camundongos BALB/c como hospedeiros. Assim, foi possível constatar que a linhagem HS de *S. mansoni* possui perfil genético semelhante com isolados do parasito obtidos de humanos e caramujos do Brasil, Guadalupe, Porto Rico e Quênia. Além disso, foi possível verificar que a linhagem HS de *S. mansoni* possui padrões diferenciais de infectividade e comportamento parasitológico em BALB/c e caramujos *B. glabrata*. A partir deste isolamento, será possível realizar mais estudos com essa linhagem de *S. mansoni*.

**CAPÍTULO II: ASPECTOS MORFOLÓGICOS DO ISOLADO HS DE  
*Schistosoma mansoni* COMPARADO COM A LINHAGEM LE HUMANA  
REFERÊNCIA**

---

## 1. INTRODUÇÃO

O parasito *Schistosoma mansoni* é um trematódeo de grande importância para a saúde pública mundial, pois é o agente etiológico da esquistossomose intestinal. Estima-se que 250 milhões em todo mundo estejam infectadas e 700-800 milhões estejam em risco de contraírem essa doença (GRYSEELS et al., 2006; WEERAKOON et al., 2015; McMANUS et al., 2018; WHO, 2020). Somente em 2019, um total de 236,6 milhões de pessoas infectadas precisaram do tratamento específico com Praziquantel (PZQ) (WHO, 2020), o que indica a permanência ativa da transmissão desta parasitose em muitas áreas endêmicas.

Por ser um parasito digenético, *S. mansoni* requer o desenvolvimento em hospedeiros vertebrados e invertebrados (KATZ; ALMEIDA, 2003; LOVERDE, 2019; ANDERSON; ENABULELE, 2021). As formas larvais do parasito (miracídeos, cercárias e esporocistos) estão associados à infecção do hospedeiro intermediário, que são caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria* (PARAENSE, 2004; COELHO et al., 2008; ANDERSON; ENABULELE, 2021). Por outro lado, as formas evolutivas que se desenvolvem nos hospedeiros vertebrados, que incluem humanos e outros mamíferos silvestres, são os esquistossômulos, vermes adultos machos e fêmeas, e os ovos postos por esses casais de vermes (STIREWALT, 1974; LENZI et al., 2008; LOVERDE, 2019; ANDERSON; ENABULELE, 2021). Muitas dessas formas evolutivas de *S. mansoni*, principalmente os vermes adultos, são utilizadas em estudos morfológicos que tentam caracterizar novas linhagens do parasito (MAGALHÃES; CARVALHO, 1973; MACHADO-SILVA et al., 1995; NEVES et al., 1998; MACHADO-SILVA et al., 2000; MACHADO-SILVA et al., 2003; MARTINEZ et al., 2003), como forma de melhor conhecer a biologia do agente etiológico da esquistossomose em uma determinada área endêmica (PEREIRA et al., 2012).

As principais linhagens de *S. mansoni* conhecidas e bem caracterizadas atualmente foram isoladas de humanos de diferentes regiões geográficas (WARREN et al., 1967; ANDERSON; CHEEVER, 1972; MARTINEZ et al., 2003; EUZÉBIO et al. 2012). Entretanto, em diversas áreas endêmicas para esquistossomose na África e nas Américas, roedores silvestres também são encontrados naturalmente infectados por diferentes linhagens e genótipos de *S. mansoni* (THÉRON et al., 1992; MIRANDA et al., 2017; CATALANO et al., 2018; DO CARMO-SILVA et al., 2019), cujo impacto na esquistossomose humana ainda é incerto. Assim, é de fundamental importância a identificação de biomarcadores capazes de detectar variantes de *S. mansoni* na natureza para avaliar sua contribuição em infecções humanas, de roedores silvestres e caramujos da mesma região. Nesse sentido, estudos prévios baseados em

dados morfométricos de formas larvais e adultas de *S. mansoni*, demonstraram que a análise morfométrica é uma importante ferramenta capaz de diferenciar linhagens do parasito (MACHADO-SILVA et al., 1995; NEVES et al., 1998; MACHADO-SILVA et al., 2000; MARTINEZ et al., 2003); entretanto, poucos estudos foram feitos com o objetivo de caracterizar a morfologia de linhagens de *S. mansoni* isoladas de roedores silvestres.

No Brasil, as principais espécies de roedores silvestres encontradas naturalmente infectados por *S. mansoni* são, *Nectomys squamipes* e *Holochilus sciureus* (REY, 1993; GENTILE et al., 2012; MIRANDA et al., 2017). Estudos morfométricos prévios (NEVES et al., 1998; MACHADO-SILVA et al., 1995) mostraram que vermes adultos machos e fêmeas de uma linhagem de *S. mansoni* isolada de *N. squamipes* naturalmente infectado, apresentam nítidas diferenças morfológicas quando comparado com um isolado humano do parasito. No entanto, pouco se conhece sobre aspectos morfológicos de linhagens de esquistossomos isoladas de *H. sciureus*, o mais importante reservatório do parasito no Nordeste do Brasil (MIRANDA et al., 2017). Somente Dias e Piedrabuena (1980) descreveram a morfologia de ovos e vermes adultos machos e fêmeas recuperado de infecção naturais de *H. brasiliensis leucogaster* capturados em São Paulo, Brasil; porém, nenhuma comparação com outras linhagens referências de *S. mansoni* foi realizada para avaliar os caracteres morfológicos encontrados.

Assim, o objetivo do presente estudo foi realizar a descrição morfológica e morfométrica de ovos, miracídios, cercárias e vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni* da linhagem HS, isolada de *H. sciureus* naturalmente infectados, em comparação com uma linhagem LE humana referência.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Linhagens de *S. mansoni* e infecção dos modelos experimentais

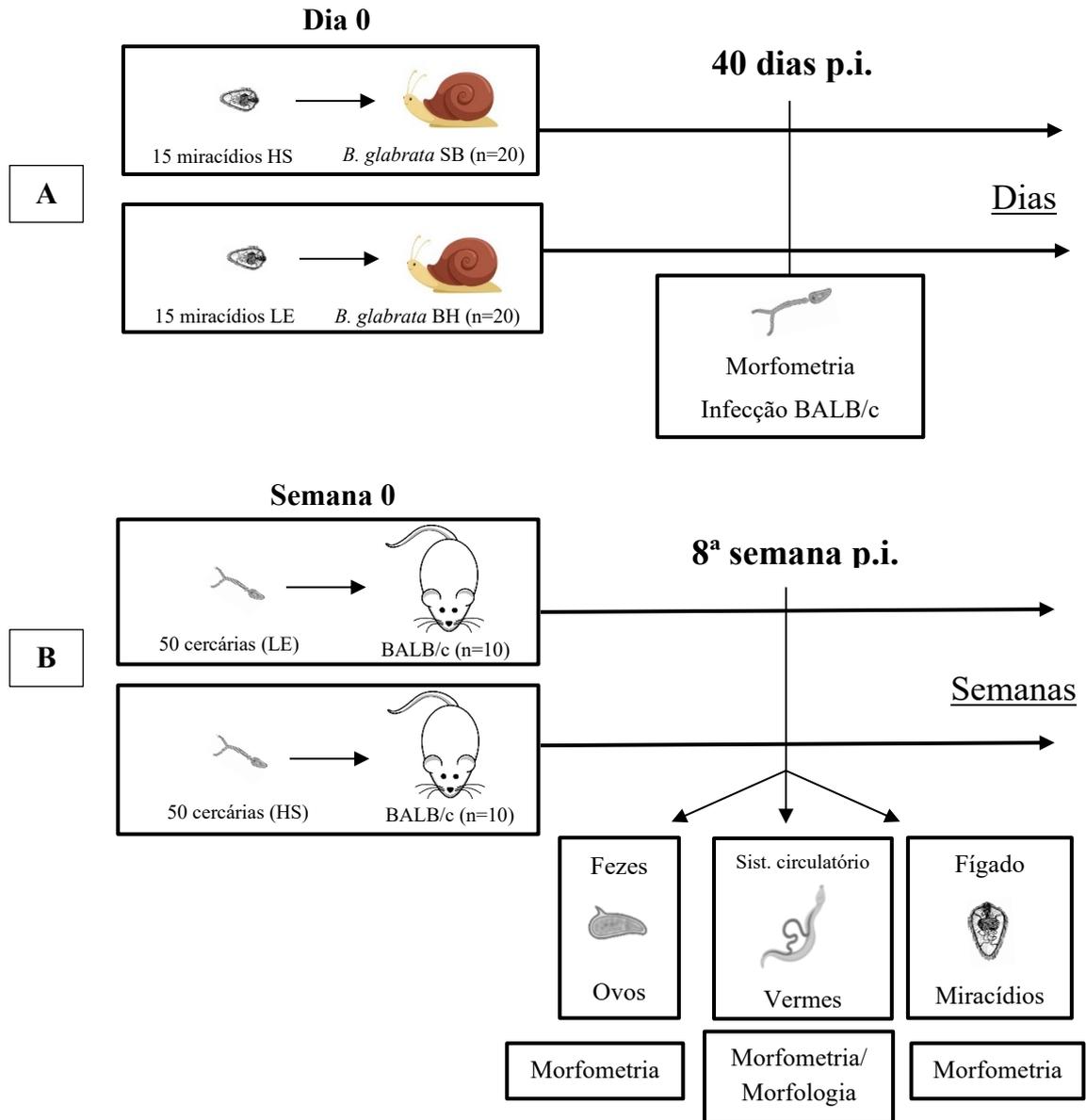
Neste capítulo foi utilizada a linhagem HS de *S. mansoni* que é mantida em laboratório a partir de sucessivas infecções em camundongos BALB/c e caramujos *B. glabrata* (linhagem SB), e que foi isolada do roedor *H. sciureus* naturalmente infectado, conforme previamente detalhado (**Capítulo I**). Como critério de comparação, foi utilizada a linhagem LE do parasito, que foi isolada de um paciente de Belo Horizonte (VALADRES et al., 1981). Essa linhagem tem sido mantida em laboratório a partir de sucessivas infecções em hamsters e caramujos *B. glabrata* (linhagem BH), de acordo com a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968). A obtenção dos animais experimentais utilizados nos experimentos deste capítulo, bem como os

procedimentos de manutenção desses animais e das linhagens de *S. mansoni* utilizadas nesse estudo foram realizadas no Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia (ICB/UFMG), conforme descrito no **Capítulo I** desta tese. A infecção dos caramujos e camundongos seguiu o protocolo proposto por Standen (1952) e Pellegrino e Macedo (1956), respectivamente (detalhado no **Capítulo I, subitem 2.6**). Os experimentos com esses animais foram aprovados pelo Conselho de Ética e Experimentação Animal da UFMG (nº46/2019, **anexo C**). As análises morfológicas e morfométricas foram realizadas no laboratório de Helmintologia – Romero Lascasas Porto (UERJ), com a colaboração do prof. Dr. José Roberto Machado-Silva e da Profa. Dra. Renata Heisler Neves.

## 2.2 Delineamento experimental

Nesta etapa, foi realizada uma caracterização morfológica e morfométrica comparativa das diversas fases evolutivas de *S. mansoni* da linhagem LE e HS. Para tanto, caramujos *B. glabrata* BH (n=20) e SB (n=20) previamente infectados com 15 miracídios das linhagens LE ou HS, respectivamente, foram expostos à luz e ao calor artificial por 4h (BRASIL, 2008) após 40 dias da infecção para a obtenção das cercárias. As cercárias de cada linhagem de *S. mansoni* foram utilizadas para infecção experimental de camundongos ou foram fixadas, coradas e montadas em lâminas permanentes para as análises morfológicas (**Figura 24. A**), conforme metodologia detalhada descrita a seguir.

Camundongos BALB/c foram subcutaneamente infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* da linhagem HS ou LE (n=10 camundongos/por linhagem do parasito) e utilizados para recuperação de vermes adulto e ovos utilizados nas análises propostas neste capítulo (**Figura 24. B**). Para isto, camundongos com 8 semanas de infecção foram acomodados em gaiolas individuais para coleta de fezes, que foram recolhidas e fixadas em *pool* separados para cada linhagem, e utilizadas para montagem de lâminas e análises morfométricas de ovos de *S. mansoni*. Após a coleta de fezes, os camundongos infectados com cada linhagem do parasito foram anestesiados (300mg/Kg de cetamina e 30 mg/kg de xilazina), eutanasiados e destinados à técnica da perfusão do sistema circulatório para obtenção dos vermes adultos. Destes mesmos animais foram retirados o fígado, que foram processados para recuperação dos miracídios eclodidos de ovos maduros. Essas diferentes fases evolutivas de *S. mansoni* da linhagem HS e LE também foram fixadas, coradas e montadas em lâminas permanentes para as análises morfológicas e morfométricas.



**Figura 24. Delineamento experimental do capítulo II.** *Biomphalaria glabrata* (BH e SB) infectados com 15 miracídeos (A) e em camundongos BALB/c infectados com 50 cercárias (B), utilizando as linhagens LE (cepa referência humana) ou HS (isolada de *Holochilus sciureus*) de *Schistosoma mansoni*, para obtenção de ovos, miracídeos, cercárias e vermes adultos que foram usados para as análises morfológicas e morfométricas.

### 2.3 Coloração e montagem de lâminas de cercárias, ovos, vermes adultos e miracídeos

Caramujos *B. glabrata* infectados com a linhagem HS ou LE, previamente examinados e com infecção confirmada pela presença de cercárias, foram reunidos em *pool* em béquer de vidro contendo 100mL de água desclorada, de forma separada para cada linhagem de *S. mansoni*, e expostos à luz e ao calor por 4 h (BRASIL, 2008). As cercárias de *S. mansoni* de cada linhagem (HS e LE) obtidas foram filtradas, limpas e concentradas conforme previamente detalhado (**subtópico 2.4 – Capítulo I**), e fixadas em AFA (95% de etanol a 70%, 3% de formol

e 2% de ácido acético glacial) por 24 h (TORRES et al., 2011). Após fixação, as cercárias foram coradas com carmin clorídrico 2,5% (diluído em solução contendo etanol 90% e ácido clorídrico) durante 24 h, e a seguir foram desidratadas por ressuspensão em uma série crescente de álcool (70, 80, 95% e absoluto) por 15 minuto, tempo necessário para sedimentação espontânea das cercárias. A centrifugação foi evitada pois induz uma maior ruptura entre o corpo e a cauda dessas larvas. Ao final, o sobrenadante foi novamente descartado, sendo acrescido ao sedimento uma solução contendo salicilato de metila e Bálsamo do Canadá, na proporção de 1:2, respectivamente, para a clarificação e montagem das lâminas. Alíquotas de 100 µL da solução de cercárias foram utilizadas para a montagem das lâminas permanentes usadas nas análises morfométricas das cercárias.

Para recuperação dos ovos do parasito, os camundongos experimentalmente infectados com as cercárias da linhagem HS ou LE, na 8ª semana de infecção, tiveram seus materiais fecais recolhidos por grupo, fixados em AFA (24h) e processados por meio da técnica de HPJ (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934), conforme previamente descrito (**subtópico 2.4 – Capítulo I**). Alíquotas de 200µL do sedimento foram montadas à fresco entre lâmina e lamínula para a realização da morfometria dos ovos.

Após a coleta de fezes, os vermes adultos foram recuperados do sistema circulatórios dos camundongos infectados com cada linhagem do parasito, a partir da técnica da perfusão do sistema circulatório (PELLEGRINO; SIQUEIRA, 1956), que foi previamente detalhada (**subtópico 2.4 – Capítulo I**). Os vermes de cada linhagem também foram reunidos em *pool* e fixados em AFA por 24 horas. Os vermes fixados foram corados por 1 h com solução de carmin clorídrico (2,5%), seguido por rápida lavagem em solução de 70% de etanol para retirada do excesso de corante, seguida também de uma rápida lavagem em solução de álcool clorídrico (para diferenciação de órgãos internos). Após, o material foi desidratado gradualmente em série alcoólica (70%, 90% e absoluto), com duração de três minutos em cada etapa. Em seguida, a clarificação do material foi realizada com uma solução de salicilato de metila acrescido de Bálsamo do Canadá (1:2) e os espécimes montados entre lâmina e lamínula (preparação permanente) (NEVES et al., 2007). As lâminas com os machos e fêmeas corados foram submetidas à análise morfológica e morfométrica.

Os fígados dos animais necropsiados que estavam infectados com a linhagem HS ou LE foram processados conforme descrito anteriormente (**subtópico 2.2 – Capítulo I**), para obtenção dos miracídios, que foram reunidos em *pool* para cada linhagem de *S. mansoni* avaliada. A fixação, coloração e montagem das lâminas permanentes dos miracídios seguiram os mesmos procedimentos anteriormente descritos para preparação de cercárias.

## 2.4 Caracteres morfológicos avaliados

Ovos (n=45) em preparações a fresco e miracídios (n=40), cercárias (n=30) e vermes machos (n=20) e fêmeas (n=15) montados e corados com carmim foram analisados em microscópio óptico associado a uma câmera (Bel Photonics DV-5000 - 5.0 MP, Bel Engineering, Monza/Itália). As imagens foram capturadas pelo programa Bel View versão 6.2.3.0 (Bel Engineering, Monza/Itália), para mensuração de alguns caracteres morfológicos característicos de cada fase evolutiva.

Para os ovos foram utilizados os dados da área total, comprimento e largura, sendo esta última medida mensurada a partir da média de três mensurações distintas da largura em áreas localizadas no centro e nas duas extremidades do ovo. A área total e comprimento do espículo também foram mensurados (NEVES et al, 1998). Os miracídios tiveram a área total, largura (médias de três medidas) e comprimento mensurados. As cercárias foram mensuradas quanto a área da ventosa oral e ventral, o comprimento e largura do corpo (média de três medidas), da cauda e das furcas, assim como comprimento total, ie. a soma das medidas da furca, cauda e corpo de cada larva (MACHADO-SILVA et al, 2000).

Em vermes adultos machos, foram analisadas: as áreas totais e a distância das ventosas oral e ventral; espessura do tegumento, que foi mensurada com base na média de três medidas nas regiões anterior, medial e posterior do corpo do verme; altura e largura de tubérculos e a sua quantidade em uma distância de 100 $\mu$ m na região acima e abaixo dos lobos testiculares (média de três contagens); comprimento e largura (médias de três medidas) do esôfago; área total, comprimento e quantidade dos lobos testiculares; área total da vesícula seminal; e comprimento total do corpo. Para vermes adultos fêmeas, foram analisadas: as áreas totais e a distância das ventosas oral e ventral; espessura do tegumento (mensurada conforme mencionado para os vermes machos); comprimento do útero; área total do oótipo e ovário; número de oócitos liberados; área total da espermateca; área, comprimento e largura (média de três medidas) do ovo uterino (quando presente) e do seu espículo; e comprimento total do corpo (NEVES et al., 1998; BRANDÃO-BEZERRA et al., 2019).

Adicionalmente, também foram realizadas análises morfológicas em vermes machos, incluindo a densidade (normal ou reduzida) de espermatozóides na vesícula seminal, densidade (normal ou reduzida) celular dos lobos testiculares e presença de lobos supranumerários. Em vermes fêmeas, foi avaliado a presença de ovos em desenvolvimento no oótipo, diferenciação celular no ovário, ovócitos sendo liberados, assim como a densidade (normal ou reduzida) de espermatozóides na espermateca e densidade (normal ou reduzida) de vitelo nas glândulas

vitelinas (BRANDÃO-BEZERRA et al., 2019). A frequência (%) de cada característica foi comparada entre as duas linhagens avaliadas.

## 2.5 Análise estatística

Todos os dados foram inicialmente analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os dados com distribuição normal (paramétricos) dos dois grupos experimentais (linhagem LE e Linhagem HS) tiveram suas médias comparadas pelo teste T de Student, e os dados com distribuição não normal (não paramétricos) as medianas foram comparadas pelo teste de Mann-Whitney. As frequências dos dados categóricos (aspectos morfológicos qualitativos) foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ . Para a realização desses testes e construção dos gráficos, utilizaram-se os softwares GraphPad Prism versão 8 (Prism Software, Irvine, California, USA) e STATA versão 11.1 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Miracídeos, cercárias e vermes adultos da linhagem HS apresentam diferenças morfométricas e morfológicas

A avaliação morfométrica dos ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes de camundongos experimentalmente infectados mostrou que a área total, comprimento e largura, bem como as medidas do espículo lateral dos ovos de *S. mansoni* da linhagem HS são morfológicamente similares aos da linhagem LE (**Tabela VI**).

**Tabela VI.** Descrição comparativa das características morfométricas de ovos (n=45 por grupo) eliminados nas fezes de camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* da linhagem humana referência (LE) ou pela linhagem do roedor *Holochilus sciureus* (HS).

Características	LE	HS	p <sup>a</sup>
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	5.909±74,67	6.026±62,72	0,237
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	132,6±1,41	134,9±1,19	0,228
Largura ( $\mu\text{m}$ )	47,51±0,42	48,24±0,36	0,315
<b>Espículo</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	169,7±9,11	165,7±7,24	0,732
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	21,69±0,49	22,21±0,45	0,439

Dados apresentados na forma de média e erro padrão; <sup>a</sup>Valores de p obtidos pelo teste de T de Student.

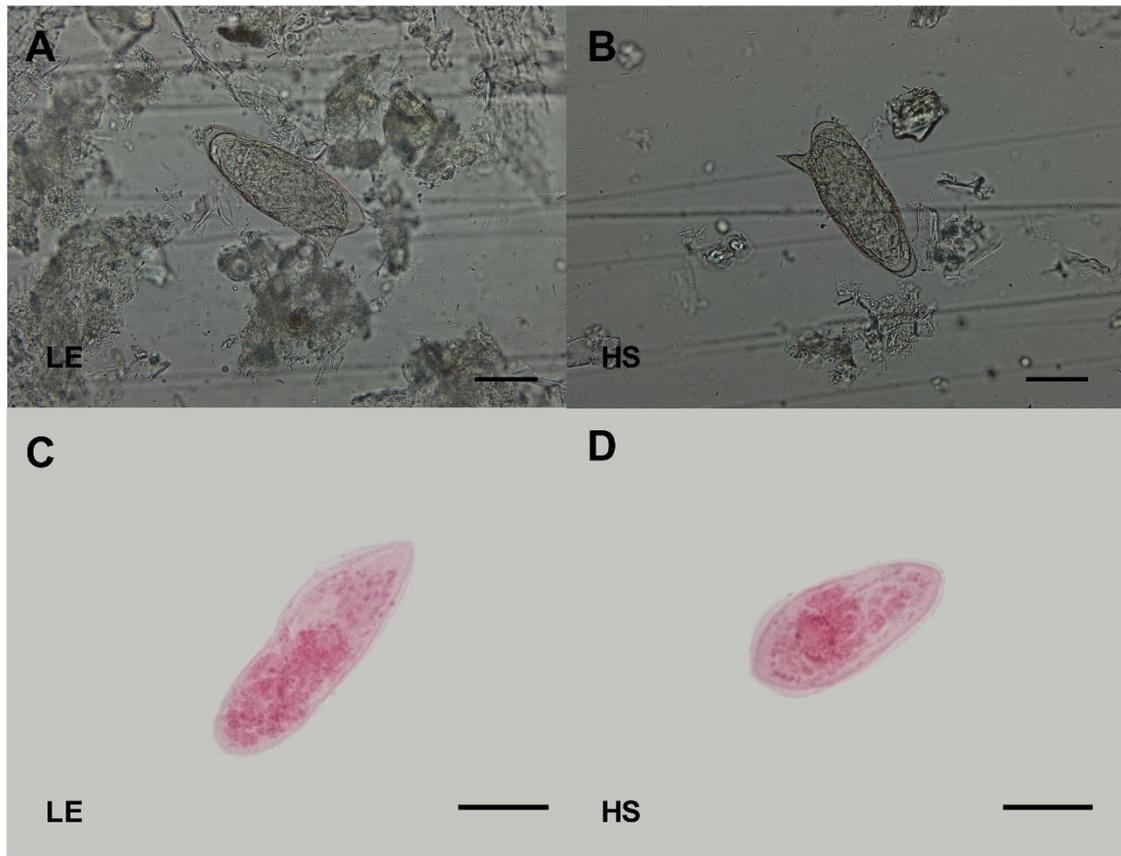
Entretanto, para os miracídios, cercárias e vermes adultos, foi verificada diferenças morfométricas entre as linhagens. Os miracídios da linhagem HS apresentaram comprimento corporal semelhante ao verificado na linhagem LE; entretanto, as larvas da linhagem HS possuem largura e área corporal menores que as da linhagem LE (**Tabela VII**).

**Tabela VII.** Descrição comparativa das características morfométricas de miracídios (n=40 por grupo) de *Schistosoma mansoni* entre as linhagens humana referência (LE) e a do roedor *Holochilus sciureus* (HS).

<b>Características</b>	<b>LE</b>	<b>HS</b>	<b>p<sup>a</sup></b>
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	5.721 $\pm$ 118,7	5.065 $\pm$ 106,8	< 0,0001*
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	130,3 $\pm$ 1,62	128,1 $\pm$ 1,97	0,396
Largura ( $\mu\text{m}$ )	48,21 $\pm$ 0,99	41,70 $\pm$ 0,6	< 0,0001*

Dados apresentados na forma de média e erro padrão; <sup>a</sup> Valores de p obtidos pelo teste de T de Student.

A **figura 25** ilustra as características morfológicas de ovos e miracídios de *S. mansoni* de cada linhagem, analisadas em microscopia de luz. Nesta figura fica em evidência a semelhança dos ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes de camundongos infectados com a linhagem LE (**Figura 25. A**) e HS (**Figura 25. B**), bem como o tamanho reduzido dos miracídios da linhagem HS (**Figura 25. D**) em relação à LE (**Figura 25. C**).



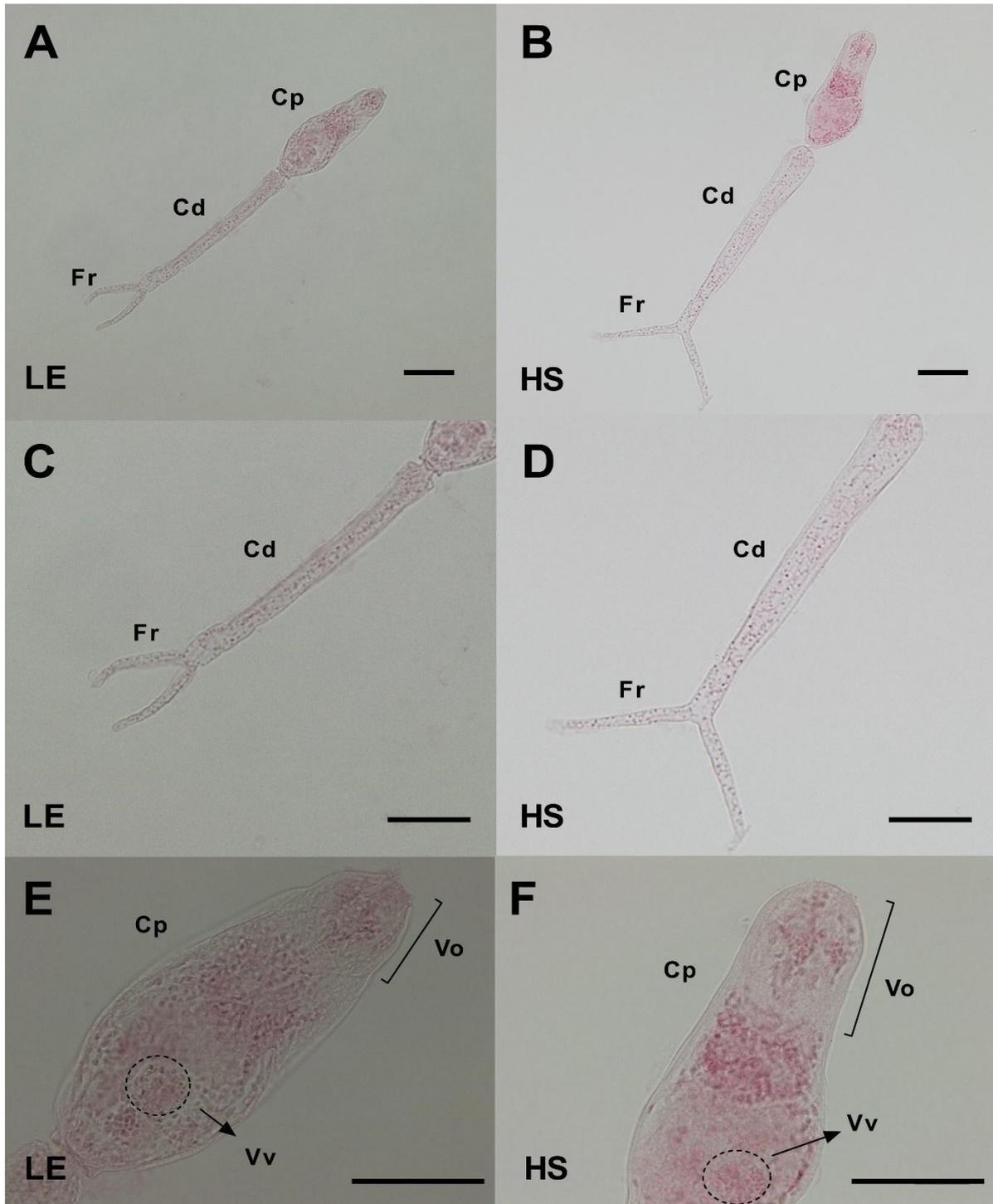
**Figura 25. Morfologia de ovos e miracídios.** Ovos e miracídios de *Schistosoma mansoni* das linhagens LE (humana referência) (A e C) e HS (isolada de *Holochilus sciureus*) (B e D), observados em microscopia de luz de campo claro. Os ovos das linhagens HS e LE apresentaram morfometria semelhante; entretanto, nítidas diferenças em uma menor área corporal total e menor largura dos miracídios HS (D) em comparação à LE (C) são claramente observadas. Os ovos foram montados à fresco e os miracídios foram corados com carmim clorídrico (2,5%) e montados em lâminas permanentes. Barra= 50 $\mu$ m.

As cercárias foram as formas evolutivas que apresentaram diferenças mais marcantes entre as linhagens. Especificamente para a linhagem HS, as cercárias apresentaram dimensões corporais significativamente maiores que as cercárias da linhagem LE, com maior comprimento e largura do corpo; maior área da ventosa oral; e maior comprimento da cauda. As furcas apesar de maiores apresentaram-se mais estreitas que as da linhagem LE (Tabela VIII). As fotomicrografias das cercárias coradas com carmim clorídrico da figura 26 ilustram o tamanho aumentado (Figura 26.B) e a diferença no formato da cauda e furcas (Figura 26.D), além do corpo e ventosa oral (Figura 26.F) das cercárias da linhagem HS em comparação com a LE.

**Tabela VIII.** Descrição comparativa das características morfométricas de cercárias (n=30 por grupo) de *Schistosoma mansoni* entre as linhagens humana referência (LE) e a do roedor *Holochilus sciureus* (HS).

<b>Características</b>	<b>LE</b>	<b>HS</b>	<b>p</b>
<b>Corpo</b>			
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	146,8 $\pm$ 2,44	155,6 $\pm$ 1,14	0,002*
Largura ( $\mu\text{m}$ )	47,73 $\pm$ 1,44	53,75 $\pm$ 0,95	0,001*
<b>Ventosa oral (Vo)</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	1.162 $\pm$ 29,46	1.463 $\pm$ 46,24	< 0,0001*
<b>Ventosa ventral (Vv)</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	145,2 $\pm$ 6,76	164,9 $\pm$ 9,27	0,094
<b>Cauda</b>			
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	214,0 $\pm$ 4,04	245,0 $\pm$ 2,78	< 0,0001*
Largura ( $\mu\text{m}$ )	30,24 $\pm$ 0,84	30,61 $\pm$ 0,53	0,709
<b>Furca</b>			
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	52,6 $\pm$ 2,07	60,5 $\pm$ 2,63	0,025*
Largura ( $\mu\text{m}$ )	14,01 $\pm$ 0,46	12,06 $\pm$ 0,41	0,002*
<b>Comprimento total (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>360,7<math>\pm</math>5,94</b>	<b>401,4<math>\pm</math>3,17</b>	<b>&lt; 0,0001*</b>

Dados apresentados na forma de média e erro padrão; \*Valores de p obtidos pelo teste de T de Student.



**Figura 26. Morfologia de cercárias.** Cercárias de *Schistosoma mansoni* das linhagens LE (cepa referência isolada de humano) (A, C e E) e HS (isolada de *Holochilus sciureus*) (B, D e F), observadas em microscopia de luz de campo claro. Podem ser observadas nítidas diferenças em um maior comprimento corporal total (B), bem como em áreas isoladas da cauda, furcas (D) e corpo (F) das cercárias HS em comparação à LE. Uma maior área da ventosa oral em cercárias HS (F) também é claramente observada. As cercárias de ambas as linhagens foram coradas com carmim clorídrico (2,5%) e montadas em lâminas permanentes. Barra = 50 $\mu$ m. Cp = corpo; Cd= cauda; Fr = furca; Vo = ventosa oral; Vv= ventosa ventral.

Para vermes adultos machos, a maioria das estruturas externas e internas foram semelhantes entre as duas linhagens, incluindo as ventosas, esôfago, lobos testiculares, vesícula seminal e tegumento. Entretanto, o número de tubérculos tegumentares em uma distância de 100 $\mu$ m em uma região definida acima e abaixo dos lobos testiculares foi estatisticamente maior na linhagem HS em relação à LE (**Tabela IX**).

**Tabela IX.** Descrição comparativa das características morfométricas de machos adultos (n=20 por grupo) de *Schistosoma mansoni* entre as linhagens humana referência (LE) e a do roedor *Holochilus sciureus* (HS).

<b>Características</b>	<b>LE</b>	<b>HS</b>	<b>p<sup>a</sup></b>
<b>Ventosa oral (Vo)</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	28.112 $\pm$ 1.664	27.277 $\pm$ 1.323	0,719
<b>Ventosa ventral (Vv)</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	32.088 $\pm$ 1.520	31.255 $\pm$ 1.766	0,725
<b>Distância Vo x Vv (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	244,5 $\pm$ 11,02	250,5 $\pm$ 16,43	0,755
<b>Esôfago</b>			
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	271,5 $\pm$ 10,98	255,5 $\pm$ 9,87	0,358
Largura ( $\mu\text{m}$ )	41,21 $\pm$ 1,33	44,31 $\pm$ 4,18	0,490
<b>Vesícula seminal</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	1.413 $\pm$ 85,77	1.373 $\pm$ 99,69	0,767
<b>Lobos testiculares</b>			
Quantidade	7,96 $\pm$ 0,23	8,20 $\pm$ 0,31	0,544
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	28.127 $\pm$ 1.488	26.584 $\pm$ 862,1	0,374
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	373,9 $\pm$ 12,60	375,2 $\pm$ 12,28	0,942
<b>Tegumento</b>			
Espessura ( $\mu\text{m}$ )	13,56 $\pm$ 0,51	14,09 $\pm$ 0,60	0,511
<b>Tubérculo</b>			
Quantidade em 100 $\mu\text{m}$	4,122 $\pm$ 0,23	5,517 $\pm$ 0,28	0,0005*
Altura ( $\mu\text{m}$ )	9,140 $\pm$ 0,40	10,09 $\pm$ 0,41	0,119
Largura	13,88 $\pm$ 0,37	14,72 $\pm$ 0,41	0,147
<b>Comprimento total do corpo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	9.242 $\pm$ 140,8	8.925 $\pm$ 184,7	0,172

Dados apresentados na forma de média e erro padrão; <sup>a</sup> Valores de p obtidos pelo teste de T de Student.

Em vermes fêmeas, as estruturas externas e internas também foram, em sua maioria, semelhantes entre as duas linhagens, incluindo as ventosas, esôfago, útero, oótipo, ovário e tegumento; porém, foi possível observar que a espermateca das fêmeas HS apresentou uma menor área, quando comparado com as das fêmeas LE (**Tabela X**).

**Tabela X.** Descrição comparativa das características morfométricas de fêmeas adultas (n=15 por grupo) de *Schistosoma mansoni* entre as linhagens humana referência (LE) e a do roedor *Holochilus sciureus* (HS).

<b>Características</b>	<b>LE</b>	<b>HS</b>	<b>p</b>
<b>Ventosa oral (Vo)</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	3.507 $\pm$ 400,3	2.955 $\pm$ 356,1	0,311
<b>Ventosa ventral (Vv)</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	1.864 $\pm$ 79,82	1.746 $\pm$ 31,0	0,184
<b>Distância Vo x Vv (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	139,6 $\pm$ 9,81	134,9 $\pm$ 8,68	0,726
<b>Útero</b>			
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	1.265 $\pm$ 61,39	1.220 $\pm$ 60,77	0,605
<b>Oótipo</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	5.776 $\pm$ 542,4	4.993 $\pm$ 263,1	0,208
<b>Ovário</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	33.859 $\pm$ 462,8	33.426 $\pm$ 1.261	0,751
Número de oócitos liberados	3,06 $\pm$ 0,38	3,26 $\pm$ 0,39	0,719
<b>Espermoteca</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	1.453 $\pm$ 106,0	1.123 $\pm$ 115,5	0,044*
<b>Ovo uterino</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	2.653 $\pm$ 232,8	2.780 $\pm$ 189,8	0,679
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	90,72 $\pm$ 2,66	88,40 $\pm$ 2,87	0,802
Largura ( $\mu\text{m}$ )	28,78 $\pm$ 1,80	30,31 $\pm$ 1,70	0,562
<b>Espículo do ovo</b>			
Área ( $\mu\text{m}^2$ )	206,0 $\pm$ 29,16	217,6 $\pm$ 19,27	0,988
Comprimento ( $\mu\text{m}$ )	19,00 $\pm$ 1,39	20,40 $\pm$ 0,97	0,408
<b>Tegumento</b>			
Espessura ( $\mu\text{m}$ )	5,92 $\pm$ 0,39	5,82 $\pm$ 0,27	0,835
<b>Comprimento total do corpo</b>	10.021 $\pm$ 247,9	10.200 $\pm$ 241,7	0,610
( $\mu\text{m}$ )			

Dados apresentados na forma de média e erro padrão; <sup>a</sup> Valores de p obtidos pelo teste de T de Student.

Adicionalmente, após análise morfológica qualitativa detalhada de cada estrutura interna e externa previamente mensuradas em vermes machos e fêmeas, foi possível observar que os vermes machos da linhagem HS apresentam padrão de densidade de espermatozoides e de células nos lobos testiculares semelhantes com a linhagem LE. Além disso, somente vermes machos da linhagem LE apresentaram lobos testiculares supranumerários (n=2; 6,7%); entretanto, sem diferenças estatísticas quando comparado com a linhagem HS. Para vermes fêmeas da linhagem HS, verificamos que houve uma semelhança na presença de diferenciação

celular no ovário e oócitos sendo liberados, assim como no padrão de densidade de espermatozoides na espermateca e de vitelo, quando comparado com a linhagem LE. Entretanto, a presença de ovos em desenvolvimento no oótipo de fêmeas HS foi mais frequente (n=15; 100%) quando comparado com a linhagem LE (**Tabela XI**).

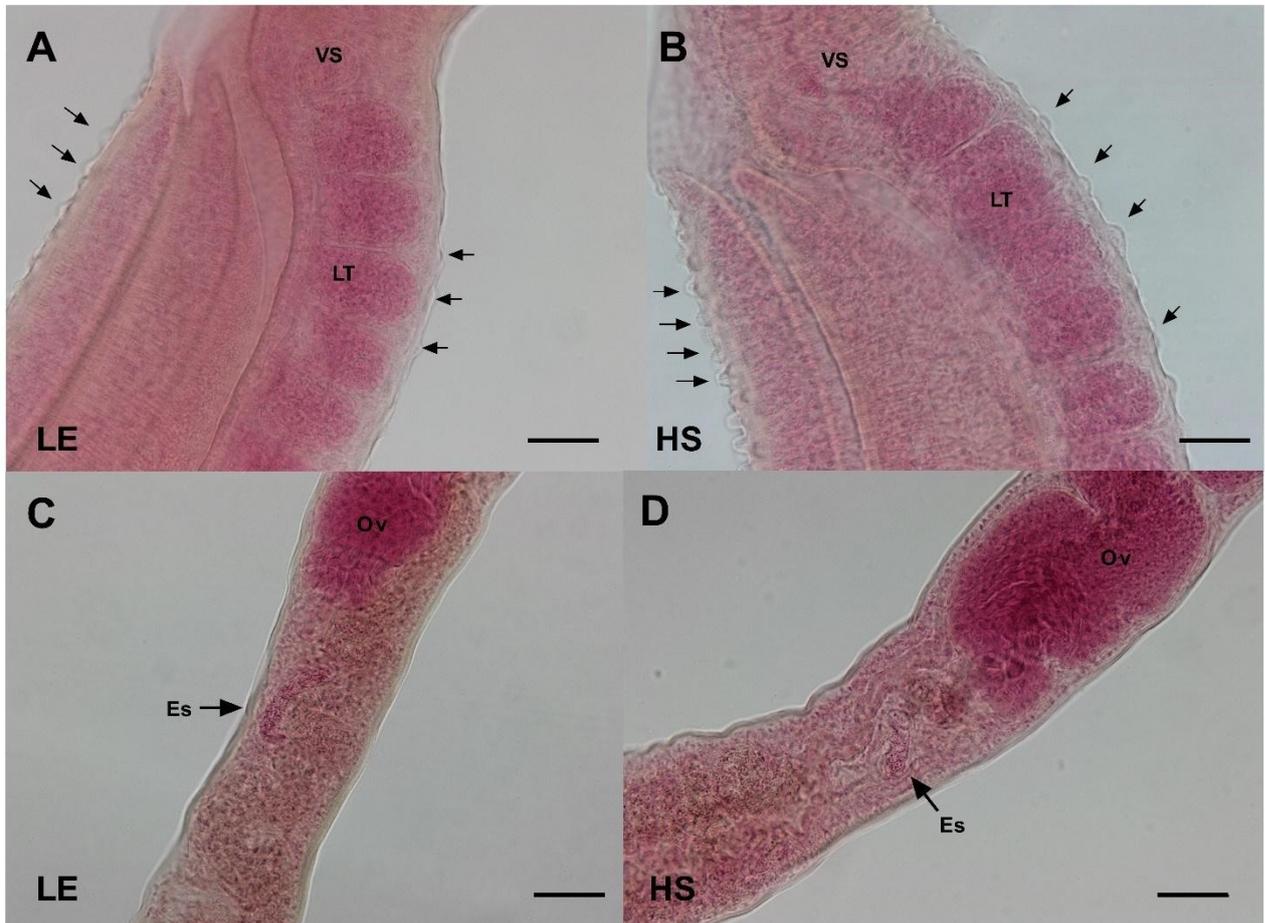
**Tabela XI.** Descrição comparativa das características morfológicas de vermes adultos machos (n=20 por grupo) e fêmeas (n=15 por grupo) de *Schistosoma mansoni* entre as linhagens humana referência (LE) e a do roedor *Holochilus sciureus* (HS).

<b>Vermes machos</b>			
<b>Características</b>	<b>LE</b>	<b>HS</b>	<b>p<sup>a</sup></b>
<b>Densidade de espermatozóides na vesícula seminal</b>			
Normal	13 (43,3%)	12 (60%)	0,3510
Reduzida	17 (56,7%)	08 (40%)	
<b>Lobos testiculares supranumerários</b>			
Presente	02 (6,7%)	0 (0%)	0,3551
Ausente	28 (93,3%)	20 (100%)	
<b>Densidade de células nos Lobos testiculares</b>			
Normal	30 (100%)	20 (100%)	>0,9999
Reduzida	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Vermes fêmeas</b>			
<b>Características</b>	<b>LE</b>	<b>HS</b>	<b>p<sup>a</sup></b>
<b>Ovo em desenvolvimento no oótipo</b>			
Presente	06 (40%)	15 (100%)	0,0168*
Ausente	09 (60%)	0 (0%)	
<b>Diferenciação celular no ovário</b>			
Presente	15 (100%)	15 (100%)	>0,9999
Ausente	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Oócitos liberados</b>			
Presente	15 (100%)	15 (100%)	>0,9999
Ausente	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Densidade de espermatozoides na espermateca</b>			
Normal	15 (100%)	15 (100%)	>0,9999
Reduzida	0 (0%)	0 (0%)	
<b>Densidade de vitelo</b>			
Normal	15 (100%)	15 (100%)	>0,9999
Reduzida	0 (0%)	0 (0%)	

<sup>a</sup>Valores de p obtidos pelo teste exato de Fisher. \*estatisticamente significativo (p<0,05).

As principais diferenças morfométricas encontradas em vermes adultos machos (maior número de tubérculos em 100µm) e fêmeas (menor área da espermateca) da linhagem HS,

quando comparado com LE, foram demonstradas pela coloração com carmim clorídrico e visualizadas em microscopia óptica, sendo representadas a seguir (**Figura 27**).



**Figura 27. Morfologia de vermes adultos.** Vermes adultos de *Schistosoma mansoni* das linhagens LE (cepa referência isolada de humano) (**A e C**) e HS (isolada de *Holochilus sciureus*) (**B e D**), observados em microscopia de luz de campo claro. Diferenças em relação ao maior número de tubérculos (setas) em vermes machos da linhagem HS (**B**), quando comparado com a linhagem LE (**A**) podem ser observadas. Em vermes fêmeas HS, uma menor área da espermateca (seta) também é claramente demonstrada (**D**), quando comparado com a linhagem LE (**C**). Os vermes machos e fêmeas de ambas as linhagens foram coradas com carmim clorídrico (2,5%) e montadas em lâminas permanentes. Barra=50µm. Vs = vesícula seminal; Lt = lobos testiculares; Ov = ovário; Es = espermateca.

#### 4. DISCUSSÃO

Trabalhos publicados (WARREN et al., 1967; ANDERSON; CHEEVER, 1972; MARTINEZ et al., 2003; EUZÉBIO et al. 2012) têm caracterizado morfológica e biologicamente diferentes linhagens de *S. mansoni* isoladas de populações humanas ou caramujos infectados de regiões endêmicas para esquistossomose em todo o mundo, sendo sugerido que essas diferentes linhagens do parasito podem ser responsáveis por variações

clínicas específicas da esquistossomose humana (DE LIMA E COSTA; KATZ, 1982; CONCEIÇÃO et al., 2008; EUZÉBIO et al. 2012). Portanto, conhecer a biologia da linhagem de *S. mansoni* endêmica de uma região, pode ajudar nas medidas de controle dessa parasitose (PEREIRA et al., 2012). Entretanto, poucos estudos se dedicaram a estudar linhagens de *S. mansoni* que infectam naturalmente animais silvestres. Estudos genéticos utilizando vermes adultos recuperados de algumas espécies de roedores silvestres demonstraram a existência de novos genótipos do parasito (BARRAL et al., 1996; SIRE et al., 1999; CATALANO et al., 2020), cujo impacto na morbidade da esquistossomose em humanos ainda é incerto. Além disso, a morfologia das diferentes formas evolutivas dessas linhagens de *S. mansoni* isolados de roedores silvestres ainda é pouco conhecida, o que poderia ajudar a propor novos marcadores que as identificassem na natureza. No presente estudo, foi verificado que a linhagem HS de *S. mansoni* isolada do roedor *H. sciureus* capturado no estado do Maranhão, Brasil e mantida em camundongos BALB/c e caramujos *B. glabrata*, apresenta ovos eliminados nas fezes com dimensões semelhantes que a linhagem humana (LE) usada como referência; entretanto, os miracídios apresentam menor área e largura corporal quando comparado com a linhagem LE. Por outro lado, as cercárias da linhagem HS apresentam dimensões maiores que a linhagem LE do parasito. Por fim, as imagens obtidas por microscopia de luz dos vermes adultos machos da linhagem HS sugerem um menor número de tubérculos tegumentares na região anterior próxima aos lobos testiculares. Por sua vez, as fêmeas apresentaram menor área da espermateca e maior frequência de ovos em desenvolvimento no oótipo, quando comparado com a linhagem LE humana referência.

A análise de caracteres morfológicos de diferentes formas evolutivas de *S. mansoni* tem sido utilizada como biomarcadores capazes de diferenciar linhagens do parasito (MAGALHÃES; CARVALHO, 1973; MACHADO-SILVA et al., 1995; NEVES et al., 1998; MACHADO-SILVA et al., 2000; MACHADO-SILVA et al., 2003; MARTINEZ et al., 2003; PEREIRA et al., 2012). Os principais dados morfométricos de linhagens de *S. mansoni* foram obtidos no Brasil a partir da análise das linhagens BH (isolada de *B. glabrata*, Minas Gerais, Brasil), CMO (isolada de *Oryzomys subflavus*, Rio Grande do Norte, Brasil), SJ (isolada de *B. tenagophila*, São Paulo, Brasil), CM (isolada de humano, Pernambuco, Brasil) e SLM (isolada de humano, Pernambuco) (MAGALHÃES; CARVALHO, 1973; MACHADO-SILVA et al., 1995, 2000; MARTINEZ et al., 2003; PEREIRA et al., 2012). Entretanto, poucos estudos se propuseram a utilizar esses marcadores morfológicos para diferenciar linhagens de *S. mansoni* isoladas do roedor *H. sciureus*, o mais importante reservatório silvestre do parasito no Nordeste do Brasil (MIRANDA et al., 2017). No presente estudo, a análise morfométrica da maioria dos

aspectos anatômicos de vermes adultos machos da linhagem HS de *S. mansoni*, como ventosas e órgãos reprodutores, foi semelhante à linhagem humana LE utilizada como referência. Apesar de não ter sido feito em paralelo com o nosso estudo, os dados da literatura avaliando características morfométricas de outras linhagens de *S. mansoni* mantidas em camundongos demonstram que os vermes machos da linhagem HS apresentaram maior CT (comprimento total) quando comparado com as linhagens BH, CMO, SJ de *S. mansoni* (MACHADO-SILVA et al., 1995; MARTINEZ et al., 2003). Além disso, o número de lobos testiculares dos vermes machos da linhagem HS foi maior do que todas as linhagens citadas anteriormente (BH, CMO, SJ, SLM e CM) (MAGALHÃES; CARVALHO, 1973; MACHADO-SILVA et al., 1995, 2000; MARTINEZ et al., 2003; PEREIRA et al., 2012) e também maior do que um isolado obtido de *N. squamipes*, denominado de linhagem R (NEVES et al., 1998). Em relação às ventosas, os machos da linhagem HS de *S. mansoni* apresentaram maior área da ventosa oral (Vo) quando comparado com as linhagens humanas (CM e SLM) e isolados do parasito obtidos de roedores silvestres (CMO e R) (MACHADO-SILVA et al., 1995; NEVES et al., 1998; MARTINEZ et al., 2003; PEREIRA et al., 2012). Os vermes da linhagem HS também tiveram maior área da ventosa ventral (Vv) quando comparado com as linhagens SLM, CMO e R de *S. mansoni* (MACHADO-SILVA et al., 1995; NEVES et al., 1998; MARTINEZ et al., 2003; PEREIRA et al., 2012). Interessantemente, os nossos dados mostraram que o número de tubérculos tegumentares localizados na região anterior próxima aos lobos testiculares foi maior em vermes machos da linhagem HS, comparado com a linhagem LE do parasito. Essa característica anatômica poderia ter algum significado na sobrevivência do parasito dentro do hospedeiro vertebrado, pois o tegumento de *S. mansoni*, incluindo os tubérculos, participam do processo de assimilação de nutrientes e evasão do sistema imunológico do hospedeiro (MCLAREN, 1980; ABATH; WERKHAUSER, 1996).

Assim como os machos, as fêmeas da linhagem HS de *S. mansoni* apresentaram a maioria dos dados morfométricos e morfológicos semelhantes quando comparados com linhagem LE. Comparando com os dados da literatura, as fêmeas da linhagem HS de *S. mansoni* apresentaram maior CT em relação às linhagens BH e SJ de *S. mansoni* (MAGALHÃES; CARVALHO, 1973). Além disso, a área da ventosa oral das fêmeas da linhagem HS foi maior que todas as linhagens citadas anteriormente que avaliaram essa característica (CMO, CM, SLM e R) (NEVES et al., 1998; MARTINEZ et al., 2003; PEREIRA et al., 2012). Por outro lado, a área da ventosa ventral das fêmeas HS foi menor do que as linhagens CMO, CM e R (NEVES et al., 1998; MARTINEZ et al., 2003), e maior do que a linhagem SLM (PEREIRA et al., 2012). De modo interessante, a área da espermateca das fêmeas da linhagem HS foi menor

do que a da linhagem LE, o que poderia sugerir algum impacto na fecundidade e postura de ovos pelas fêmeas da linhagem HS do parasito. Entretanto, a presença de ovos em desenvolvimento no oótipo foi mais frequente nas fêmeas de *S. mansoni* da linhagem HS (15/15; 100%), quando comparado com as fêmeas da linhagem LE (6/15; 40%). Esses dados estão de acordo com os achados que demonstraram que todas as fêmeas (n=30) de *S. mansoni* recuperadas de *H. brasiliensis leucogaster* naturalmente infectado capturado em São Paulo, Brasil, apresentavam ovos em desenvolvimento no oótipo (DIAS; PIEDRABUENA, 1980). Essa característica pode estar associada a uma alta fecundidade das fêmeas HS ou sugerir que os ovos dessa linhagem do parasito podem demorar mais para maturar e por isso permanecem por mais tempo em desenvolvimento no oótipo. Para verificar essas possibilidades, a fecundidade das fêmeas da linhagem HS ainda precisa ser melhor avaliada em ensaios *in vitro* e em infecções de modelos experimentais.

Comparado com os vermes adultos, as características morfométricas de cercárias são menos utilizadas para a identificação de linhagens de *S. mansoni*; entretanto, dados prévios que avaliaram a morfometria dessas larvas, mostraram que existem caracteres capazes de diferenciar linhagens de *S. mansoni* (MACHADO-SILVA et al., 2000; PEREIRA et al., 2012). Em nosso estudo, a maioria dos caracteres avaliados em cercárias da linhagem HS foram maiores que a linhagem LE, com exceção da largura das furcas, que foram menores. Apesar dessas maiores dimensões das cercárias da linhagem HS, os vermes dessa mesma linhagem não apresentaram um comprimento total significativamente maior que a linhagem LE. Comparado com os dados da literatura, a área das Vo e Vv das cercárias da linhagem HS foram muito menores que a das linhagens CMO e SJ (MACHADO-SILVA et al., 2000), porém maiores que os dados obtidos para a linhagem SLM (PEREIRA et al., 2012).

Os ovos e os miracídios são formas evolutivas menos exploradas em estudos morfológicos que diferenciam linhagens de *S. mansoni*. Essas duas fases de vida do parasito podem representar uma forma valiosa de detecção de linhagens uma vez que podem ser recuperadas dos hospedeiros vertebrados (humanos e roedores silvestres), sem a utilização de métodos invasivos. Neste presente estudo, nós demonstramos que a morfometria dos ovos eliminados pelas fezes de camundongos infectados por ambas as linhagens avaliadas (LE e HS) foram semelhantes. Dentre os poucos estudos que avaliaram a morfometria de ovos de *S. mansoni* eliminados nas fezes, Dias e Piedrabuena (1980) verificaram que ovos do parasito eliminados por *H. brasiliensis leucogaster* naturalmente infectados, apresentavam dimensões de 148,82µm de comprimento e 66,33µm de largura, que são valores maiores do que o encontrado em nosso estudo para as linhagens avaliadas. Entretanto, é importante ressaltar que

diferentes hospedeiros vertebrados induzem plasticidades fenotípicas variadas em *S. mansoni* (SENFT et al., 1978; MACHADO-SILVA et al., 1994), e, portanto, a comparação morfométrica de formas evolutivas do parasito obtidas de diferentes modelos experimentais não é totalmente válida. Diferente dos ovos eliminados nas fezes, a morfometria de ovos uterinos presentes no oótipo e/ou útero de vermes fêmeas tem sido melhor investigada entre diferentes linhagens de *S. mansoni*. Em nosso estudo, não encontramos diferenças significativas nesse aspecto entre as linhagens avaliadas; entretanto, quando comparado com os dados da literatura, a morfometria do ovo uterino da linhagem HS de *S. mansoni* é menor que as das linhagens CMO e R (NEVES et al., 1998; MARTINEZ et al., 2003). Por outro lado, a área do espículo do ovo uterino da linhagem HS é maior que as da linhagem CMO (MARTINEZ et al., 2003), e menor do que a linhagem R de *S. mansoni* (NEVES et al., 1998).

Em relação aos miracídios, nossos dados representam, no melhor do nosso conhecimento, o primeiro estudo que indica que essas larvas podem ser usadas para a diferenciação de linhagens de *S. mansoni*, incluindo as isoladas de roedores silvestres. Os dados indicam que os miracídios de *S. mansoni* da linhagem HS, ao contrário das cercárias, apresentam menor área e largura do corpo quando comparado com as dimensões obtidas com miracídios da linhagem LE. Comparado com a morfometria de miracídios de uma linhagem isolada de humano residente em Komatipoort, África (132 $\mu$ m x 80 $\mu$ m) (SCHUTTE, 1974), os miracídios da linhagem HS apresentaram tamanho semelhante, mas uma largura menor. Assim como as cercárias, nós acreditamos que as menores dimensões de miracídios HS de *S. mansoni* podem representar algum impacto na propagação dessa linhagem na natureza e na infecção dos hospedeiros invertebrados, o que precisa ser melhor investigado em infecções experimentais.

Apesar de diferentes genótipos de *S. mansoni* terem sido detectados em roedores silvestres (BARRAL et al., 1996; SIRE et al., 1999; CATALANO et al., 2020), ainda não sabemos se há uma associação entre essa variabilidade genética e o perfil morfológico das diferentes formas evolutivas do parasito, o que poderia ajudar a melhor conhecer e validar esses novos genótipos encontrados em campo. Assim, como forma de complementar os dados morfométricos do presente trabalho, o sequenciamento de regiões do DNA das linhagens LE e HS poderá revelar variabilidade no perfil genético desses isolados, o que será melhor investigado em trabalhos futuros.

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os dados morfológicos e principalmente os morfométricos obtidos neste capítulo demonstraram que os miracídios, cercárias e vermes adultos da linhagem HS possuem características diferentes quando comparados com a linhagem humana referência (LE) de *S. mansoni*, criando possibilidades de utilização de alguns desses caracteres morfológicos em estudos de campo para avaliar a dispersão da linhagem HS na região da Baixada Maranhense. Como perspectivas, serão realizadas investigações adicionais focadas em análises genéticas comparativas entre a linhagem HS e LE de *S. mansoni* com a finalidade de confirmar as diferenças morfológicas encontradas neste estudo.

**CAPÍTULO III: ASPECTOS PARASITOLÓGICOS E IMUNOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO ISOLADO HS DE *Schistosoma mansoni* COMPARADO COM A LINHAGEM LE HUMANA REFERÊNCIA, EM CAMUNDONGOS BALB/c**

---

## 1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada que afeta aproximadamente 250 milhões de pessoas em todo o mundo, causando grave morbidade e mortalidade em humanos que vivem em áreas endêmicas, sendo a espécie *Schistosoma mansoni* um de seus principais agentes etiológicos (GRYSEELS et al., 2006; WEERAKOON et al., 2015; McMANUS et al., 2018; WHO, 2020).

A carga parasitária e a resposta imune do hospedeiro são determinantes na evolução da patologia associada à esquistossomose (DE JESUS et al., 2002; ABATH et al., 2006; COLLEY; SECOR, 2014). Sabe-se que durante as primeiras quatro semanas de infecção, caracterizada como fase aguda pré-patente, a resposta imune Th1 é predominante, a qual está associada ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-12, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) que estimulam a ativação clássica de macrófagos para um perfil M1 (COULSON et al., 1998; PEARCE; MACDONALD, 2002; DUNNE; COOKE, 2005; COLLEY; SECOR, 2014). A gravidade da doença nesta fase depende da intensidade da resposta inflamatória (BRUNET et al., 1997; HOFFMANN et al., 2000). Após os vermes adultos iniciarem a oviposição (fase postural aguda), a resposta imune é fortemente polarizada para um perfil Th2, induzida, principalmente, por antígenos solúveis secretados pelo ovo do parasito (SEA). Esse novo ambiente imunológico leva a um aumento na produção de IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 e quimiocinas como CCL11 e CCL24, que estimulam a eosinofilia, diferenciação de macrófagos ativadas alternativamente (M2) e produção de imunoglobulina (Ig)-E (DUNNE et al., 1992; CHEEVER et al., 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002; PEARCE et al., 2004; BURKE et al., 2009). A resposta imune Th2 pode equilibrar o perfil imune pró-inflamatório dos estágios iniciais da doença e é responsável pela formação de granulomas ao redor dos ovos do parasito retidos nos tecidos do hospedeiro (BRUNET et al., 1997; HAMS et al., 2013).

A resposta do granuloma é essencial para sequestrar o antígeno do parasito e reparar o dano tecidual causado pelas substâncias líticas secretadas pelos ovos do parasita; entretanto, se os granulomas não forem bem modulados pela resposta imune regulatória do hospedeiro, podem evoluir para grandes áreas de fibrose, levando a casos graves de esquistossomose crônica (LENZI et al., 1998; CHEEVER et al., 2000; HAMS et al., 2013; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Na fase crônica, o aumento da resposta imune modulatória do hospedeiro reduz as respostas tipo 1 e 2, o que pode minimizar a gravidade da doença, pois diminui o dano inicial produzido pela resposta tipo 1 e também reduz o tamanho do granuloma e a fibrose nas fases

mais avançadas da infecção (HESSE et al., 2004; BOOTH et al., 2004; LUNDY; LUKACS, 2013). No entanto, a resposta modulatória também favorece a sobrevivência do parasito no sistema circulatório do hospedeiro (HESSE et al., 2004; ANGELES et al., 2020). Portanto, o equilíbrio do papel protetor ou nocivo dos granulomas induzidos por ovos de *Schistosoma* sp. pode influenciar a morbidade da esquistossomose, e diferentes linhagens do parasito podem romper essa homeostase e afetar a gravidade da doença.

A ocorrência de novas linhagens de *S. mansoni* pode ser facilitada pela capacidade deste parasito de infectar diferentes hospedeiros vertebrados além dos humanos. Primatas não humanos (NELSON, 1960; STANDLEY et al., 2011), bovinos (BARBOSA et al., 1962, MODENA et al., 2008) e algumas espécies de roedores silvestres já foram encontrados naturalmente infectados com este parasito (THÉRON et al., 1992; REY, 1993; ALARCÓN DE NOYA et al., 1997; HANELT et al., 2010; MIRANDA et al., 2017; CATALANO et al., 2018). Infecções sucessivas nesses animais podem favorecer o surgimento de novas linhagens de *S. mansoni* com diferentes níveis de adaptabilidade e virulência (D'ANDREA et al., 2000; COLLEY; LOKER, 2018). De fato, linhagens e genótipos de *S. mansoni* foram encontrados em parasitos isolados de roedores *Rattus rattus* naturalmente infectados na ilha de Guadalupe (BARRAL et al., 1996; SIRE et al., 1999). Além disso, os mesmos genótipos de *S. mansoni* foram isolados de humanos e roedores selvagens naturalmente infectados de áreas endêmicas para esquistossomose na África, indicando a ocorrência de transmissão zoonótica (CATALANO et al., 2020). No entanto, nenhum desses estudos demonstrou o impacto dessas novas linhagens ou genótipos de *S. mansoni* na patologia da esquistossomose em humanos.

No Brasil, roedores silvestres como *Holochilus sciureus* e *Nectomys squamipes* são conhecidos por serem naturalmente infectados por *S. mansoni* (REY, 1993; GENTILE et al., 2012; MIRANDA et al., 2017), mas o papel desses animais na epidemiologia e transmissão da esquistossomose permanece sem definição. Estudos anteriores mostraram que isolados de *S. mansoni* obtidos de *H. sciureus* apresentam alta patogenicidade em caramujos *Biomphalaria* (BASTOS et al., 1982). Além disso, há evidências de variação antigênica em *S. mansoni* isolado de *H. sciureus* infectado (CARNEIRO et al., 1991). No entanto, com os dados acumulados até o momento, ainda não conseguimos estimar o impacto de isolados de *S. mansoni* obtido desse reservatório silvestres, na gravidade da esquistossomose em hospedeiros vertebrados. Neste estudo, utilizamos camundongos BALB/c infectados experimentalmente para avaliar os aspectos parasitológicos e imunopatológicos da infecção por *S. mansoni* isolado de *H. sciureus* naturalmente infectado, comparado com um isolado de ser humano.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Linhagens de *S. mansoni* e infecção dos camundongos

Para os estudos comparativos, utilizamos duas linhagens de *S. mansoni*, a linhagem HS e LE. A linhagem de *S. mansoni* HS foi isolada do roedor *H. sciureus* naturalmente infectados capturados na cidade de São Bento no estado do Maranhão, conforme previamente detalhado no **Capítulo I**. A linhagem LE isolada de humano (VALADRES et al., 1981), foi utilizada como referência para as comparações em nossas avaliações. As duas linhagens são mantidas rotineiramente no Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia (ICB/UFMG), conforme detalhado no **Capítulo II (subitem 2.1)**.

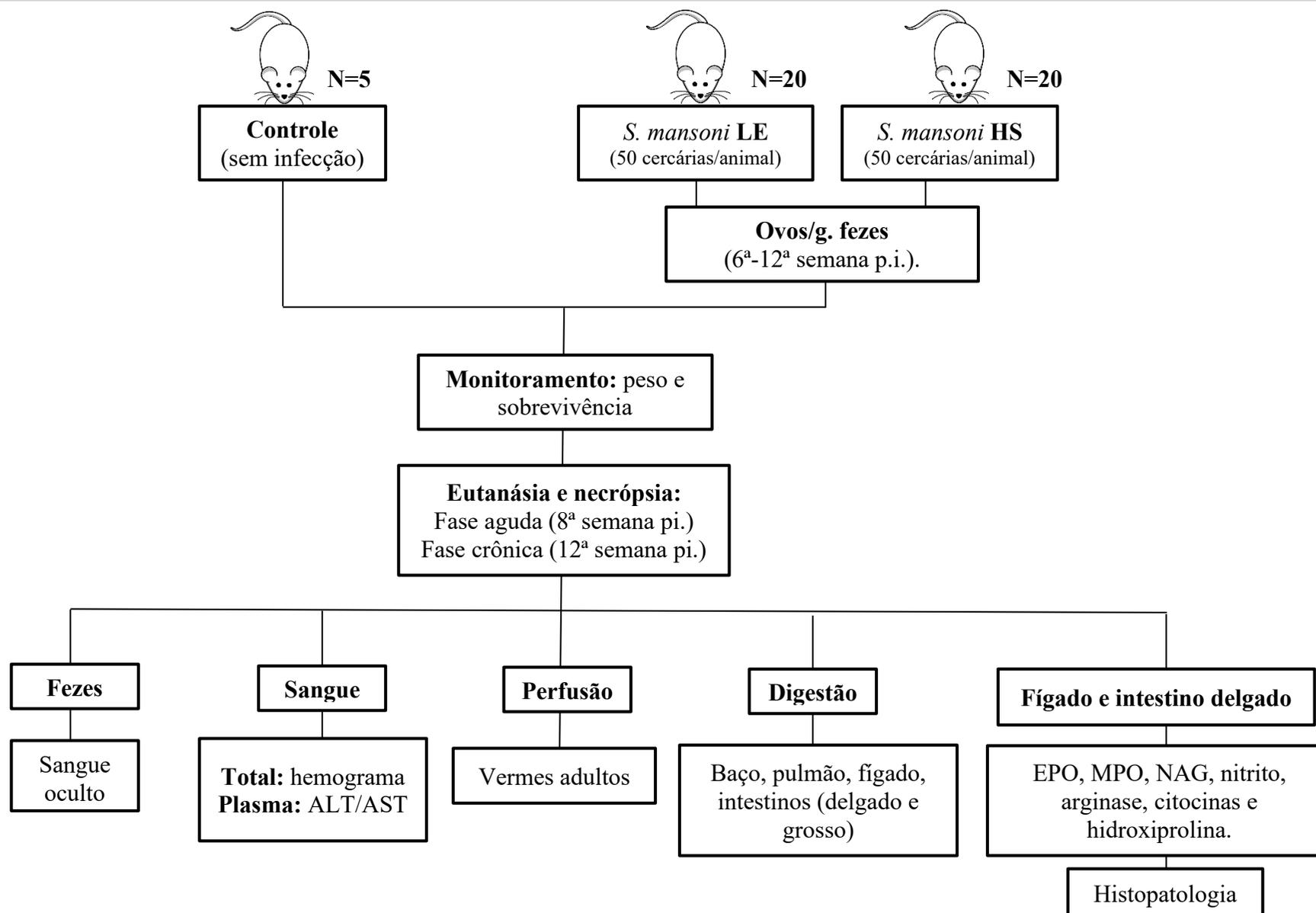
Camundongos BALB/c machos com idade entre 4-5 semanas (~20 gramas) fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG foram utilizados como modelo experimental vertebrado da infecção por *S. mansoni*. Estes camundongos são rotineiramente tratados com Ivermectina (KLEMENTS et al., 1996) logo após o desmame e são mantidos em microisoladores acomodados em racks ventiladas (Alesco Co., Monte Mor, São Paulo, Brasil) no biotério do Departamento de Parasitologia ICB-UFMG, com suprimento de ração para camundongos (Linha laboratório, Presence, Brasil) e água *ad libitum* em temperatura ambiente durante todo o período experimental. Um total de 50 cercárias viáveis provenientes de caramujos *B. glabrata* previamente infectados com a linhagem LE ou HS foram diluídas em um volume máximo de 500 µL de solução salina (0,9% NaCl) e inoculadas por via subcutânea nos animais dos grupos experimentais. Os experimentos com esses camundongos foram aprovados pelo Conselho de Ética e Experimentação Animal da UFMG (nº46/2019, **anexo C**).

### 2.2 Delineamento experimental

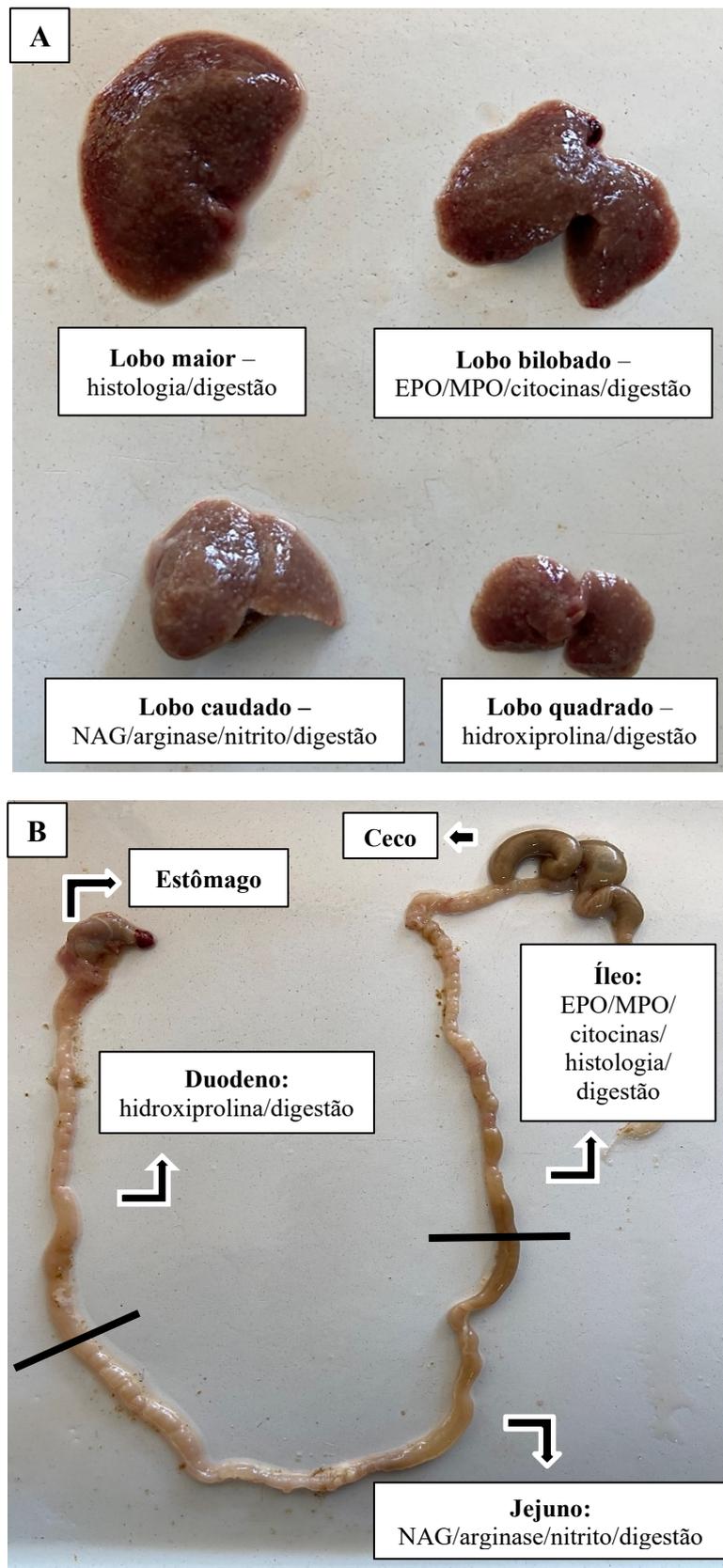
Conforme detalhado na **figura 28**, os camundongos foram divididos em três grupos: **I** - controle (sem infecção); **II** – infectados com a linhagem LE; **III** – infectados com a linhagem HS, que foram acompanhados durante 12 semanas para o monitoramento da variação do peso, mortalidade e quantificação do número de ovos eliminados nas fezes (grupo infectado). Especificamente na fase aguda (8ª semana p.i.) e crônica da infecção (12ª semana p.i.), um grupo de 7-10 animais tiveram suas fezes recolhidas de maneira individual para análise qualitativa da presença de sangue oculto, além da quantificação de ovos eliminados. Em seguida, nessas mesmas fases da infecção, os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (quetamina, 80 mg/kg, e xilazina 10 mg/kg) para a retirada de sangue do plexo vascular axilar,

para realização do hemograma, além de obtenção do plasma para a dosagem de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). A eutanásia ocorreu pela própria exsanguinação seguida de deslocamento cervical. Após necropsia, os animais tiveram a circulação porta perfundida para recuperação e contagem dos vermes adultos e para retirada dos pulmões, fígado, baço e intestinos, que foram utilizados para digestão e contagem do número de ovos retidos (**Figura 28**).

Como a realização da perfusão sanguínea para recuperação dos vermes e digestão de tecidos para contagem dos ovos do parasito impossibilitam a utilização dos órgãos do hospedeiro para as avaliações imunológicas e patológicas, novas infecções foram realizadas. Nesse novo grupo de animais infectados (n=7–10/por grupo) e controles (n=5), houve novamente o monitoramento clínico (variação de peso e mortalidade), quantificação de ovos eliminados nas fezes e retirada de sangue/eutanásia após 8 e 12 semanas pi. Após eutanásia e necropsia realizada do mesmo modo descrito anteriormente, o fígado foi dividido da seguinte forma: lobo maior destinado para processamento e análises histopatológicas (mensuração dos granulomas); lobo bilobado para quantificação indireta do infiltrado de eosinófilos (EPO), neutrófilos (MPO), e níveis de citocinas; lobo caudado para quantificação indireta de macrófagos (NAG) e seu perfil de ativação (quantificação de nitrito e dosagem da atividade de arginase); e o lobo quadrado destinado para quantificação de hidroxiprolina (indicativo de colágeno/fibrose) (**Figura 29. A**). Por sua vez, o intestino delgado foi subdividido em três partes: duodeno para quantificação de hidroxiprolina; jejuno para quantificação indireta de macrófagos (NAG) e seu perfil de ativação (nitrito e arginase); e íleo dividido ao meio, sendo a primeira porção usada para quantificação indireta do infiltrado de eosinófilos (EPO), neutrófilos (MPO) e níveis de citocinas, e segunda porção para avaliação histopatológica (mensuração dos granulomas) (**Figura 29. B**).



**Figura 28. Delineamento experimental do capítulo III.** Descrição do esquema de avaliação de camundongos BALB/c infectados com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni* das linhagens LE e HS durante a fase aguda e crônica da infecção e os controles (sem infecção).



**Figura 29. Subdivisão do fígado e intestino delgado.** Lobos do fígado (A) e regiões do intestino delgado (B) de camundongos BALB/c cronicamente infectados com *Schistosoma mansoni* destinadas às avaliações parasitológicas e imunopatológicas, em experimentos distintos.

## 2.3 Avaliação clínica

### 2.3.1 Ganho de peso e mortalidade

O peso corporal individual dos animais dos grupos controle e experimental foi mensurado semanalmente por meio de uma balança eletrônica analítica (E. Mettler K5 21709; Analytical Balance Scale – Northstowe, New Jersey). A variação do ganho ou perda de peso foi realizada a partir da subtração do peso semanal de cada animal em relação ao seu peso no dia 0 (antes da infecção) (FINLAY et. al, 2015). Para a realização da curva de mortalidade, os grupos de camundongos infectados e os controles foram observados semanalmente durante 12 semanas, e avaliados conforme previamente detalhado (**subitem 2.9, Capítulo I**).

### 2.3.2 Hemograma

Após anestesia, o sangue dos animais foi coletado a partir de vasos do plexo axilar com o auxílio de uma pipeta de Pasteur embebida em EDTA (Gibco, Invitrogen Corporation, NY, EUA). O sangue total de cada animal foi então acondicionado em tubos vacutainer de 5ml (K3 – KASVI - São José do Pinhais – PR, Brasil). As amostras de sangue foram analisadas em um analisador automático (Bio-2900 Vet, Bioeasy, USA), gentilmente cedido para uso pelo Laboratório de Imunologia e Genômica de Parasitos – ICB/UFMG. Os dados utilizados após o processamento foram: número de hemácias ( $\text{mm}^3$ ) e concentração de hemoglobina (g/dL).

## 2.4 Carga parasitária

A carga parasitária das linhagens de *S. mansoni* avaliadas foi estimada pelo número de ovos eliminados nas fezes (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2004), retidos nos tecidos (CHEEVER, 1968) e pela quantidade de vermes adultos, machos e fêmeas, recuperados do sistema circulatório (PELLEGRINO; SIQUEIRA, 1956), conforme previamente descrito no **subitem 2.9 do Capítulo I** desta tese. Para estimar a fecundidade de *S. mansoni*, utilizou-se a soma do número de ovos retidos em todos os tecidos avaliados e eliminados nas fezes, que foi então dividido pelo número de vermes fêmeas recuperados de cada animal infectado por uma das linhagens do parasito (BOULANGER et. al., 1991).

## 2.5 Resposta imunológica

### 2.5.1 Perfil de citocinas teciduais

Foi usada a técnica de ELISA sanduíche, utilizando kits comercialmente disponíveis (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN) para a dosagem dos níveis de TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-

12, IL-17, IL-4, IL-5, IL-13, IL-33 e IL-10 de camundongos, conforme detalhado por Rezende et al. (2020). Inicialmente, foram pesados 100 mg do fígado ou intestino delgado, que foram processados em um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), com 1 mL de tampão de extração (0,5 % Tween 20 - Sigma; 0,5% de albumina bovina - Sigma; 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsufonila, 0,1mM de cloreto benzetônico, 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina). O homogenato resultante deste processo foi centrifugado por 10 min. a 3000 g a 4°C e o sobrenadante foi recolhido, aliquotado e imediatamente congelado a - 20°C para posterior quantificação das citocinas e quimiocinas. O sedimento formado foi utilizado para quantificação de EPO e MPO, conforme posterior detalhamento.

Para o ensaio de detecção das citocinas, placas de 96 poços do tipo half area e high bind (Corning Costar Corp., NY, EUA) foram sensibilizadas *overnight* com 25µL de anticorpo de captura anti-citocina específico, diluídos na concentração e solução indicada pelo fabricante. Após esse período, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem contendo PBS (Phosphate buffer saline: 13,7mM de NaCl, 0,27mM de KCl, 0,14mM de KH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e 0,43mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O) acrescido de 0,05% de Tween 20 (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, EUA). Os poços foram então bloqueados com 75µL de PBS contendo 1% de albumina bovina (BSA) (Sigma) por 1 hora, seguido de outras três lavagens. Em seguida, 25µL do homogenato dos tecidos hepático e intestinal, diluídos 1:5 e 1:2, respectivamente, em PBS contendo BSA 0,1% (tampão de diluição) foram colocadas individualmente nos poços previamente estabelecidos. Ao mesmo tempo, 25µL de soluções com concentrações conhecidas das citocinas recombinantes a serem analisadas foram adicionadas em duplicata nos poços pré-estabelecidos, para a construção de uma curva padrão. A sensibilidade de cada curva foi de 31,25 a 4000 pg/mL para IL-13; 19,53 a 2500 pg/mL para IL-12; 15,6 a 2000 pg/mL para TNF-α, INF-γ, IL-17, IL-5 e IL-10; 7,8 a 1000 pg/mL para IL-4 e IL-33. Os poços definidos com os brancos tiveram as amostras substituídas por tampão de diluição. Após 2 horas, as placas foram lavadas três vezes e, a cada poço, foi adicionado 25µL de anticorpo de detecção anti-citocina de interesse conjugada à biotina e deixadas por mais 2 horas à temperatura ambiente. Após, as placas foram novamente lavadas (3x) e em seguida foi adicionada em cada poço uma solução contendo 25µL de estreptavidina conjugada à peroxidase na concentração indicada pelo fabricante (1:20 ou 1:200) por 30 minutos. Após a última lavagem, foi adicionado 25µL de substrato (soluções estabilizadas de peróxido de hidrogênio e tetrametilbenzidina, 1:1 v/v, R&D Systems) para revelar as placas, e após 30 minutos, a reação foi parada utilizando 20µL de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N). A absorbância das amostras e da curva padrão foi medida em leitor de microplacas (VersaMax, Molecular Devices, Califórnia, EUA) a 450 nm, e os níveis das

citocinas (pg/mL) nas amostras foi determinado por interpolação no gráfico resultante da curva padrão utilizando o programa SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices).

### 2.5.2 Quantificação indireta do infiltrado e ativação tecidual de eosinófilos

O infiltrado e ativação de eosinófilos no fígado e intestino delgado dos animais infectados e controles foi quantificado de modo indireto pelo ensaio enzimático de detecção de EPO (peroxidase de eosinófilo), descrito por Strath et al. (1985) e modificado por Fernandes et al. (2008). Para este ensaio, o sedimento resultante do processamento descrito no **item 2.5.1** foi ressuspenso em 750µL de solução salina a 0,2% para a lisa eritrócitos. Essa solução foi homogeneizada em vórtex (Vixar<sup>®</sup>) e após acrescido 750µL de solução salina a 1,6% contendo 5% de glicose e homogeneizada novamente. O homogenato resultante foi distribuído igualmente em dois microtubos de 1,5mL (um para o ensaio de EPO e outro para MPO).

As amostras destinadas para o ensaio de EPO foram centrifugadas a 3000 g, por 10 min. a 4°C, e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi ressuspenso em 950µL de PBS contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB - Sigma) e homogeneizado. Em seguida, as amostras também passaram por três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. O sobrenadante resultante das amostras teciduais de fígado e intestino foram diluídos em PBS na proporção de 1:5 e 1:2, respectivamente. Para o ensaio enzimático, 75µL de cada amostra ou somente PBS (branco) foram adicionados a placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) juntamente com 75µL da solução do substrato (tampão tris-HCL pH 8,0 contendo 1,5 mM o-fenilenodiamina-OPD e 6,6 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Após o desenvolvimento de cor (~20 minutos), a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M). A absorbância foi lida a 492 nm em leitor para microplacas (VersaMax).

### 2.5.3 Quantificação indireta do infiltrado e ativação tecidual de neutrófilos

O infiltrado e ativação de neutrófilos no fígado e intestino delgado dos animais infectados e controles foi quantificado de modo indireto pelo ensaio enzimático de detecção de MPO (mieloperoxidase). O ensaio foi realizado conforme descrito por Bayle (1988) e modificado por Fernandes et al. (2008). Conforme descrito anteriormente, o homogenato destinado para a quantificação de MPO foi centrifugado a 3000 g a 4° C por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O *pellet* foi então ressuspenso em 200µL de tampão fosfato 1 (0,1 M NaCl, 0,02 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,015 M Na<sub>2</sub>EDTA, pH 4,7). A solução foi homogeneizada em vórtex e centrifugada a 3000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e ao precipitado foi adicionado 800µL de tampão fosfato 2 (0,05 M Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pH 5,4, acrescido de

0,5 % HTAB) e homogeneizado novamente em vórtex. Os microtubos com estas amostras foram submetidos a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Para o ensaio enzimático, 25µL de cada amostra diluídas em tampão fosfato 2 nas mesmas proporções estabelecidas para EPO, foram plaqueados em placas de 96 poços (Sarstedt) contendo 25µL de substrato (3,3'- 5,5' - tetramethylbenzine - TMB diluído em dimetilsulfóxido - DMSO na concentração final de 1,6 mM). Posteriormente, a placa foi incubada a 37 °C por cinco minutos em estufa seca (CO<sub>2</sub> Water Jacketed Incubator, Harris®). Decorrido esse tempo, 100µL da solução contendo 0,002% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diluído em tampão fosfato 2 foram adicionados aos poços e a nova solução incubada novamente a 37°C por mais cinco minutos. A reação foi interrompida pela adição de 100µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1M) e quantificada por meio da absorbância em comprimento de onda de 450nm com auxílio de um leitor para microplacas (VersaMax).

#### 2.5.4 Quantificação indireta do infiltrado tecidual de macrófagos

A quantificação indireta de macrófagos infiltrados nos diferentes tecidos foi realizada por meio do ensaio enzimático de detecção da molécula N-acetil-β-D-glucosaminidase (NAG), que está presente em células mononucleadas de vertebrados (BOURBOUZE et al., 1991). Este ensaio foi realizado conforme o descrito por Barcelos et al. (2005). Sendo assim, 100mg de fígado ou intestino delgado foram processadas em um homogeneizador de tecidos (Fisher Scientific) em 950µL de tampão de extração (NaCl 0,1 M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,02 M e Na<sub>2</sub>EDTA 0,015M pH 4,7). O material foi centrifugado a 3000 g a 4°C por dez minutos. O sobrenadante foi então descartado e eventuais eritrócitos foram lisados pela adição de 750µL de solução contendo NaCl 0,2% e após 30 segundos, a osmolaridade foi restabelecida pela adição de 750µL de NaCl 1,6% contendo glicose 5%. As amostras foram homogeneizadas em vórtex, centrifugadas (3000 g a 4°C por dez minutos) e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 1 mL de solução salina (0,9 % de NaCl) contendo 0,1% de Triton X-100 (Sigma).

Para o ensaio colorimétrico, 100µL do sobrenadante de cada amostra de fígado (1:5 em tampão citrato/fosfato) e intestino (1:2), em duplicata, juntamente com 100µL de tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M, pH 4,5) contendo 0,767 g/mL de p-nitrofenil-N-acetil-β-glicosamina (Sigma), foram adicionados em placas de 96 poços (Sarstedt). Somente o tampão citrato/fosfato (200µL) foi utilizado como branco. As placas foram incubadas a 37° C por dez minutos e 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). A absorbância foi quantificada em leitor de microplacas (VersaMax) em comprimento de onda igual a 400 nm.

### 2.5.5 Quantificação da atividade de arginase

A atividade de arginase nos tecidos foi realizada pelo teste colorimétrico de detecção de ureia, substância produzida a partir da degradação enzimática de L-arginina em macrófagos alternativamente ativados (HESSE et al., 2001; RODRIGUES et al, 2017). Para esse teste, o sobrenadante produzido a partir do processamento das amostras para a realização dos ensaios de quantificação de NAG foi utilizado para o ensaio descrito por Corraliza et al. (1994). Assim, 50µL do sobrenadante de cada amostra diluídas nas proporções descritas anteriormente, foram adicionados em uma placa de transferência de 96 poços (Sarstedt) juntamente com 50µL de MnCl<sub>2</sub> (10mM) e 50µL de Tris-HCl (50mM e pH 7,5). Em seguida, a placa foi incubada a 55°C por 10 minutos para ativação enzimática. Aliquotas de 25µL das amostras previamente ativadas foram adicionados em 25µL de solução de 0,5 M L-arginina (Sigma-Aldrich) e a mistura foi incubada novamente por 1 h a 37°C. A reação foi interrompida após adição de 200µL da solução ácida contendo H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 96%, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85% e H<sub>2</sub>O (1:3:7, v/v/v). Em seguida, acrescentou-se 13µL de α-isonitrosopropiophenone (Sigma) 9% (diluído em etanol absoluto), seguido de aquecimento a 95°C por 45 minutos e incubação no escuro por mais 10 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, a leitura das placas foi realizada em leitor de microplacas (VersaMax) com absorbância medida no comprimento de onda de 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 (1–1000 mM) no software SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices).

### 2.5.6 Quantificação indireta da produção de óxido nítrico

A dosagem de óxido nítrico foi realizada indiretamente a partir da quantificação de nitrito (NaNO<sub>2</sub>), por meio da reação de Griess (TSIKAS, 2007). Para tanto, as amostras também processadas para a realização do ensaio enzimático para quantificação de NAG, tiveram 25µL de seus sobrenadantes (sem diluição) imediatamente recolhidos e plaqueados em uma microplaca de 96 poços (Sarstedt). Paralelamente, 25µL de NaNO<sub>2</sub> em concentrações conhecidas (1–1000 µM), em duplicata, também foram adicionados à microplaca para construção da curva padrão. Após, foram adicionados 25 µL de solução de ácido fosfórico 2,5% contendo 0,5% de sulfonilamida e 0,05% de N-α-naftiletilenodiamina aos poços preenchidos com as amostras e a curva padrão. Após 10 minutos em temperatura ambiente, as placas foram lidas em leitor de microplacas (VersaMax) a 540 nm. A concentração das amostras foi obtida

pela interpolação das absorbâncias em gráfico obtido a partir da curva padrão de concentrações conhecidas de nitrito no software SoftMax (Molecular Devices).

## **2.6 Avaliação patológica hepática e intestinal**

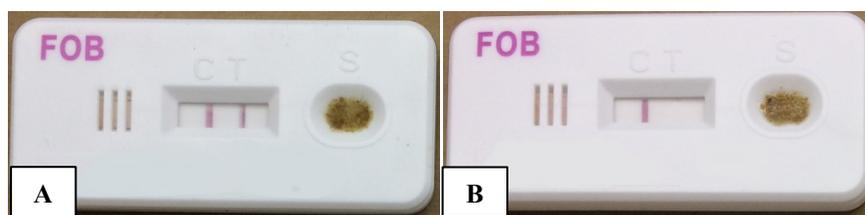
### **2.6.1 Quantificação indireta de lesão hepática**

Para avaliação indireta de lesão hepática, a atividade da aspartato aminotransferase (AST) e da alanina aminotransferase (ALT) foram quantificadas em amostras de plasma de animais infectados e controles (REZENDE et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2022), usando o teste colorimétrico comercialmente disponível pela Labtest<sup>®</sup>, seguindo as instruções do fabricante. Para a determinação da atividade enzimática nas amostras, 25µL do substrato de AST (contendo 2 mmol/L de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, 99 mmol/L de ácido L-aspártico e 15,4 mmol/L de azida sódica, pH 7,4) e ALT (contendo 2 mmol/L de ácido  $\alpha$ -cetoglutárico, 100 mmol/L de L-alanina e 15,4 mmol/L de azida sódica, pH 7,4) foram transferidos separadamente em placas de 96 poços (Sarstedt) e incubados a 37°C em estufa seca por 3 minutos, seguido da adição de 5µL de amostra e posterior incubação a 37°C por 30 minutos. Para controle da reação (brancos) alguns poços receberam 5µL de PBS em substituição às amostras. Em seguida, 25µL do reagente de cor (2,4-dinitrofenilhidrazina 1 mmol/L e ácido clorídrico 1 mmol/L) foi adicionado aos poços e a solução foi homogeneizada e deixada em temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, foram adicionados 250 µL de hidróxido de sódio 0,4N e a solução foi homogeneizada novamente e deixada em repouso durante 5 minutos. A curva padrão foi preparada em um tubo de polipropileno de 2mL, utilizando piruvato de sódio (2 mmol/L) como padrão enzimático, resultando em uma curva variando de 0–190 U/mL para AST e 0–150 U/mL para ALT. A curva padrão (305µL) foi transferida para o 96- placas de poços e a leitura de absorbância em comprimento de onda de 505 nm foi realizada em um leitor de microplacas (VersaMax). As concentrações das amostras foram obtidas pela interpolação das absorbâncias em gráfico obtido a partir da curva padrão de concentrações conhecidas no software SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices).

### **2.6.2 Avaliação indireta de lesão intestinal**

Foi utilizado o teste imunocromatográfico de detecção de sangue oculto (iFOBT, Labtest<sup>®</sup>) nas fezes como parâmetro de avaliação indireta de lesão intestinal (BETSON et al., 2012; BUSTINDUY et al., 2013) nos animais infectados, seguindo as recomendações do fabricante. Para tanto, 10mg de fezes recém coletadas individualmente de cada animal foram

colocadas em tubos de preparado de amostra (fornecido pelo kit), contendo tampão composto por cloreto de sódio 150mmol/L e azida sódica 3mmol/L. Após agito vigoroso, 3 gotas (0,15mL) da solução foram colocadas nas placas de reação e após 5 minutos, a leitura foi realizada. Os resultados positivos para a presença de sangue oculto foram àqueles onde as placas de reação demonstraram duas linhas de cor vermelha (uma no campo controle e outra no campo teste) (**figura 30.A**). Os resultados negativos apresentaram apenas uma linha vermelha no campo controle das placas de reação (**figura 30.B**).



**Figura 30. Resultado colorimétrico da presença de sangue oculto nas fezes (iFOBT, Labtest®).** **A.** Resultado positivo indicando a presença de duas linhas de cor vermelha, uma no campo controle e outra no campo teste. **B.** Resultado negativo mostrando apenas uma linha vermelha no campo controle.

### 2.6.3 Quantificação indireta de fibrose

Para a determinação indireta da deposição de colágeno (REDDY; ENWEMEKA, 1996), 100 mg do de fígado ou intestino delgado dos animais infectados e controles foram homogeneizadas (Fisher Scientific) em salina (0,9% NaCl) e liofilizadas (Liotop K105, Brasil) para a quantificação de hidroxiprolina. O produto liofilizado foi submetido a hidrólise alcalina (1mL de NaOH à 2N) e autoclavado a 120°C por 20 minutos. Logo em seguida, uma alíquota de 50µL 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. Uma curva padrão variando entre 1,5–25µg de hidroxiprolina (Alfa Aesar, Massachusetts, EUA) foi preparada da mesma maneira. A reação colorimétrica foi iniciada pela adição do reagente de Ehrlich (1M de p-dimetilaminobenzaldeído diluído em N-propanol/ácido perclórico 2:1, v/v). As amostras foram centrifugadas (1500 g, 4°C por 10 min.) e o ensaio foi feito com 200µL do sobrenadante de cada amostra em uma placa de 96 poços (Sarstedt) e lida a absorvância no comprimento de onda de 550nm em leitor para microplacas (VersaMax). As concentrações das amostras foram obtidas pela interpolação das absorvâncias em gráfico obtido a partir da curva padrão de concentrações conhecidas (µg/mL de hidroxiprolina) no software SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices).

### 2.6.4 Mensuração dos granulomas

O lobo maior do fígado e a porção final do intestino delgado de camundongos não perfundidos foram utilizados para a análise histopatológica e quantificação da área do granuloma induzido pelas infecções experimentais pelas linhagens LE ou HS. Para isso, estes órgãos foram gentilmente retirados, e foram processados separadamente da seguinte forma: os fígados foram lavados em solução salina 0,85% (pH 7,2 a 37°C) e fixados em PBS contendo 10% de formalina por 24 horas; os intestinos foram abertos longitudinalmente e também lavados com solução salina 0,85%. Após a retirada dos detritos, as amostras de intestino foram transferidas para um papel de filtro com a superfície da mucosa voltada para cima e o tecido foi embebido em PBS contendo 10% de formalina. O material foi enrolado em volta de uma pequena superfície de madeira e amarrado em um formato de um rolo, que foi então fixado em uma nova solução de formalina tamponada (10%) por 24 h. Posteriormente, os fígados e intestinos foram lavados e hidratados por três horas em água corrente e finalmente conservado em álcool 70% até o seu processamento. Todo o material passou por uma desidratação progressiva em séries crescentes de álcool (70° GL a absoluto), clarificado em diluições crescentes de xilol e incluído em parafina. Os blocos foram submetidos a cortes de 5 µm de espessura em micrótomo. Estes cortes foram estendidos em banho maria 40°C, colhidos em lâminas de vidro e identificadas. Depois de secagem, desparafinização e reidratação, foi realizada a coloração tecidual com hematoxilina-eosina (LUNA, 1968). Imagens dos tecidos hepáticos e intestinais foram capturadas por uma câmera digital (Olympus DP12) acoplada a um microscópio óptico (Olympus BX41) e analisadas pelo software Image Pro-plus 4.0 em um aumento de 20x para a mensuração da área dos granulomas (expressa em µm<sup>2</sup>). Os granulomas mensurados (35 no fígado e 15 no intestino por grupo) foram aqueles na fase exudativa-produtiva, formados por um único ovo contendo o miracídio. Granulomas coalescentes (vários granulomas unidos), ou granulomas no qual o ovo não era visível ou estava destruído, foram excluídos da análise (REZENDE et al., 2020).

## 2.7 Análise estatística

Todos os dados foram inicialmente analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Foi utilizado o teste ANOVA (Two-way) seguido pelo teste de Bonferroni para a comparação das médias dos dados paramétricos entre mais de dois grupos e o teste T de Student quando comparado apenas dois grupos. As medianas dos dados com distribuição não paramétrica entre dois grupos foram submetidas ao teste de Mann-Whitney. Os dados referentes à curva de sobrevivência foram analisados pelo teste de Log-Rank. As frequências dos dados categóricos foram comparadas pelo teste exato de Fisher. Foram

considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ . Para a realização desses testes e construção dos gráficos, utilizaram-se os softwares GraphPad Prism versão 8 (Prism Software, Irvine, California, USA) e STATA versão 11.1 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Carga parasitária

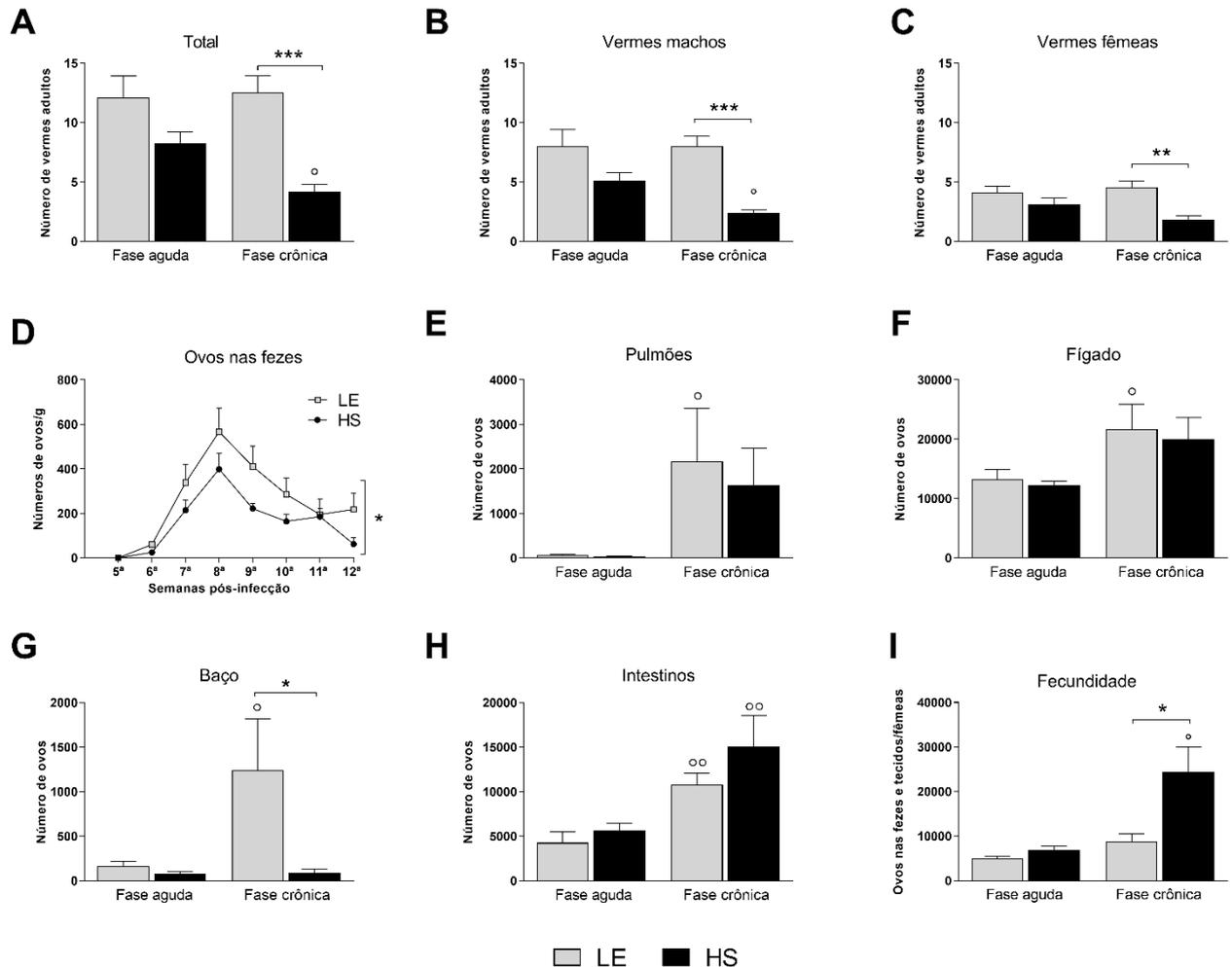
Conforme mostrado na **figura 31**, o número total de vermes adultos (**figura 31.A**) recuperados do sistema circulatório de camundongos infectados com a linhagem HS de *S. mansoni* foi menor do que o obtido de camundongos infectados com a linhagem LE, principalmente na fase crônica da esquistossomose. Portanto, o número de vermes recuperados em relação à dose de cercárias inoculadas (taxa de infectividade) para a linhagem LE foi de aproximadamente 24–25%, e para a linhagem HS, essa taxa foi de 16,5% na fase aguda e 8,4% na fase crônica. Uma redução semelhante foi observada no número de vermes machos (**Figura 31.B**) e fêmeas (**Figura 31.C**) em camundongos infectados com a linhagem HS. No entanto, a razão sexual dos vermes adultos (macho: fêmea) foi mais próxima da equidade (1,4:1) nas infecções com a linhagem HS quando comparada à linhagem LE (1,8:1), principalmente na fase crônica.

O período pré-patente da infecção por *S. mansoni* em camundongos BALB/c foi semelhante (41 dias de infecção) para ambas as linhagens (**figura 31.D**). No entanto, na 6ª semana de infecção, apenas 25% (5 camundongos ovo-positivos em um total de 20 camundongos infectados) dos camundongos BALB/c infectados com a linhagem HS eliminaram ovos do parasito nas fezes, comparado com 75% (15/20) de camundongos infectados com a linhagem LE. Essa frequência variou significativamente entre as linhagens ( $p < 0,05$ ). Embora o número de ovos de esquistossomos eliminados nas fezes de camundongos infectados com ambas as linhagens do parasito não tenha apresentado diferenças significativas em cada semana de análise, o número de ovos eliminados pelos camundongos infectados com a linhagem HS foi sempre inferior ao dos camundongos infectados com a linhagem LE. Portanto, a soma do número de ovos eliminados durante todos os exames semanais foi significativamente menor em camundongos infectados com a linhagem HS de *S. mansoni* (**figura 31.D**).

Embora o número de vermes recuperados de camundongos infectados com a linhagem HS tenha sido estatisticamente menor do que em camundongos infectados com a linhagem LE, o número de ovos do parasito retidos nos diferentes órgãos dos camundongos infectados

aumentou progressivamente durante a infecção por ambas as linhagens, sem diferenças estatísticas nos pulmões, fígado e intestinos (**figura 31.E, F e H**). No entanto, observou-se um número estatisticamente menor de ovos retidos no baço de camundongos que estavam cronicamente infectados com a linhagem HS em comparação com a linhagem LE (**figura 31.G**).

Embora o número de vermes fêmeas recuperados de camundongos infectados com a linhagem HS tenha sido estatisticamente menor do que em camundongos infectados com a linhagem LE, a fecundidade das fêmeas HS aumentou progressivamente. Portanto, na esquistossomose experimental crônica, as fêmeas HS apresentaram maior fecundidade em comparação com as fêmeas LE (**figura 31.I**).



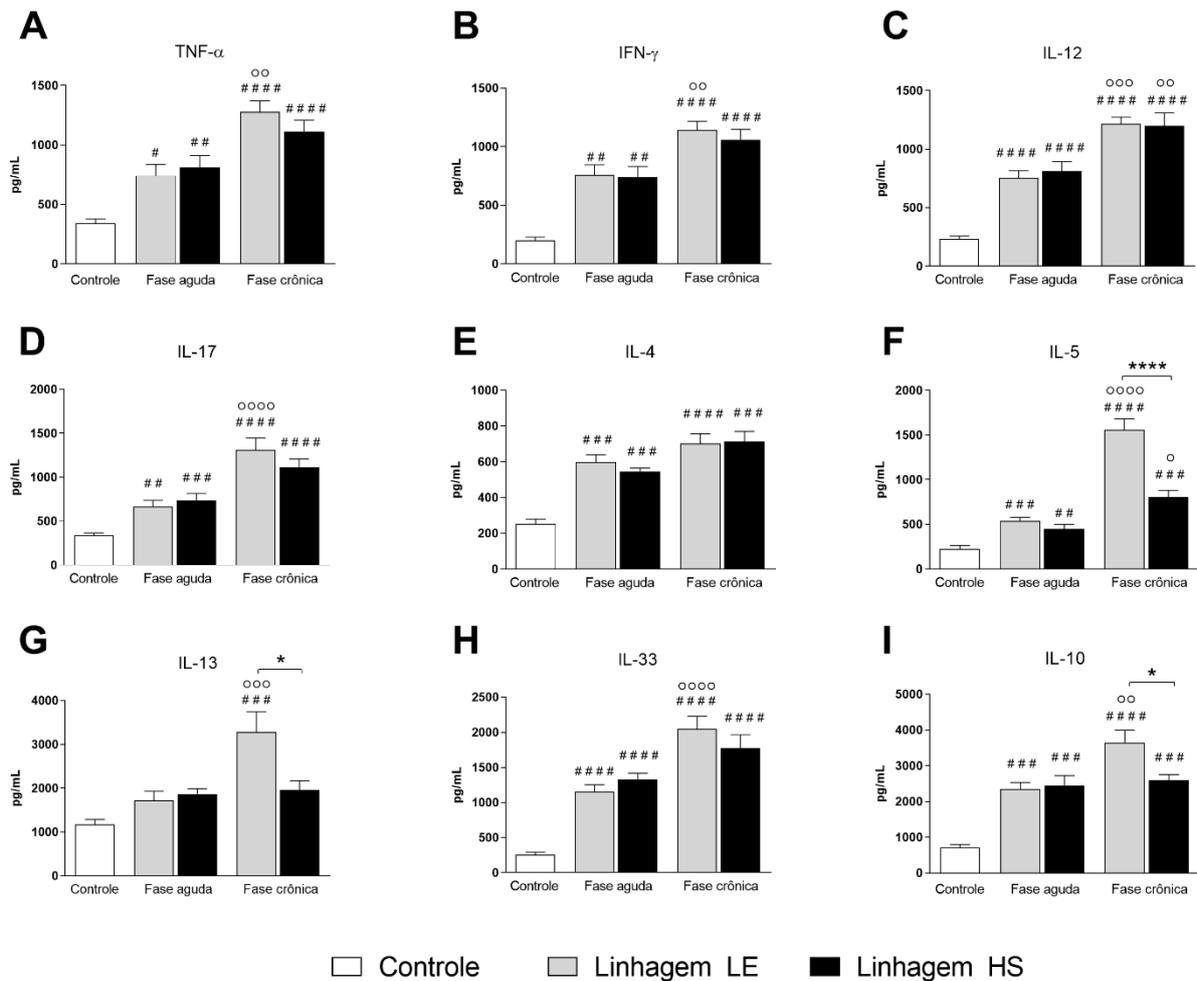
**Figura 31. Carga parasitária.** Número total de vermes (A), de machos (B), e de fêmeas (C) recuperados do sistema circulatório, número de ovos eliminados nas fezes (D) e retidos nos tecidos (E–H), e fecundidade de vermes fêmeas (I) em camundongos BALB/c infectados com *Schistosoma mansoni* das linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*). Camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente com 50 cercárias de *S. mansoni* da linhagem LE ou HS do parasito e eutanasiados na semana 8 (fase aguda) ou 12 (fase crônica) pós-infecção. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (7-10 animais/fase da infecção) e são apresentados como média ± erro padrão. A análise de variância (ANOVA Two-way) seguida do pós-teste de Bonferroni foi realizada para comparação entre os grupos. ° Dados estatisticamente diferentes entre as fases (aguda vs crônica) da infecção pela mesma linhagem. \* Dados estatisticamente diferentes entre os grupos LE vs HS (° ou \* p < 0,05; °° ou \*\* p < 0,01; °°° ou \*\*\* p < 0,001).

## 3.2 Resposta imunológica hepática

### 3.2.1 Perfil de citocinas Th1/Th2/Th17/Treg

Em geral, houve aumento na produção da maioria das citocinas (TFN- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-17, IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10) avaliadas no homogenato do fígado de animais infectados para ambas as linhagens de parasitos em comparação com animais não infectados. TFN- $\alpha$  (figura 32.A), IFN- $\gamma$  (figura 32.B), IL-12 (figura 32.C) e IL-17 (figura 32.D) mostraram um aumento progressivo no homogenato de fígado após a infecção, sem diferenças significativas

entre as linhagens de *S. mansoni* avaliadas. Os níveis hepáticos de IL-4 (**figura 32.E**) e IL-33 (**figura 32.H**) também foram semelhantes entre as linhagens. Em contraste, os animais cronicamente infectados com a linhagem HS apresentaram concentrações significativamente mais baixas de IL-5 (**figura 32.F**), IL-13 (**figura 32.G**) e IL-10 (**figura 32.I**) no homogenato de fígado, quando comparado com a linhagem LE.

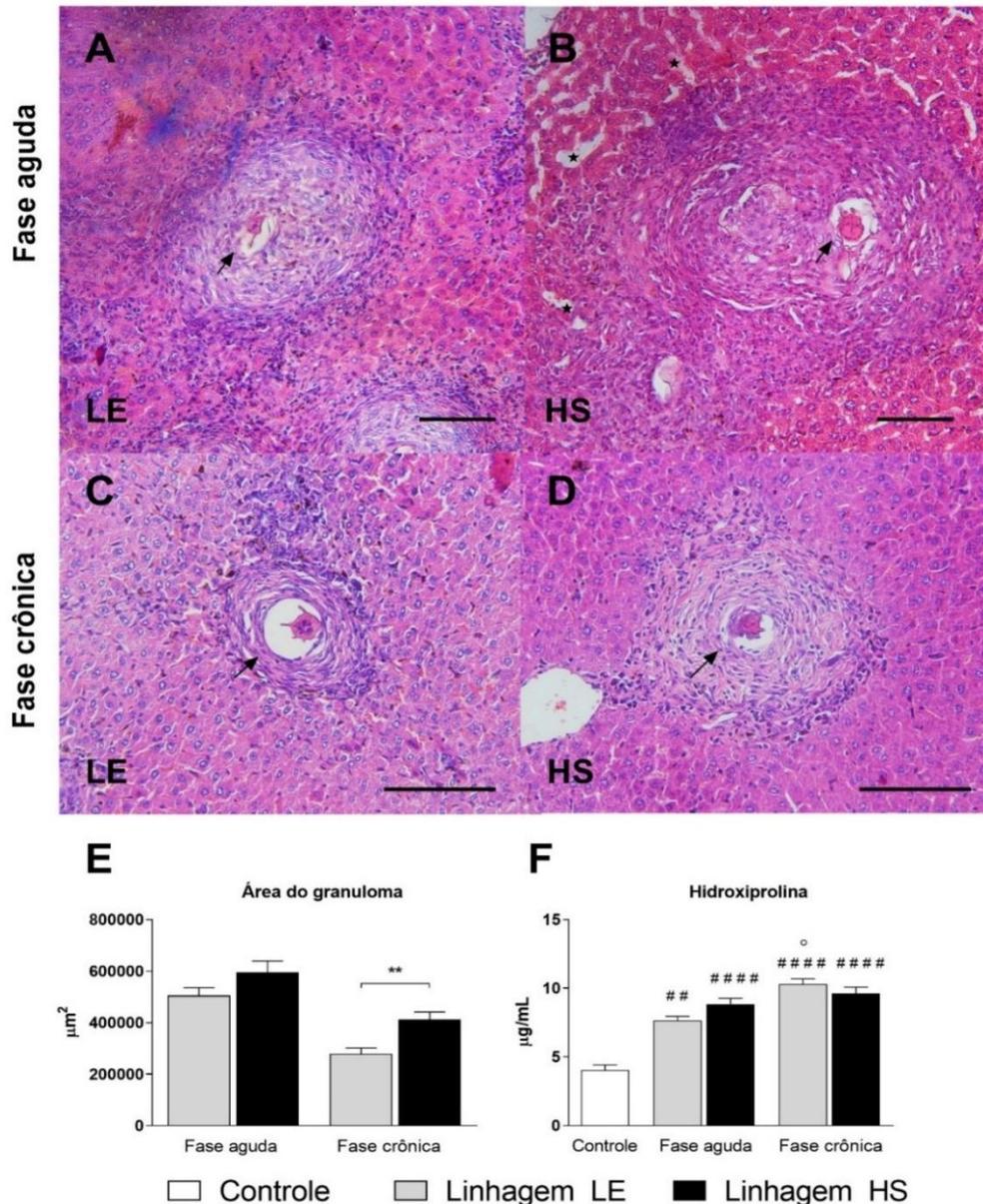


**Figura 32. Citocinas hepáticas.** Quantificação dos níveis de citocinas Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12) (A-C), Th17 (IL-17) (D), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 e IL-33) (E-H), e perfil regulatório (IL-10) (I) no homogenato de fígado de camundongos BALB/c não infectados e camundongos infectados com as linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*) de *Schistosoma mansoni*. Camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente com 50 cercárias de *S. mansoni* da linhagem LE ou HS do parasito e eutanasiados na semana 8 (fase aguda) ou 12 (fase crônica) pós-infecção. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (7-10 animais/fase da infecção) e são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. A análise de variância (ANOVA Two-way) seguida do pós-teste de Bonferroni foi realizada para comparação entre os grupos. # Dados estatisticamente significativos em comparação com o grupo controle; ° Dados estatisticamente diferentes entre as fases (aguda vs crônica) da infecção pela mesma linhagem. \* Dados estatisticamente diferentes entre os grupos LE vs HS (#, ° ou \*  $p < 0,05$ ; ##, °° ou \*\*  $p < 0,01$ ; ###, °°° ou \*\*\*  $p < 0,001$ ; ####, °°°° ou \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

### 3.2.2 Mensuração dos granulomas e dos níveis de hidroxiprolina

A análise morfométrica mostrou que os granulomas hepáticos formados durante a infecção pela linhagem HS foram maiores que os da linhagem LE, especialmente na esquistossomose crônica (**figura 33.D e C**, respectivamente). Na esquistossomose experimental aguda, a avaliação histopatológica revelou que ambas as linhagens induziram a formação de granulomas com intensa deposição de matriz extracelular e infiltrado inflamatório (**figura 33.A e B**). Entretanto, foi observada maior desorganização da matriz extracelular nos granulomas formados em animais infectados com a linhagem HS e os sinusóides hepáticos nestes animais apresentaram maior dilatação e congestão (**figura 33.B**). Em relação à esquistossomose crônica, os granulomas formados no fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* da linhagem LE apresentaram fibras colágenas depositadas de forma organizada e pouca infiltração celular (**figura 33.C**), enquanto que granulomas hepáticos induzidos por ovos da linhagem HS apresentaram muitas células inflamatórias e uma grande quantidade de fibras colágenas desorganizadas (**figura 33.D**).

A infecção por ambas as linhagens de *S. mansoni* resultou em um aumento significativo no conteúdo de hidroxiprolina no fígado dos grupos experimentais em comparação com o grupo controle. No entanto, em camundongos BALB/c infectados com a linhagem LE, as concentrações de hidroxiprolina aumentaram progressivamente durante a fase crônica da esquistossomose, enquanto no grupo infectado com a linhagem HS, o conteúdo de hidroxiprolina foi semelhante em 8 e 12 semanas de infecção por *S. mansoni* (**figura 33.F**).



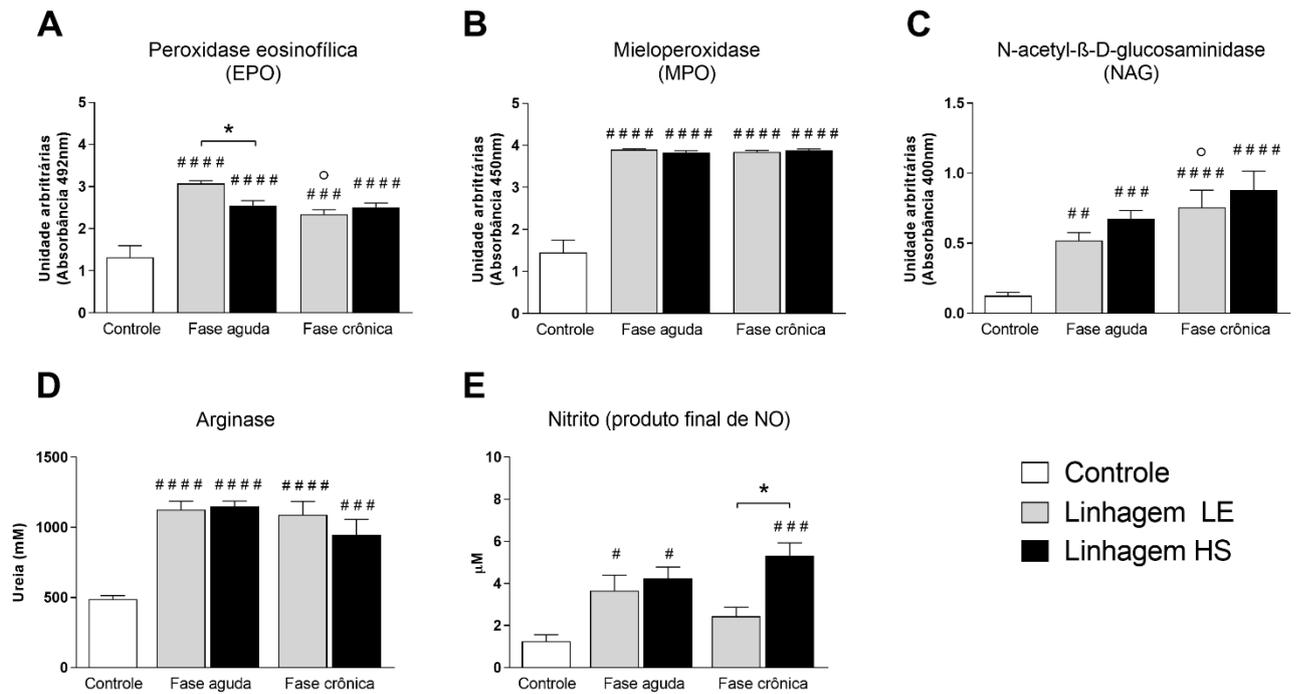
**Figura 33. Histopatologia hepática.** Seções de fígado de camundongos BALB/c infectados com as linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*) de *Schistosoma mansoni* nas fases aguda (A e B) e crônica (C e D) da esquistossomose, coradas com HE (20x; barra = 100 µm) e observadas em microscópio de campo claro. Morfometria da área do granuloma hepático (E). Concentração de hidroxiprolina no homogenato de fígado (F). Camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente com 50 cercárias de *S. mansoni* das linhagens LE ou HS e eutanasiados na semana 8 (fase aguda) ou 12 (fase crônica) pós-infecção. Um total de 35 granulomas isolados contendo um único ovo viável (setas pretas) foram medidos em cada grupo experimental para a avaliação da área do granuloma. Estrelas pretas indicam sinusóides hepáticos com maior dilatação e congestão. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (7-10 animais/fase da infecção) e apresentados como média ± erro padrão. O teste de Mann-Whitney foi realizado para comparar a área do granuloma, e análise de variância (ANOVA Two-way) seguida do pós-teste de Bonferroni foi realizada para comparar as concentrações de hidroxiprolina entre os grupos. # Dados estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle; ° Dados estatisticamente diferentes entre as fases (aguda vs crônica) da infecção pela mesma linhagem. \* Dados estatisticamente diferentes entre os grupos LE e HS (#, ° ou \* p < 0,05; ##, °° ou \*\* p < 0,01; ###, °°° ou \*\*\* p < 0,001; ####, °°°° ou \*\*\*\* p < 0,0001).

### 3.2.3 Infiltrado e ativação celular tecidual de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos

Os animais infectados com as linhagens LE ou HS do parasito, independente da fase da esquistossomose, apresentaram níveis elevados de EPO e MPO no homogenato hepático quando comparados aos animais não infectados, indicando maior recrutamento e ativação de eosinófilos e neutrófilos, respectivamente (**figura 34.A e B**). No entanto, a atividade de EPO no homogenato de fígado de camundongos BALB/c agudamente infectados com a linhagem HS do trematódeo foi significativamente menor do que nos fígados de animais infectados com a linhagem LE (**figura 34.A**). Em contraste, os níveis de atividade de MPO nos fígados de animais infectados foram estatisticamente semelhantes para ambas as linhagens avaliadas (**figura 34.B**).

Em relação aos macrófagos, houve um aumento significativo nos níveis de atividade de NAG nos homogenatos hepáticos dos animais infectados com as linhagens LE e HS em ambas as fases da infecção quando comparados ao grupo controle, indicando maior recrutamento e ativação dessas células no fígado. Além disso, não foram detectadas diferenças significativas na atividade de NAG nos homogenatos de fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* da linhagem LE e HS. Apenas os animais que foram cronicamente infectados com a linhagem LE apresentaram níveis aumentados de NAG em comparação com sua própria fase aguda (**figura 34.C**).

Adicionalmente, o perfil de ativação de macrófagos infiltrados foi indiretamente determinado pela produção de nitrito, o produto final do óxido nítrico (perfil M1), e pela atividade de arginase (perfil M2). Assim, a atividade da arginase no fígado também foi significativamente elevada em animais infectados com as linhagens de *S. mansoni* em comparação ao grupo controle. No entanto, não houve diferenças nos níveis de atividade da arginase entre as fases da infecção ou entre as linhagens de *S. mansoni* avaliadas (**figura 34.D**). A concentração de nitrito no homogenato hepático dos animais com esquistossomose aguda provocada por ambas as linhagens do parasito aumentou significativamente em comparação com o grupo controle. No entanto, a concentração de nitrito aumentou progressivamente apenas em camundongos infectados com a linhagem HS de *S. mansoni*. Portanto, em camundongos cronicamente infectados, a concentração de nitrito no fígado foi significativamente maior em camundongos infectados com a linhagem HS do que em camundongos infectados com a linhagem LE (**figura 34. E**).



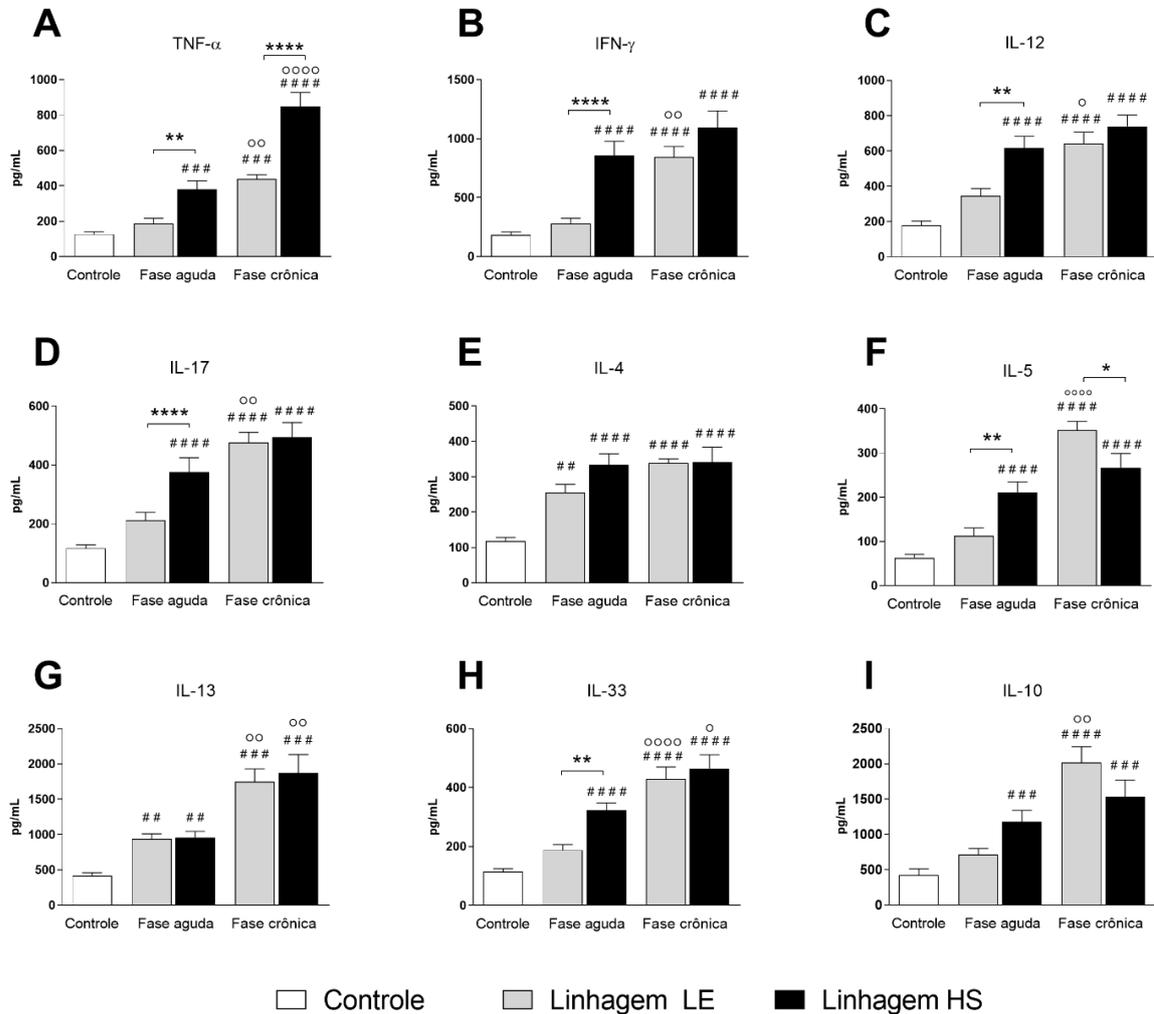
**Figura 34. Infiltração e ativação celular hepática.** Atividade enzimática da peroxidase eosinofílica (A), mieloperoxidase (B), N-acetyl-β-D-glucosaminidase (C), atividade da arginase (D) e concentração de nitrito (E) nos homogenatos hepáticos de camundongos BALB/c não infectados e camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* das linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*). Camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente com 50 cercárias de *S. mansoni* da linhagem LE ou HS do parasito e sacrificados na semana 8 (fase aguda) ou 12 (fase crônica) pós-infecção. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (7-10 animais/fase da infecção) e apresentados como média ± erro padrão. A análise de variância (ANOVA Two-way) seguida do pós-teste de Bonferroni foi realizada para a comparação entre os grupos. # Dados estatisticamente significativos em comparação com o grupo controle; ° Dados estatisticamente diferentes entre as fases (aguda vs crônica) da infecção pela mesma linhagem. \* Dados estatisticamente diferentes entre os grupos LE vs HS (#, ° ou \* p < 0,05; ##, °° ou \*\* p < 0,01; ###, °°° ou \*\*\* p < 0,001; #### #, °°°° ou \*\*\*\* p < 0,0001).

### 3.4 Resposta imunológica intestinal

#### 3.4.1 Perfil de citocinas Th1/Th2/Th17/Treg

A infecção por *S. mansoni* também resultou em um aumento progressivo dos níveis de citocinas no homogenato intestinal de camundongos infectados com ambas as linhagens do parasito. Durante a esquistossomose aguda, as concentrações de TFN-α (figura 35.A), IFN-γ (figura 35.B), IL-12 (figura 35.C), IL-17 (figura 35.D), IL-5 (figura 35.F) e IL-33 (figura 35.H) foram significativamente maiores nos camundongos infectados com a linhagem HS em comparação com os camundongos infectados com LE, o que foi diferente do padrão observado no fígado. As concentrações de IL-4 nos homogenatos intestinais foram significativamente maiores nos animais infectados com ambas as linhagens do parasito do que no grupo controle, mas sem diferenças significativas entre as fases aguda e crônica (figura 35.E). Além disso, a linhagem HS induziu um aumento significativo de TNF-α e uma redução de IL-5 em

comparação com a linhagem LE após 12 semanas de infecção por *S. mansoni* (figura 35.A e F, respectivamente).



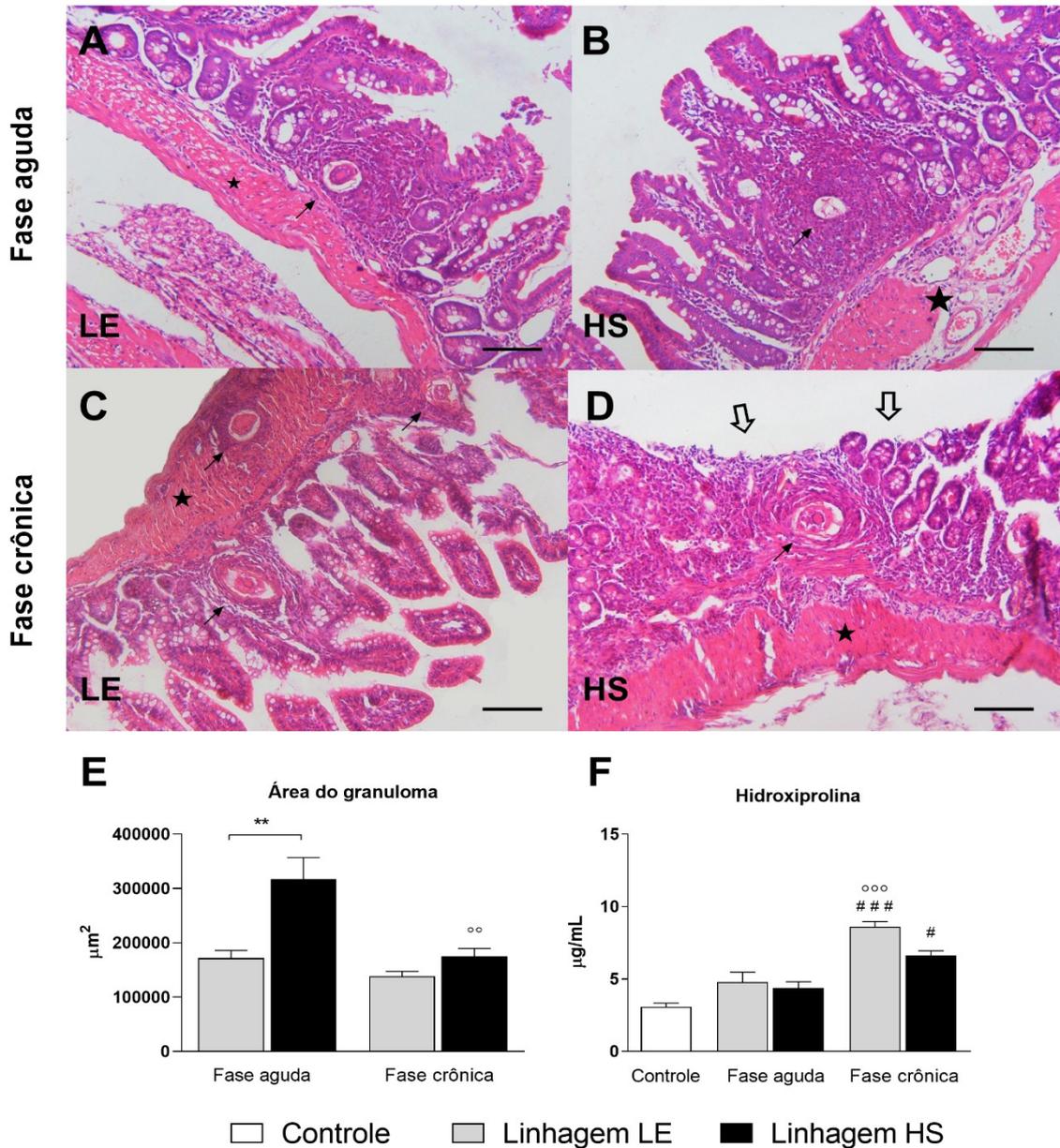
**Figura 35. Citocinas do intestino delgado.** Quantificação dos níveis de citocinas Th1 (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-12) (A–C), Th17 (IL-17) (D), Th2 (IL-4, IL-5, IL-13 e IL -33) (E–H) e perfil regulatório (IL-10) (I) em homogenato de íleo de camundongos BALB/c não infectados e camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* das linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*). Camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente com 50 cercárias de *S. mansoni* da linhagem LE ou HS do parasito e eutanasiados na semana 8 (fase aguda) ou 12 (fase crônica) pós-infecção. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (7-10 animais/fase da infecção) e apresentados como média  $\pm$  erro padrão. A análise de variância (ANOVA Two-way) seguida do pós-teste de Bonferroni foi realizada para comparação entre os grupos. # Dados estatisticamente significativos em comparação com o grupo controle; ° Dados estatisticamente diferentes entre as fases (aguda vs crônica) da infecção pela mesma linhagem. \* Dados estatisticamente diferentes entre os grupos LE vs HS (#, ° ou \* p < 0,05; ###, °° ou \*\* p < 0,01; ###, °°° ou \*\*\* p < 0,001; ###, °°°° ou \*\*\*\* p < 0,0001).

### 3.4.2 Mensuração dos granulomas e dos níveis de hidroxiprolina

A análise morfométrica dos granulomas intestinais mostrou que a infecção com a linhagem HS também induziu a formação de granulomas maiores em comparação com a

linhagem LE, principalmente na esquistossomose aguda (**figura 36.A, B e E**). Na fase crônica da esquistossomose, houve redução do tamanho dos granulomas intestinais em camundongos infectados por ambas as linhagens do parasito, mas sem diferenças significativas entre LE e HS ou entre as fases da infecção (**figura 36.C, D e E**). A análise histopatológica também revelou que o íleo de camundongos infectados com a linhagem HS de *S. mansoni* apresentou áreas de intensa infiltração celular na lâmina própria e espessamento da camada muscular da mucosa, o que foi menos evidente em camundongos infectados com a linhagem LE. Além disso, o intestino delgado de camundongos infectados com HS apresentou áreas de erosão epitelial e ruptura da arquitetura normal das vilosidades (**figura 36.D**), o que não foi observado com a mesma frequência nos camundongos infectados com parasitos da linhagem LE (**figura 36.C**).

O conteúdo de hidroxiprolina no homogenato intestinal de animais experimentalmente infectados com a linhagem LE ou HS na esquistossomose aguda foi semelhante. Além disso, houve um aumento progressivo na concentração de hidroxiprolina em animais cronicamente infectados com ambas as linhagens avaliadas, particularmente em camundongos infectados com LE (**figura 36.F**).

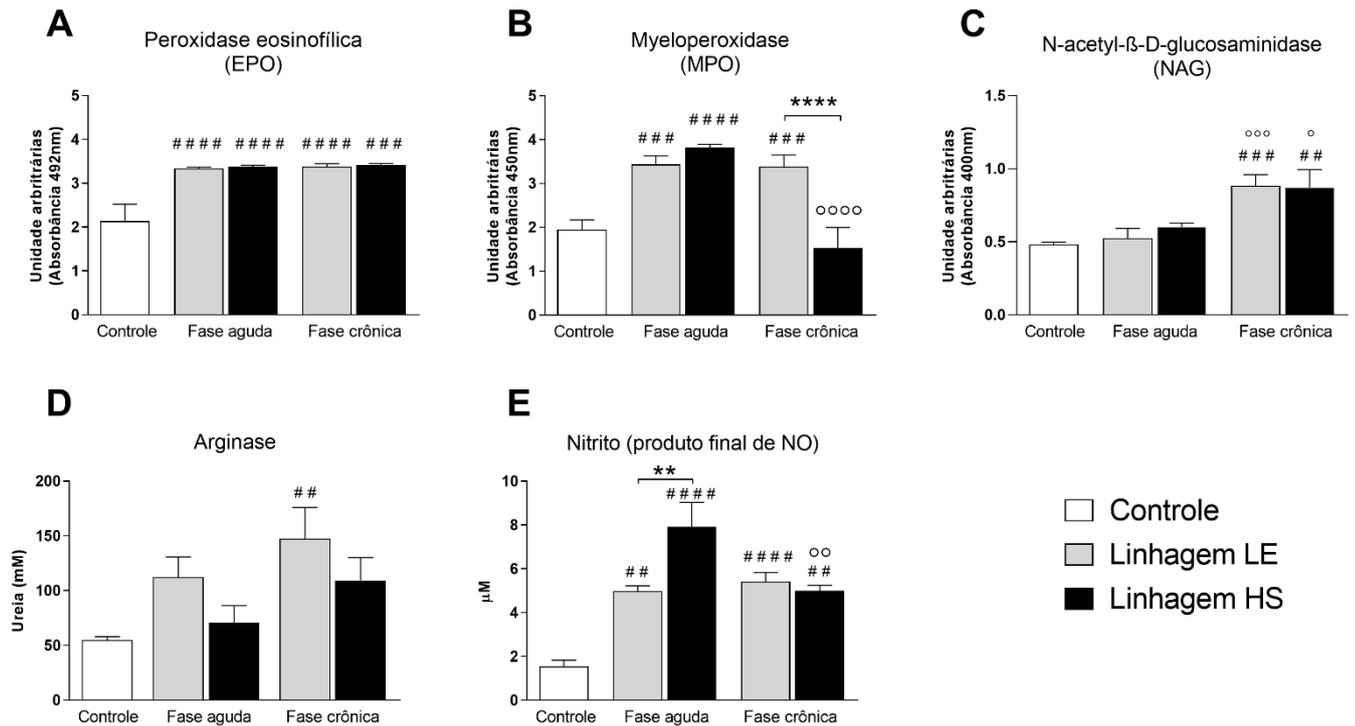


**Figura 36. Histopatologia do intestino delgado.** Seções de íleo de camundongos BALB/c infectados com as linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*) de *Schistosoma mansoni* na fase aguda (A e B) e crônica (C e D) da esquistossomose, coradas com HE (20x; barra = 100 μm) e observadas em microscópio de campo claro. Morfometria da área do granuloma intestinal (E). Concentração de hidroxiprolina no homogenato intestinal (F). Camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente com 50 cercárias da linhagem LE ou HS de *S. mansoni* e eutanasiados na semana 8 (fase aguda) ou 12 (fase crônica) pós-infecção. Pelo menos 15 granulomas isolados contendo um único ovo viável (setas pretas) por grupo foram medidos para avaliação da área do granuloma. As estrelas pretas indicam a camada muscular da mucosa (o tamanho da estrela é proporcional ao grau de alteração do tecido). As setas sem cor mostram a destruição das vilosidades do intestino delgado. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (7-10 animais/fase da infecção) e apresentados como média ± erro padrão. O teste de Mann-Whitney foi realizado para comparar a área do granuloma e a análise de variância (ANOVA Two-way) seguida do pós-teste de Bonferroni foi realizada para comparar as concentrações de hidroxiprolina entre os grupos. # Dados estatisticamente significativos em comparação com o grupo controle; ° Dados estatisticamente diferentes entre as fases (aguda vs crônica) da infecção pela mesma linhagem. \* Dados estatisticamente diferentes entre os grupos LE vs HS (#, ° ou \* p < 0,05; ###, °° ou \*\* p < 0,01; ####, °°° ou \*\*\* p < 0,001).

### 3.4.3 Infiltrado e ativação celular tecidual de eosinófilos, neutrófilos e macrófagos

Em relação à infiltração e ativação tecidual de células polimorfonucleares no intestino delgado, os animais infectados com a linhagem LE apresentaram aumento nos níveis de EPO e MPO em comparação aos animais não infectados, indicando um aumento no recrutamento e ativação de eosinófilos e neutrófilos, respectivamente (**figura 37.A e B**). Um aumento estatisticamente semelhante na atividade de EPO foi detectado no homogenato intestinal de camundongos infectados com a linhagem HS ou LE do parasito, mas sem diferenças significativas entre os dois grupos infectados (**figura 37.A**). A infecção aguda por *S. mansoni* em ambas as linhagens também induziu um aumento significativo na atividade de MPO no homogenato intestinal, mas a atividade enzimática foi significativamente reduzida em camundongos infectados com a linhagem HS após 12 semanas de infecção; portanto, a atividade de MPO em animais cronicamente infectados com HS foi significativamente menor do que no grupo infectado com a linhagem LE (**figura 37.B**).

Animais cronicamente infectados com as linhagens LE ou HS de *S. mansoni* apresentaram altos níveis de NAG em comparação com animais não infectados, indicando maior recrutamento de macrófagos para o intestino delgado. Além disso, houve um aumento da atividade NAG no homogenato intestinal da fase aguda para a crônica da infecção para ambas as linhagens do parasito. Em relação ao perfil de ativação de macrófagos no homogenato intestinal, apenas camundongos infectados com a cepa LE de *S. mansoni* apresentaram aumento progressivo da atividade da arginase, resultando em uma diferença significativa na esquistossomose crônica em relação ao grupo controle (**figura 37.D**). Em contraste, a concentração de nitrito no homogenato intestinal foi significativamente maior em todos os animais infectados (linhagens LE ou HS) em comparação com os animais não infectados. No entanto, na fase aguda da esquistossomose, a concentração de nitrito foi significativamente maior no homogenato intestinal de camundongos infectados com HS do que em camundongos infectados com LE (**figura 37.E**), indicando um ambiente inflamatório Th1 predominante nesses animais infectados.



**Figura 37. Infiltração e ativação celular intestinal.** Atividade enzimática da peroxidase eosinofílica (A), mieloperoxidase (B), N-acetyl-β-D-glucosaminidase (C), atividade da arginase (D) e concentração de nitrito (E) no homogenato de íleo de camundongos BALB/c não infectados e camundongos infectados com as linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*) de *Schistosoma mansoni*. Camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente com 50 cercárias de *S. mansoni* da cepa do parasita LE ou HS e sacrificados na semana 8 (fase aguda) ou 12 (fase crônica) pós-infecção. Os dados são representativos de dois experimentos independentes (7-10 animais/fase da infecção) e apresentados como média ± erro padrão. A análise de variância (ANOVA Two-way) seguida do pós-teste de Bonferroni foi realizada para a comparação entre os grupos. # Dados estatisticamente significativos em comparação com o grupo controle; ° Dados estatisticamente diferentes entre as fases (aguda vs crônica) da infecção pela mesma linhagem. \* Dados estatisticamente diferentes entre os grupos LE vs HS (#, ° ou \* p < 0,05; ##, °° ou \*\* p < 0,01; ###, °°° ou \*\*\* p < 0,001; #### #, °°°° ou \*\*\*\* p < 0,0001).

### 3.5 Sinais clínicos de morbidade da esquistossomose

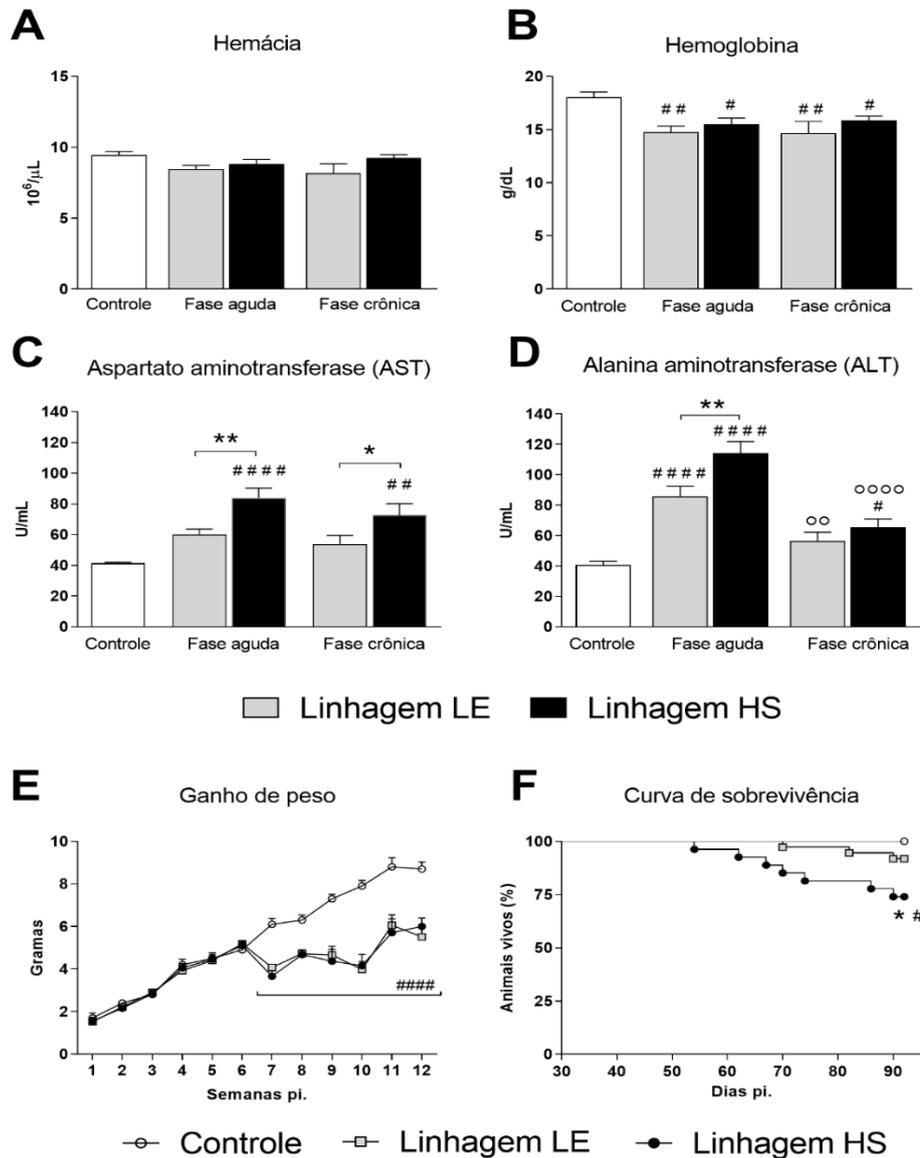
A gravidade da morbidade associada à esquistossomose em camundongos infectados experimentalmente com ambas as linhagens do parasito foi avaliada comparativamente pela frequência de sangue oculto nas fezes, contagem de glóbulos vermelhos e concentração de hemoglobina em amostras de sangue. Adicionalmente, foram avaliadas a atividade das transaminases, variação de peso e taxa de mortalidade. Animais experimentalmente infectados com a linhagem LE ou HS de *S. mansoni* apresentaram aumento progressivo de sangue oculto nas fezes durante a infecção. Durante a esquistossomose aguda, sangue oculto foi detectado em 40% das amostras de fezes de camundongos infectados com a linhagem HS (4 camundongos positivos para sangue oculto nas fezes de 10 animais infectados) em comparação com 20% (2/10) em camundongos infectados com a linhagem LE. Durante a fase crônica da infecção

experimental, 100% (7/7) dos animais infectados com a linhagem HS e 86% (6/7) dos infectados com parasitos da linhagem LE apresentaram sangue oculto nas fezes.

Para avaliar a anemia em camundongos infectados, a concentração de hemoglobina e o número de glóbulos vermelhos foram avaliados. Não houve diferença no número de glóbulos vermelhos entre quaisquer grupos (**figura 38.A**); no entanto, a infecção por *S. mansoni* (linhagem LE ou HS) resultou em uma redução significativa nos níveis de hemoglobina em ambas as fases da esquistossomose quando comparado com camundongos não infectados (**figura 38.B**).

Conforme demonstrado em estudos anteriores utilizando modelos experimentais (OLIVEIRA et al., 2022) e na população humana (DESSIE et al., 2020), a infecção por *S. mansoni* induziu aumento da atividade das transaminases na circulação, indicando lesão hepática do hospedeiro. No presente estudo, a infecção com a linhagem HS de *S. mansoni* induziu um aumento significativo na atividade de AST no plasma em comparação com os animais não infectados e com camundongos infectados com a linhagem LE do parasito, em ambas as fases da esquistossomose (**figura 38.C**). Além disso, houve um aumento significativo nos níveis de atividade de ALT durante a esquistossomose aguda, que foi reduzido durante a fase crônica da doença em camundongos infectados com ambas as linhagens do parasito. No entanto, na esquistossomose aguda, camundongos infectados com a linhagem HS mostraram atividade de ALT significativamente maior do que camundongos infectados com a linhagem LE (**figura 38.D**), sugerindo maior dano hepático.

Finalmente, para avaliar a evolução da esquistossomose nos camundongos infectados experimentalmente, as variações de peso e as taxas de mortalidade foram monitoradas. Todos os animais (infectados e não infectados) apresentaram ganho de peso semelhante até a 6ª semana de avaliação. Após esse período, camundongos infectados com qualquer linhagem (LE ou HS) de *S. mansoni* apresentaram perda de peso durante a esquistossomose aguda pós-postural, resultando em uma cinética de ganho de peso corporal significativamente menor em comparação ao grupo controle; no entanto, não houve diferenças na cinética de ganho de peso entre os camundongos infectados com qualquer linhagem do parasito (**figura 38.E**). No entanto, a infecção experimental com *S. mansoni* da linhagem HS induziu mortalidade precoce (na fase aguda, 50 dias) e a taxa de mortalidade foi estatisticamente mais elevada quando comparada com o grupo controle e os camundongos infectados com a linhagem LE (**figura 38.F**), sugerindo uma maior morbidade grave da esquistossomose.



**Figura 38. Gravidade da esquistossomose.** Contagem de glóbulos vermelhos (A), concentração de hemoglobina (B), atividade plasmática de aspartato aminotransferase (AST) (C) e alanina aminotransferase (ALT) (D), variação de peso corporal (E) e taxa de mortalidade (F) de BALB não infectado/c e infectados com as linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*) de *Schistosoma mansoni*. Camundongos BALB/c foram infectados subcutaneamente com 50 cercárias de *S. mansoni* da linhagem LE ou HS e eutanasiados na semana 8 (fase aguda) ou 12 (fase crônica) pós-infecção. Os dados compilam os resultados de dois experimentos independentes (14–20 animais/fase da infecção) e são apresentados como média ± erro padrão. A análise de variância (ANOVA Two-way) seguida do pós-teste de Bonferroni foi realizada para a comparação dos dados dos exames de sangue, atividade das transaminases e variação do peso corporal entre os grupos. O teste de Log-Rank foi realizado para comparar as curvas de mortalidade entre os grupos. # Dados estatisticamente significativos em comparação com o grupo controle; ° Dados estatisticamente diferentes entre as fases (aguda vs crônica) da infecção pela mesma linhagem. \* Dados estatisticamente diferentes entre os grupos LE vs HS (#, ° ou \* p < 0,05; ##, °° ou \*\* p < 0,01; ###, °°° ou \*\*\* p < 0,001; ####, °°°° ou \*\*\*\* p < 0,0001).

#### 4. DISCUSSÃO

O trematódeo *S. mansoni* utiliza os humanos como seus principais hospedeiros vertebrados; no entanto, infecções naturais por este parasita em roedores selvagens também foram relatadas em locais com transmissão ativa e persistente da esquistossomose na África (DUPLANTIER e SÈNE, 2000; CATALANO et al., 2018) e nas Américas (THÉRON, 1984; THÉRON et al., 1992; GENTILE et al., 2006; DO CARMO-SILVA et al., 2019). Vários estudos (THÉRON, 1984; BARRAL et al., 1996; SIRE et al., 1999; CATALANO et al., 2020) propuseram que esses roedores silvestres participem do ciclo de vida de *S. mansoni*, permitindo o surgimento de diferentes linhagens e genótipos do parasito, cujo impacto na gravidade da esquistossomose humana permanece desconhecido. No presente estudo, foi demonstrado que camundongos BALB/c foram menos suscetíveis à infecção experimental com a linhagem HS de *S. mansoni*, que foi isolada de *H. sciureus* naturalmente infectado capturado em uma área endêmica para esquistossomose intestinal no Nordeste do Brasil, em comparação com a infecção experimental com a linhagem LE de *S. mansoni*, uma cepa isolada de um ser humano infectado. Além disso, camundongos BALB/c infectados com HS apresentaram maior indução da resposta imune Th1/Th17 na esquistossomose aguda e menor resposta Th2/Treg durante a fase crônica da infecção experimental, o que resultou em uma reação inflamatória mais intensa e maior dano tecidual, acompanhado pela alta mortalidade.

A carga parasitária de *S. mansoni* está diretamente associada à patogenicidade da esquistossomose (Bina e Prata, 2003; Euzébio et al., 2012) e a suscetibilidade do hospedeiro varia entre as cepas de *S. mansoni* (WARREN et al., 1967; BASTOS et al., 1979; MARTINEZ et al., 2003; FREIRE et al., 2003; EUZÉBIO et al., 2012). Nossos dados atuais de experimentos com a linhagem LE humana e estudos anteriores usando *S. mansoni* obtidos de humanos infectados de diferentes áreas geográficas mostraram que o número de vermes adultos recuperados varia de 21 a 60% da dose infectante (WARREN et al., 1967; ANDERSON; CHEEVER, 1972; MARTINEZ et al., 2003; FREIRE et al., 2003). Esta é uma taxa maior quando comparada aos achados do presente estudo para a infecção experimental com a linhagem HS, que mostrou taxas de recuperação de 16,5% e 8,4%, nas fases aguda e crônica da esquistossomose, respectivamente. Diferenças nos parâmetros parasitológicos também foram verificadas por Martinez et al. (2003), que compararam a infecção experimental utilizando duas cepas de *S. mansoni*: a cepa CMO, isolada de *Oryzomys subflavus* infectado capturado no estado do Rio Grande do Norte, Brasil, e a cepa CM, isolada de um humano do estado de Pernambuco, Brasil. A infecção com a cepa CMO fez com que menos ovos fossem eliminados nas fezes e

retidos no intestino grosso quando comparado com a infecção experimental com a cepa CM. Em contraste, Freire et al. (2003) demonstraram que a infecção experimental de camundongos com a cepa SR de *S. mansoni* isolada de *N. squamipes* capturada na cidade do Rio de Janeiro, Brasil, teve uma carga parasitária semelhante à de camundongos experimentalmente infectados com a cepa SH humana isolada do mesmo local. No entanto, é importante considerar que esses dois isolados do parasito foram obtidos da mesma zona de transmissão da esquistossomose, e a mesma cepa de *S. mansoni* poderia ser responsável pelas infecções de roedores silvestres e humanos. Contrariamente, mesmo comparando cepas do mesmo local, Bastos et al. (1979) mostraram que camundongos infectados experimentalmente com a cepa de *S. mansoni* obtida de roedores selvagens naturalmente infectados, tiveram um número menor de vermes recuperados quando comparados com a infecção experimental utilizando a linhagem humana do parasito. Esses dados anteriores, juntamente com os achados do presente estudo, sugerem que *S. mansoni* isolado de roedores silvestres teria menor compatibilidade parasita-hospedeiro em modelos experimentais.

Entretanto, nós precisamos levar em consideração que a linhagem LE de *S. mansoni* utilizada como referência nas comparações deste estudo, é mantida em laboratório desde a década de 60 (VALADARES et al., 1981), e, portanto, poderia ter perdido parte de suas características originais, além de ter se tornado mais adaptada aos modelos de laboratório utilizados nas infecções de rotina. Embora esse seja um importante ponto de vista a ser discutido, nós observamos que ao longo das sucessivas infecções em laboratório, a linhagem LE de *S. mansoni* apresentou uma variação da sua taxa de infectividade em camundongos de 34% na década de 70 (KATZ et al., 1983) a 20–25% em nossas publicações mais recentes (MAGGI et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2022), o que sugere que as sucessivas passagens da linhagem LE em laboratório não aumentaram a sua infectividade aos modelos experimentais.

Além do número reduzido de vermes adultos recuperados em camundongos infectados com *S. mansoni* HS, os vermes fêmeas dessa linhagem apresentaram maior taxa de fecundidade. É possível que a menor densidade de vermes detectada em camundongos BALB/c infectados com *S. mansoni* HS tenha favorecido um ambiente com menor competição por nutrientes (WEBSTER et al., 2020), o que pode ter permitido que as fêmeas atingissem seu máximo potencial reprodutivo. Outro ponto a ser considerado é a redução da resposta Th-2 observada nos animais infectados pela linhagem HS, fator que pode reduzir mecanismos anti-fecundidade do hospedeiro. As diferenças nas taxas de fecundidade de vermes observadas entre *S. mansoni* das linhagens HS e LE podem ser determinantes na gravidade da doença e merecem mais estudos.

A taxa de infecção e fecundidade de *S. mansoni* podem variar devido à resposta imune induzida pelo hospedeiro vertebrado, pois é um fator determinante nessa interação (McMANUS et al., 2018; ANGELES et al., 2020; HAMBROOK; HANINGTON, 2021). Além disso, o tipo e a intensidade dessa resposta imune também são essenciais para a compreensão do desenvolvimento da morbidade associada à esquistossomose (ABATH et al., 2006; PEARCE; MACDONALD, 2002). Curiosamente, apesar da menor carga parasitária, a infecção experimental com a linhagem HS de *S. mansoni* induziu profundas alterações na resposta imune do hospedeiro e na patologia da esquistossomose experimental, quando comparada com a cepa humana de referência (LE) utilizada no presente estudo. Especificamente, camundongos infectados com HS mostraram uma redução significativa nos marcadores de resposta imune tipo 2 no fígado, como atividade de EPO e concentrações de IL-5 e IL-13, que foi acompanhada por um aumento nos produtos finais de NO, especialmente durante esquistossomose crônica. Uma redução significativa na concentração de IL-5 também foi detectada no homogenato intestinal de camundongos cronicamente infectados com a cepa HS. Estudos anteriores mostraram que a esquistossomose induz predominantemente uma resposta imune do tipo 2 associada a altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13, o que favorece a infiltração de eosinófilos nos tecidos e a ativação de macrófagos M2 (DUNNE et al., 1992; CHEEVER et al., 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002; PEARCE et al., 2004; MASAMBA; KAPPO, 2021). Também foi demonstrado em modelo experimental que a ausência ou redução da resposta imune do tipo 2 prejudica a formação adequada de granulomas e contribui para a indução de uma inflamação descontrolada do tipo 1, causando uma maior taxa de mortalidade em camundongos (BRUNET et al., 1997). Além de IL-4, altos níveis de IL-13 são necessários para a adequada polarização dos macrófagos M2, o que é essencial para reduzir os efeitos da esquistossomose mais grave (HERBERT et al., 2004). Em população humana foi demonstrado que altos níveis de citocinas Th1 (TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e baixa produção de IL-5 (Th2) estavam associados aos casos graves de esquistossomose hepatoesplênica (MWATHA et al., 1998).

Paralelamente à redução da resposta Th2 no fígado, camundongos infectados com a linhagem HS de *S. mansoni* também apresentaram menores concentrações de IL-10 durante a esquistossomose crônica. A produção de IL-10 durante essa fase da infecção tem sido associada ao aumento da proliferação de uma rede reguladora de células, que modula a resposta imune e promove a sobrevivência do hospedeiro, pois controla a intensidade do dano tecidual e fibrose induzida pela formação dos granulomas (HESSE et al., 2004; BOOTH et al., 2004; MARTINS-LEITE et al., 2008). A modulação da resposta imune promovida pela citocina IL-10 também se mostrou essencial para a sobrevivência de *S. mansoni*, pois também regula a ação das células

efetoras contra o parasito (HESSE et al., 2004; ANGELES et al., 2020); isso está de acordo com a menor taxa de recuperação dos vermes da linhagem HS na fase crônica da esquistossomose, o que foi verificado no presente estudo.

No intestino, há uma clara indução do perfil inflamatório Th1/Th17 na fase aguda da infecção, com aumento significativo das concentrações de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 e IL-17, acompanhado de maior detecção de nitrito. Estudos experimentais anteriores mostraram que a predominância de uma resposta tipo 1 durante a esquistossomose está associada a intenso dano tecidual, como hemorragia intestinal, caquexia e hepatotoxicidade, causados pela alta produção de NO induzido por TNF- $\alpha$  (BRUNET et al., 1997; HOFFMANN et al., 2000). Sabe-se que um ambiente inflamatório predominantemente tipo 1 favorece a ativação clássica de macrófagos produtores de NO (COULSON et al., 1998; GORDON, 2003), uma molécula capaz de gerar extensa lesão oxidativa tecidual e que foi associada a alta mortalidade durante a esquistossomose experimental (LA FLAMME et al., 2001; BARRON; WYNN, 2011). Além disso, foi demonstrado que a resposta Th17 está intimamente associada à gravidade da esquistossomose, pois pode promover inflamação exacerbada (RUTITZKY; STADECKER, 2006; ZHANG et al., 2012) e fibrose hepática (WANG et al., 2015). Portanto, a infecção com a linhagem HS de *S. mansoni* induz forte inflamação intestinal associada aos perfis Th1/Th17, o que provavelmente promove um aumento na ativação de macrófagos M1 produtores de NO.

Curiosamente, mesmo com predomínio da resposta imune tipo 1 no tecido intestinal na fase aguda da esquistossomose, a infecção pela linhagem HS também promoveu aumento nos níveis de citocinas do perfil tipo 2, como IL-33 e IL-5. Os altos níveis dessas duas citocinas eram esperados, uma vez que IL-33 é considerada uma alarmina que é produzida e liberada no espaço extracelular em condições de dano celular/tecidual (PASTORELLI et al., 2010, 2011). Essa citocina também pode promover a ativação de células endoteliais inatas tipo 2 (ILC2), que produzem altos níveis de IL-13 e IL-5 (VANNELLA et al., 2016). Especificamente, na fase crônica da infecção, a linhagem HS também induziu um aumento progressivo dos níveis de TNF- $\alpha$  no intestino delgado, o que demonstrou a ocorrência de inflamação persistente neste tecido. Os esplenócitos estimulados com LPS de camundongos infectados com *S. mansoni* que foram depletados de células CD4<sup>+</sup> apresentaram alta produção de TNF- $\alpha$ , o que pode estar associado a uma possível septicemia causada pela translocação bacteriana devido ao comprometimento da barreira intestinal (FALLON et al., 2000). Um importante controle de infecções bacterianas é realizado por neutrófilos (ALVES-FILHO et al., 2010; KOVACH; STANDIFORD, 2012). No presente estudo, demonstramos uma redução nos níveis de MPO no intestino delgado de animais cronicamente infectados com a cepa HS de *S. mansoni*, o que

poderia contribuir para o controle ineficaz de uma possível disseminação bacteriana; no entanto, mais estudos são necessários para melhor explorar esta hipótese.

Estudos anteriores (LENZI et al. 1998; CHEEVER et al., 2000; HAMS et al., 2013; SCHWARTZ; FALLON, 2018) demonstraram que a formação de granulomas tem um papel duplo na esquistossomose: a resposta celular ajuda a limitar o dano tecidual causado por substâncias líticas secretadas pelos ovos retidos do parasito; porém, se não bem modulada, a resposta granulomatosa também é responsável pela fibrose hepática descontrolada que leva a casos graves de hepatoesplenomegalia na esquistossomose. Portanto, a gravidade da esquistossomose depende do equilíbrio entre a formação e a modulação do granuloma. O processo de formação de granulomas está intrinsecamente relacionado ao perfil de resposta imune induzida pelo hospedeiro vertebrado contra a infecção por *S. mansoni* (HAMS et al., 2013; COSTAIN et al., 2018), e essa resposta foi significativamente modificada em camundongos infectados experimentalmente com a linhagem HS de *S. mansoni*, o que gerou um impacto na morbidade associada à esquistossomose. A análise histopatológica confirmou que os camundongos infectados com a linhagem HS apresentaram granulomas maiores e mais desorganizados, o que causou maior destruição dos tecidos hepáticos e intestinais. Essas lesões mais graves induzidas pela infecção experimental com a linhagem HS de *S. mansoni* foram confirmadas pelo aumento da atividade de ALT e AST no plasma, maior frequência de sangue oculto nas fezes e maior mortalidade em comparação com camundongos infectados com a linhagem LE. ALT e AST são enzimas que participam do ciclo celular do ácido cítrico e estão presentes principalmente no ambiente intracelular dos hepatócitos (GIANNINI et al., 2005). Portanto, níveis elevados dessas enzimas em circulação, principalmente ALT, são indicativos de dano hepático intenso, tanto em humanos (SILVA et al., 2018; DESSIE et al., 2020) quanto em modelos experimentais de infecção por *S. mansoni* (REZENDE et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2022). Além disso, a presença de sangue oculto nas fezes é um biomarcador de alto dano intestinal e é amplamente utilizado para avaliar a gravidade da esquistossomose em humanos (BETSON et al., 2012; BUSTINDUY et al., 2013). Com base no perfil imunopatológico induzido pela infecção experimental pela linhagem HS de *S. mansoni*, é razoável propor que a combinação de uma resposta imune tipo 2 e modulatória reduzida no fígado e um aumento progressivo da inflamação intestinal tipo 1 pode ter levado a maior mortalidade em camundongos infectados com a linhagem HS quando comparado com a infecção humana pela linhagem LE.

É importante mencionar também que todos os modelos experimentais possuem suas limitações, e os resultados encontrados em nosso estudo podem não representar toda a

complexidade da infecção humana (CHEEVER et al., 2002); entretanto, um experimento prévio demonstrou que a linhagem HS de *S. mansoni* apresentava antígenos com diferentes níveis de reatividade à soros de humanos infectados quando comparado com proteínas de uma linhagem humana do parasito (CARNEIRO et al., 1991), o que poderia explicar a imunopatologia induzida por essa linhagem do parasito no camundongo BALB/c. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Os dados apresentados neste capítulo demonstraram que camundongos BALB/c experimentalmente infectados por *S. mansoni* isolado do roedor *H. sciureus* naturalmente infectado (linhagem HS), apresentaram menor carga parasitária quando comparado com a infecção pela linhagem LE humana. Apesar disso, a infecção experimental com a linhagem HS induziu uma potente resposta inflamatória e baixa modulação no tecido hepático e intestinal, o que pode ter induzido um maior controle da carga parasitária, além de um maior dano tecidual e mortalidade nos camundongos avaliados nessas condições de infecção experimental. Os dados deste trabalho encorajam que futuras pesquisas sejam realizadas com o objetivo de identificar antígenos específicos da linhagem HS responsáveis pela indução da resposta imune e patologia diferenciadas. Além disso, nossos dados despertam um alerta para que a morbidade da esquistossomose em populações humanas vivendo em áreas endêmicas para *S. mansoni* e com a presença desse reservatório silvestre seja avaliada.

**CAPÍTULO IV: ASPECTOS BIOLÓGICOS, PARASITOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA INFECÇÃO PELO ISOLADO HS DE *Schistosoma mansoni* EM *Biomphalaria glabrata* COMPARADO COM UMA LINHAGEM HUMANA REFERÊNCIA (LE)**

---

## 1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante que causa grave morbidade em populações humanas infectadas (GRYSEELS et al., 2006; WEERAKOON et al., 2015; WHO, 2015). O agente etiológico dessa parasitose são trematódeos digenéticos do gênero *Schistosoma* que utilizam caramujos de água doce (*Biomphalaria*, *Oncomelania* e *Bulinus*) para gerar e propagar as larvas, denominadas de cercárias, infectantes aos hospedeiros vertebrados (KATZ; ALMEIDA, 2003; LOVERDE et al., 2019). Apesar dos extensos esforços promovidos pela Organização Mundial de Saúde para tentar eliminar a esquistossomose, a infecção ainda permanece ativa em diversas áreas endêmicas da África, Ásia e do Brasil (SARVEL et al., 2011; UTZINGER et al., 2011; BERGQUIST et al., 2017). Portanto, são necessárias a adoção de novas estratégias de controle, principalmente relacionadas aos caramujos transmissores do parasito (SECOR, 2014).

Para que os estágios intramolusco de *S. mansoni* tenham sucesso em prosseguir com seu ciclo de vida, o parasito precisa interagir com o sistema interno de defesa do caramujo *Biomphalaria*, o que pode determinar o fracasso ou o sucesso da infecção (LOCKYE et al., 2004; PILA et al., 2017; HAMBROOK; HANINGTON, 2021). Após penetração dos miracídios nos tecidos moles do caramujo, essas larvas perdem suas placas ciliadas e transformam-se em esporocistos primários, que induzem uma série de sinais (dano tecidual/liberação de antígenos) que ativam a resposta imune de *Biomphalaria* spp. (NEGRÃO-CORRÊA et al., 2012; CASTILLO et al., 2020). O reconhecimento das larvas de *S. mansoni* por *B. glabrata* é realizado por diferentes famílias de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), principalmente receptores do tipo “toll” (Toll-Like Receptors - TLR) (PILA et al., 2016b, HUMPHRIES; DENECKERE, 2018), além de uma família de proteínas semelhantes às imunoglobulinas dos mamíferos, conhecidas como FREPs (proteínas relacionadas ao fibrinogênio) (ZHANG; LOKER, 2004; PILA et al., 2017). Após o reconhecimento do parasito, os hemócitos circulantes na hemolinfa de *Biomphalaria*, que podem ser classificados em granulócitos e hialinócitos, migram para os tecidos, ligam-se ao tegumento dos esporocistos e formam uma cápsula celular de múltiplas camadas (LOKER et al., 1982; NEGRÃO-CORREA et al., 2012). Os hemócitos presentes nessas camadas secretam compostos tóxicos, principalmente espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (NOS) que contribuem para a destruição do parasito (HAHN; BENDER; BAYNE, 2001a, b; BENDER et al., 2005). Entretanto, o parasito também pode inibir e/ou neutralizar essas moléculas para promover sua

sobrevivência, a partir da produção de mieloperoxidase (SCHLENK et al., 1991; WEIS et al., 1996; TORREILLES et al., 1997) e arginase (DINGUIRARD et al., 2018).

Auxiliando a resposta celular, outros fatores humorais presentes na fração solúvel da hemolinfa de *B. glabrata* também são essenciais para o recrutamento de células, e reconhecimento e destruição dos estágios intramolusco de *S. mansoni*. Estudos demonstram que os granulócitos ativados secretam a citocina BgMIF que favorece a migração de mais hemócitos aos tecidos (BAEZA GARCIA et al., 2010). Outras citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17 homólogas a proteínas humanas (GRANATH; CONNORS; TARLETON, 1994; OUWE-MISSI-OUKEM-BOYER et al., 1994; ZHANG et al., 2015; ADEMA et al., 2017) também já foram detectadas em *B. glabrata*; entretanto, o verdadeiro papel dessas citocinas no sistema interno de defesa desse molusco contra *S. mansoni* ainda permanece desconhecido. As moléculas solúveis capazes de lesarem diretamente os esporocistos sem a necessidade de encapsulamento celular, pertencem à família de toxinas formadoras de poros  $\beta$  ( $\beta$ -PFT) semelhante à de bactérias, e são denominadas de Biomphalisina e Glabralisina (GALINIER et al., 2013; LASSALLE et al., 2020). Por outro lado, as glicosidases extracelulares secretadas por hemócitos, como N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG), facilitam o reconhecimento de esporocistos de *S. mansoni*, pois atuam em todos os principais resíduos de açúcar terminais presentes na superfície do tegumento de esporocistos de *S. mansoni* (ZELCK; BECKER, 1990; ZELCK, 1999).

Devido a capacidade de *S. mansoni* de também infectar uma variedade de mamíferos silvestres, principalmente roedores (THÉRON et al., 1992; REY, 1993; HANELT et al., 2010; MIRANDA et al., 2017; CATALANO et al., 2018), diferentes genótipos e linhagens do parasito foram selecionados a partir das sucessivas infecções nesses animais (BARRAL et al., 1996; COLLEY; LOKER, 2018; CATALANO et al., 2020), o que poderia favorecer o surgimento de novas variedades antigênicas e padrões de compatibilidade entre *S. mansoni* e *Biomphalaria*. Estudos prévios com *B. glabrata* coletados em focos com a presença de infecção natural de *Rattus rattus* em Guadeloupe, no Caribe, mostraram que os alguns caramujos infectados apresentavam um padrão crepuscular de eliminação de cercárias, o que foi considerado como uma possível adaptação do parasito aos hábitos crepusculares/noturnos dos roedores (THÉRON, 1984). Adicionalmente, no Brasil, isolados de *S. mansoni* obtidos de roedores *Holochilus sciureus* mostraram serem mais patogênicos para *B. glabrata* de populações simpátricas (BASTOS et al., 1984). No entanto, os mecanismos biológicos e imunológicos associados aos diferentes padrões de propagação e virulência dessas linhagens silvestres de *S. mansoni* em *B. glabrata* ainda são pouco conhecidos.

Assim, o objetivo deste capítulo é caracterizar a infecção gerada por *S. mansoni* isolado do roedor silvestre *H. sciureus* (linhagem HS) em caramujos *B. glabrata* da linhagem BH, de modo comparativo com a linhagem referência do parasito isolada de humano (linhagem LE), descrevendo aspectos biológicos e imunológicos envolvidos nessa interação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Linhagens de *S. mansoni* e infecção dos caramujos

Para as infecções experimentais em caramujos do gênero *Biomphalaria* também foram utilizadas a linhagem HS de *S. mansoni* isolada de roedores *H. sciureus* naturalmente infectados (ver detalhes do isolamento no **Capítulo I** desta tese) e a linhagem LE de *S. mansoni*, que foi originalmente isolada de um paciente infectado do estado de Minas Gerais (VALADARES et al., 1981). Ambas as linhagens estão sendo mantidas rotineiramente pelo Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia (ICB/UFMG) (ver **Capítulo II, subitem 2.1**).

Como modelo experimental, foram utilizados caramujos da espécie *B. glabrata* (5–6mm) da linhagem BH, descendentes de espécimes coletados anteriormente na Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, Brasil. Os caramujos são rotineiramente mantidos em nosso moluscário, de acordo com os procedimentos previamente descritos (ver **Capítulo I, subitem 2.3**).

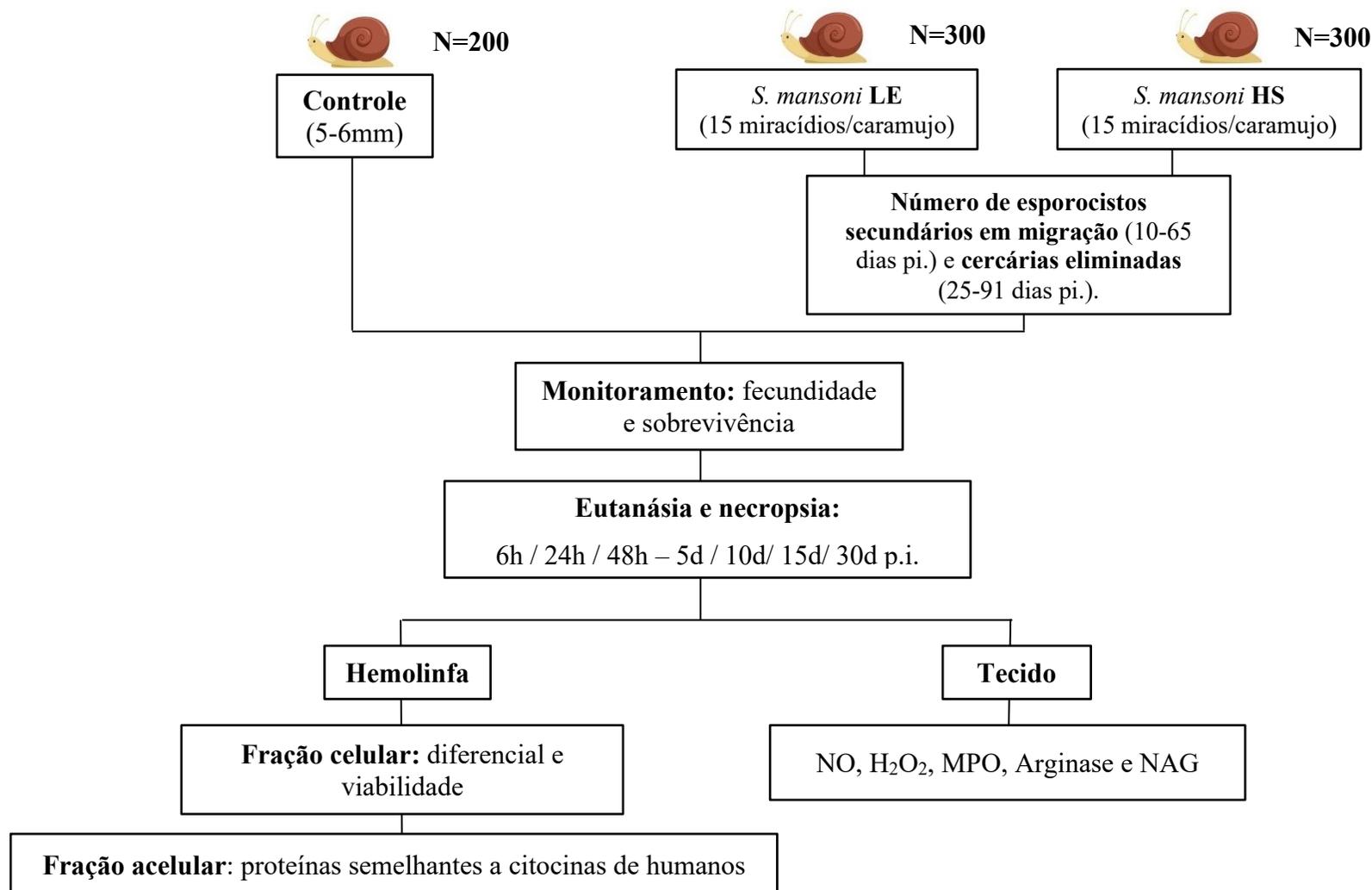
Os miracídios utilizados para infecção foram obtidos de ovos retidos nos fígados de camundongos BALB/c com 50 dias de infecção por *S. mansoni* da linhagem LE ou HS. O processamento do fígado para obtenção dos miracídios (STANDEN, 1952) e posterior concentração dessas larvas para contabilização (CHAIA, 1956) foi realizado conforme metodologia previamente detalhada (ver **Capítulo I, subitem 2.2**). Um total de 15 miracídios viáveis foi contado e deixado em contato com cada caramujo, que ficaram mantidos em placas de cultura de cultura de 6 poços (Sarstedt) contendo água desclorada, por 12 horas sob luz direta (STANDEN, 1952).

### 2.2 Delineamento experimental

Conforme detalhado na **figura 39**, os caramujos foram inicialmente divididos em três grupos experimentais para as avaliações biológicas e parasitológicas: grupo controle, composto com caramujos sem infecção (n=80), grupo LE, com caramujos infectados com a linhagem LE (n=80), e o grupo HS, com caramujos infectados com a linhagem HS (n=80), que foram acompanhados por até 91 dias para o monitoramento da mortalidade, fecundidade e

quantificação do número de cercárias eliminadas (grupo infectado) a cada semana. Para a avaliação específica da quantificação de esporocistos secundários em migração, novas infecções foram realizadas, uma vez que é necessária a necropsia dos caramujos em diferentes tempos da infecção. Nessa nova avaliação, dois grupos foram estabelecidos: caramujos infectados com a linhagem LE (n=100) ou HS (n=100), a qual cinco animais por grupo foram avaliados individualmente aos 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 e 65 dpi. para verificar a presença e a quantidade de esporocistos secundários em migração na região cefalopodal.

Em paralelo, novas infecções também foram realizadas para a avaliação das alterações imunológicas e bioquímicas em *B. glabrata* durante o desenvolvimento de *S. mansoni*, uma vez que também há necessidade de eutanásia e necropsia dos caramujos em momentos específicos. Assim, outros três grupos foram estabelecidos: controle sem infecção (n=120), caramujos infectados com a linhagem LE (n=120) ou com a linhagem HS (n=120) (**figura 39**). Esses grupos foram avaliados nos tempos de 6, 24, 48 horas e 5, 10, 15 e 30 dias pi. para a coleta de hemolinfa, que foi reunida em *pool* de 4 caramujos em triplicata por grupo experimental, e dividida em fração acelular, com a finalidade de dosar citocinas semelhante às de humanos (CSH), e fração celular, destinada a quantificação e viabilidade de hemócitos e sua diferenciação em granulócitos e hialinócitos (**figura 39**). Os tecidos desses caramujos também foram coletados em *pool* e destinados aos ensaios enzimáticos com a finalidade de quantificar NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MPO e NAG (**figura 39**). Todos os experimentos foram realizados em duplicata com resultados semelhantes.



**Figura 39. Delineamento experimental do capítulo IV.** Descrição do esquema de avaliação de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados com 15 miracídeos de *Schistosoma mansoni* das linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*) e os controles (sem infecção).

## 2.3 Aspectos biológicos

### 2.3.1 Sobrevivência e fecundidade

Para a realização da curva de mortalidade, os grupos de caramujos infectados com cada linhagem de *S. mansoni* e os controles sem infecção que não foram destinados às técnicas imunopatológicas e/ou avaliação de esporocistos secundários, foram observados semanalmente durante 91 dias e os animais que se encontravam mortos foram contabilizados. Nos aquários de cada grupo experimental e controle foram colocados três pedaços de isopor (8 cm<sup>2</sup>) como substrato para a oviposição. Somente as massas de desovas e os embriões depositados nesses pedaços foram contabilizadas em microscópio estereomicroscópico (Zeiss Stemi Dv4) e os valores normalizados pelo número de caramujos vivos/semana (RODRIGUES et al., 2020). Os pedaços de isopor foram substituídos a cada contagem.

## 2.4 Aspectos parasitológicos

### 2.4.1 Recuperação e quantificação de esporocistos secundários

A recuperação e quantificação do número de esporocistos secundários em migração na região cefalopodal de *B. glabrata* infectados foi realizada conforme Pereira et al. (1984), com modificações. Resumidamente, a região cefalopodal (em torno de 0,5cm) de cinco caramujos/grupo, após 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60 e 65 dias de infecção, foi individualmente seccionada e lavada com uma solução balanceada de Chernin (CBSS: 47,7 mM de NaCl, 2,0 mM de KCl, 0,49 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anidro, 1,8 mM de MgSO<sub>4</sub>. 7 H<sub>2</sub>O, 3,6 mM de aCl<sub>2</sub>. 2 H<sub>2</sub>O, 0,59 mM de NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 mM de glicose e 3 mM de trealose, pH 7,4), que possui osmolaridade própria para caramujos (CHERNIN., 1963). Em seguida os pedaços de tecido de cada caramujo foram finamente picotados com auxílio de uma tesoura cirúrgica, em uma placa de Petri de vidro (120x20mm) contendo 150uL de CBSS. Esses pedaços de tecido foram transferidos para novas placas de Petri de plástico (120x20mm) contendo 2mL de CBSS. Em seguida, essas placas foram incubadas em banho-maria sob uma plataforma de plástico, a uma temperatura de 35°C durante 2h. Após esse período, cada amostra foi filtrada em uma peneira com malha de 90 µm (IBRAS, Brasil) acoplada a um tubo falcon de 50mL para o armazenamento da solução limpa contendo os esporocistos. Para a contagem, todo o volume dessa solução foi transferido para uma nova placa de Petri de vidro com seis campos na horizontal previamente marcados, e os esporocistos foram quantificados com o auxílio de um microscópio invertido (Olympus CK40) e o número dessas larvas foi comparativamente avaliado entre as linhas LE e HS de *S. mansoni*. A taxa (%) de

caramujos com a presença de esporocistos em migração na região cefalopodal também foi utilizada para a comparação entre as linhagens do parasito avaliadas.

#### 2.4.2 Quantificação de cercárias

A quantidade de caramujos infectados e o número de cercárias eliminadas foram avaliados após exposição dos caramujos ao fotoestímulo artificial (BRASIL, 2008), entre os dias 25 e 91 após a infecção, conforme procedimento descrito anteriormente (**Capítulo I, subtópico 2.9**). Os caramujos que eliminaram cercárias foram separados em novos aquários, de acordo com a linhagem do parasito, e contabilizados para a avaliação da taxa de infecção (%).

### 2.5 Aspectos imunológicos

#### 2.5.1 Quantificação e diferenciação de hemócitos

Caramujos do grupo controle e os infectados com a linhagem LE ou HS após 6, 24 e 48 horas e 5, 10, 15 e 30 dias de infecção (n=12/grupo), foram sacrificados para a obtenção de hemolinfa que foi coletada e reunida em três *pools* (n=4 caramujos/grupo), para a obtenção de um volume suficiente de cada amostra para as análises propostas.

A coleta da hemolinfa foi realizada de acordo com o protocolo de Zelck et al. (1995). Resumidamente, os caramujos mantidos sob o gelo artificial (Gelotech, Curitiba, Brasil) tiveram suas conchas limpas com etanol 70% e secas com papel absorvente. Posteriormente, uma seringa plástica de 1 mL (Plastipak) com agulha de 21 G foi utilizada para perfurar a concha na região cardíaca até o extravasamento da hemolinfa, que foi coletada e transferida para superfície de um filme plástico (American National Can) colocado sob o gelo. Logo em seguida, a hemolinfa foi transferida para microtubos de 1,5 mL previamente siliconados e mantidos à 4 °C durante 5 minutos para a decantação de pedaços de concha. Após esse período, 150µL da hemolinfa total foi transferido para novos tubos siliconados que foram centrifugados a 80g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante (denominado de fração solúvel), foi armazenado à -20 °C para posteriores análises. Ao sedimento contendo os hemócitos (fração celular), foi adicionado 150 µL de CBSS. Amostras de hemócitos presentes nesta solução foram avaliados quanto à viabilidade após adição de solução CBSS contendo 0,4% de Azul de Tripán (Gibco) (diluição 1:10) (MARTINS-SOUZA et al., 2003), sendo as células coradas de azul consideradas mortas. Para a diferenciação celular em granulócito e hialinócito, amostras de hemócitos foram adicionadas à solução CBSS contendo 0,04% de vermelho neutro (Sigma) (diluição 1:10) (BEZERRA et al., 1997). A diferenciação celular foi realizada levando-se em consideração a capacidade de granulócitos de fagocitar o corante

particulado, apresentando-se com coloração avermelhada. Tanto para contagem diferencial quanto para determinar a viabilidade das células, foi utilizada a câmara de Neubauer (Boeco, Germany).

### **2.5.2 Avaliação dos níveis de proteínas semelhante a citocinas de humanos na fração acelular da hemolinfa**

Foi utilizada a técnica de ELISA sanduíche, a partir de kits comercialmente disponíveis (DuoSet, R&D Systems) para a dosagem dos níveis de MIF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-17 de humanos, conforme detalhado por Miranda et al. (2021). A escolha da utilização de proteínas recombinantes de humanos em amostras de hemolinfa de *B. glabrata* foi baseada em artigos previamente publicados (GRANATH; CONNORS; TARLETON, 1994; BAEZA GARCIA et al., 2010; ADEMA et al., 2017) que indicaram certa homologia de proteínas de *B. glabrata* com essas citocinas humanas. O ensaio foi realizado seguindo as instruções do fabricante e conforme anteriormente descrito para camundongos (**Capítulo III, subitem 2.5.1**), utilizando uma diluição de 1:2. Entretanto, a sensibilidade de cada curva foi de 7,8 a 1000 pg/mL para MIF, TNF- $\alpha$  e IL17; e 3,9 a 500 pg/mL para IL-1 $\beta$ . A absorbância das amostras e da curva padrão foi medida em leitor de microplacas (VersaMax) a 450 nm, e os níveis das citocinas (pg/mL) nas amostras foi determinada por interpolação no gráfico resultante da curva padrão utilizando o programa SoftMax Pro 5.2.

### **2.5.3 Avaliação dos níveis de N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminidase (NAG)**

Após a retirada de hemolinfa, fragmentos da região cefalopodal também foram coletados em triplicata e reunidas em *pool* (n=4/grupo) e armazenados a -20°C para as análises da resposta imune tecidual. Originalmente a quantificação da molécula N-acetil- $\beta$ -D-glicosaminidase (NAG) é utilizada para estimar indiretamente a quantidade de macrófagos infiltrados nos diferentes tecidos de mamíferos (BOURBOUZE et al., 1991). Entretanto, estudos prévios (ZELCK; BECKER, 1990; ZELCK, 1999) demonstraram que NAG está envolvida no processo de interação *S. mansoni*-molusco, e pode, de maneira análoga, representar infiltrado de hemócitos teciduais. O ensaio foi conduzido de acordo com Barcelos et al. (2005) e previamente detalhado no **Capítulo III** desta tese (**subitem 2.5.4**), sendo utilizado 50mg de tecido e a diluição das amostras de 1:2.

### **2.5.4 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio possuem um papel importante na imunidade inata de *B. glabrata*, destruindo os esporocistos e ditando mecanismos de compatibilidade com *S. mansoni* (HAHN; BENDER; BAYNE, 2001a, b; BENDER et al., 2005). Dessa forma, o

homogenato tecidual processado para a dosagem de NAG também foi utilizado para a quantificação indireta de NO, por meio da reação de Griess (TSIKAS, 2007), conforme previamente detalhada no **Capítulo III (subitem 2.5.6)**.

Para a quantificação de peróxido de hidrogênio nessas mesmas amostras, foi utilizado o Kit Amplex<sup>®</sup> Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay (Molecular Probes, Eugene, Oregon, EUA). As soluções estoques foram previamente preparadas e o ensaio realizado conforme as instruções do fabricante. Resumidamente, 50uL de cada amostra foram plaqueados em placas de 96 poços (Sarstedt). Paralelamente, uma solução de 20uM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, preparada em tampão de diluição (Buffer 1, pH 7,4) fornecido pelo kit, foi utilizada para a confecção da curva padrão a partir de diluição seriada (0,31–20uM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em um volume final de 50uL. Em seguida, foi adicionado à curva e às amostras um volume de 50uL da solução de trabalho contendo 10 mM do reagente Amplex<sup>®</sup> Red (0-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), 10 U/mL de HRP (Horseradish peroxidase) e tampão de diluição. Aos poços definidos como branco, foram adicionados 100uL da solução de trabalho. A reação nas placas ocorreu durante 30 min em temperatura ambiente e protegida da luz. Após esse período, a leitura da absorbância foi realizada em leitor de microplacas (VersaMax) no comprimento de onda de 560 nm. As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (uM) nas amostras foram obtidas pela interpolação das absorbâncias em gráfico obtido a partir da curva padrão no software SoftMax Pro 5.2 (Molecular Devices).

### **2.5.5 Avaliação da atividade de arginase e mieloperoxidase (MPO)**

Estudos prévios demonstraram que os esporocistos de *S. mansoni* são capazes de induzirem a produção de arginase pelos hemócitos, que inibe a produção NO (via competição do mesmo substrato), metabólito que é tóxico para larvas do parasito, sendo, portanto, um importante mecanismo de evasão do parasito (DINGUIRARD et al., 2018). Assim, o homogenato processado para o ensaio de NAG, também foi utilizado para a dosagem de indireta da atividade de arginase, pela quantificação de uréia (CORRALIZA et al., 1994), conforme detalhado no **Capítulo III (subitem 2.5.5)**.

Baseado em evidências que demonstram que *S. mansoni* é capaz de induzir a produção de mieloperoxidase como mecanismo de evasão contra H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzida pelo caramujo (SCHLENK et al., 1991; WEIS et al., 1996; TORREILLES et al., 1997), a atividade de MPO foi também quantificada no homogenato tecidual processado para NAG, conforme o ensaio proposto por Bayle (1988) e anteriormente detalhado no **Capítulo III (subitem 2.5.3)**.

## 2.6 Análise estatística

Todos os dados contínuos foram inicialmente analisados quanto à sua normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov e foram expressos como média e erro padrão (EP). Foi utilizado o teste ANOVA (Two-way) seguido pelo teste de Bonferroni para a comparação das médias dos dados paramétricos entre mais de dois grupos e o teste T de Student quando comparado apenas dois grupos. Os dados referentes à curva de sobrevivência foram analisados pelo teste de Log-Rank. As frequências foram expressas em porcentagem e comparadas pelo teste de Fisher. Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ . Para a realização desses testes e construção dos gráficos, utilizaram-se os softwares GraphPad Prism versão 8 (Prism Software, Irvine, California, USA) e STATA versão 11.1 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

## 3. RESULTADOS

### 3.1 Susceptibilidade e carga parasitária

Conforme demonstrado na **tabela XII**, esporocistos secundários em migração na região cefalopodal dos caramujos começaram a ser recuperados a partir de 15 dias pi. para ambas as linhagens do parasito avaliadas. Entre os dias 20–30 pi., os caramujos infectados pela linhagem HS de *S. mansoni* apresentaram menor presença e quantidade de esporocistos quando comparado com a linhagem LE, embora sem diferença estatística. Entretanto, a partir do 30º dia de infecção, a presença e a quantidade de esporocistos secundários na região cefalopodal foi maior em caramujos infectados com a linhagem HS, especialmente no 40º dia de infecção ( $p < 0,04$ ) (**tabela XII**). Houve um pico da recuperação dessas larvas em caramujos infectados com a linhagem LE aos 30 dpi., enquanto que para a linhagem HS, a maior recuperação de esporocistos secundários ocorreu entre o 30º–40º da infecção. Além disso, foi possível observar a presença de esporocistos secundários até os 50 dpi. para a linhagem LE, enquanto que em caramujos infectados com a linhagem HS essas larvas foram recuperadas até o 60ª da infecção (**tabela XII**). É interessante destacar que somente caramujos infectados com a linhagem HS apresentaram 100% (10/10) da presença de esporocistos secundários em migração, que ocorreu aos 35 dpi., enquanto a maior taxa da presença dessas larvas encontrada para a linhagem LE foi de 80% (8/10) entre o 25º-30º dia da infecção (**tabela XII**).

A eliminação de cercárias por *B. glabrata* teve início aos 28 dias de infecção para ambas as linhagens; entretanto, houve uma taxa significativamente maior de eliminação de cercárias por caramujos infectados com a linhagem HS de *S. mansoni*, principalmente entre 42-56 ( $p < 0,04$ ) e

aos 77 dias pós-infecção ( $p=0,01$ ). Também foi verificado que a taxa total de infecção foi significativamente maior em *B. glabrata* BH infectados pela linhagem HS (39/80; 48,7%), quando comparado com a linhagem LE (11/80; 13,7%) ( $p<0,001$ ) (**tabela XII**). Em relação a quantidade de cercárias, não houve diferenças no número dessas larvas sendo eliminadas por ambas as linhagens de *S. mansoni* avaliadas, por ponto de análise, até os 70 dias pós-infecção. A produção total de cercárias (soma da produção dessas larvas em todos os pontos) de cada linhagem também foi semelhante (**tabela XII**).

Durante os 91 dias de avaliação, houve um pico de eliminação de cercárias para a linhagem LE aos 56 dpi.; entretanto, após 70 dias de infecção, o número de cercárias eliminadas por *B. glabrata* infectado por essa linhagem decaiu progressivamente. Por outro lado, aos 77 dpi. ocorreu o pico de eliminação de cercárias por caramujos infectados pela linhagem HS, além de um maior número de cercárias eliminadas, quando comparado com a linhagem LE ( $p<0,03$ ). Além disso, a eliminação de cercárias ocorreu somente até os 70 dpi. em caramujos infectados com a linhagem HS de *S. mansoni*, enquanto que para a linhagem HS houve cercárias sendo eliminadas até os 84 dpi. (**tabela XII**).

**Tabela XII.** Taxa de infecção e quantidade de esporocistos secundários em migração na região cefalopodal e cercárias eliminadas em *Biomphalaria glabrata* infectado com a linhagem LE (referência humana) ou HS (*Holochilus sciureus*).

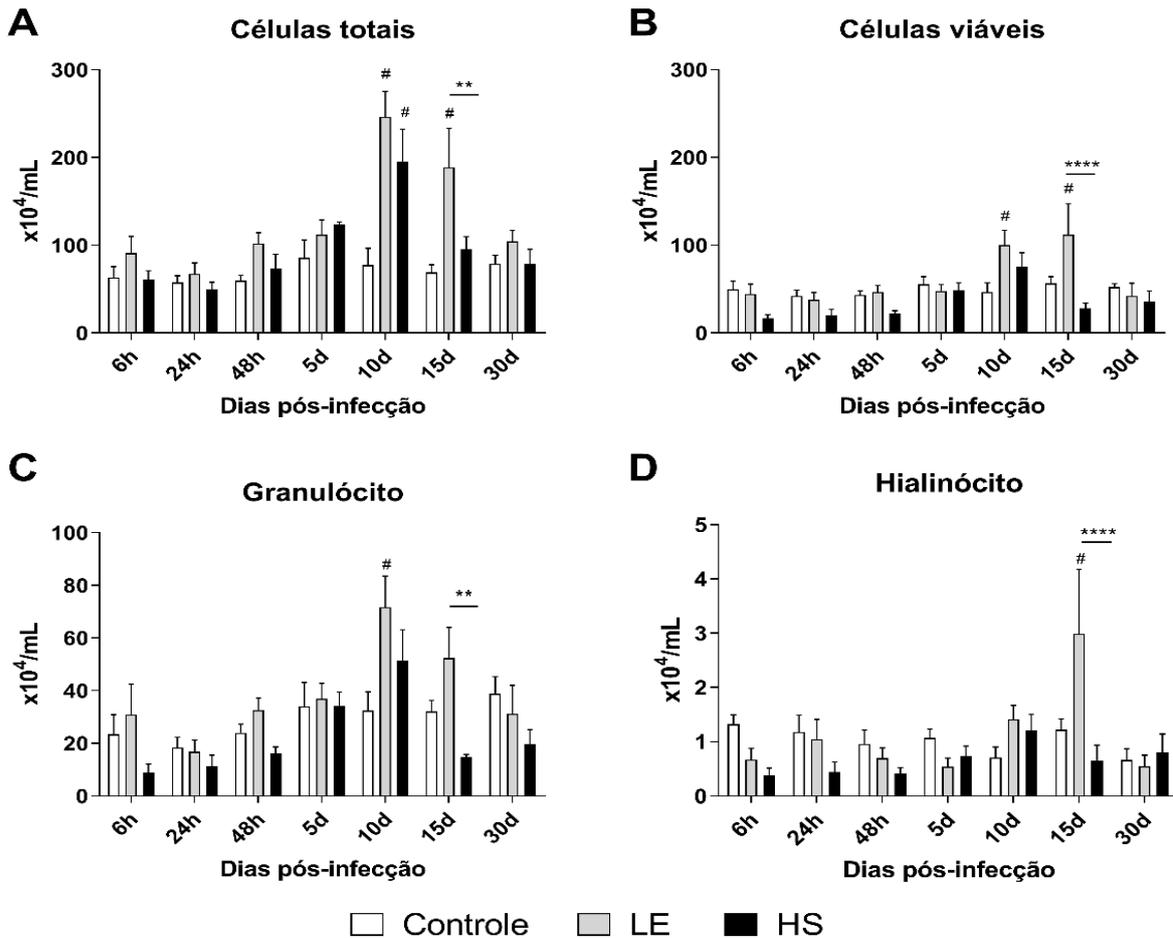
Dias p.i.	Esporocisto - LE		Esporocisto - HS		p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
	N (%)	Média ±EP	N (%)	Média ±EP		
10	0/10 (0)	0	0/10 (0)	0	-	-
15	2/10 (20)	0,10 ±0,10	2/10 (20)	0,10 ±0,10	>0,99	>0,99
20	6/10 (60)	9,30 ±5,41	5/10 (50)	2,4 ±1,20	0,82	0,22
25	8/10 (80)	35,40 ±17,11	7/10 (70)	12,40 ±5,33	0,85	0,21
30	8/10 (80)	56,80 ±23,00	9/10 (90)	45,30 ±19,18	0,86	0,70
35	5/10 (50)	25,60 ±14,40	10/10 (100)	47,40 ±8,76	0,35	0,21
40	4/10 (40)	7,50 ±4,05	8/10 (80)	43,90 ±16,31	0,39	0,04*
50	3/10 (30)	1,20 ±0,90	4/10 (40)	17,60 ±13,84	0,76	0,25
60	0/10 (0)	0	2/10 (20)	3,10 ±3,00	0,28	0,31
65	0/10 (0)	0	0/10 (0)	0	-	-
Dias p.i.	Cercárias - LE		Cercárias - HS		p <sup>a</sup>	p <sup>b</sup>
	N (%)	Média ±EP	N (%)	Média ±EP		
25	0/69	0	0/74	0	-	-
28	4/67 (6)	44,0 ±18,65	4/73 (5,40)	19,5 ±4,5	0,90	0,42
35	7/65 (10,70)	362,6 ±153,4	15/69 (21,70)	196,0 ±47,72	0,15	0,47
42	8/62 (13)	590,3 ±217,1	24/65 (37)	1.067 ±190,7	0,01*	0,35
49	6/58 (10,30)	520,0 ±156,7	20/60 (33,30)	462,0 ±128,6	0,01*	0,45
56	3/44 (6,80)	1604 ±746,2	13/49 (26,50)	235,4 ±72,65	0,03*	0,07
63	4/43 (9,30)	762,0 ±571,5	9/38 (23,60)	183,3 ±64,34	0,15	0,43
70	3/41 (7,30)	384,0 ±262,1	6/33 (18,10)	217,0 ±65,51	0,23	>0,99
77	0/40 (0)	0	5/25 (20)	1.996 ±1.074	0,01*	0,03*
84	0/38 (0)	0	2/21 (9,50)	804,0 ±1.035	0,13	0,23
91	0/36 (0)	0	0/21 (0)	0	-	-
<b>Total</b>	<b>11/80 (13,7%)</b>	<b>426,7 ±157,5</b>	<b>39/80 (48,7%)</b>	<b>516,3 ±196,5</b>	<b>&lt;0,001*</b>	<b>0,75</b>

<sup>a</sup>=valor de p obtido pelo teste do qui-quadrado quando comparado os valores de frequência. <sup>b</sup>= valor de p obtido pelo teste de t de Student quando comparado as médias. \* estatisticamente significativo (p<0,05). Os dados representam uma combinação de dois experimentos independentes com resultados similares e são mostrados como média e erro padrão (EP).

### 3.2 Padrão de hemócitos circulantes

A quantidade de células e seus subtipos em circulação na hemolinfa de *B. glabrata* BH infectados ou não, permaneceu em níveis similares até o quinto dia e no último ponto de análise (30 dias) (**figura 40**). Entretanto, a infecção por ambas as linhagens de *S. mansoni* avaliadas induziu um aumento significativo na quantidade de hemócitos totais circulantes aos 10 dpi., quando comparado com o grupo não infectado (**figura 40. A**). Especificamente para caramujos infectados pela linhagem LE, houve também um aumento significativo no número de células viáveis (**figura 40. B**) e granulócitos (**figura 40. C**) aos 10dpi. em relação ao grupo controle. Aos 15 dpi., houve um aumento na quantidade de células totais (**figura 40. A**), viáveis (**figura 40. B**) e hialinócitos (**figura 40. D**) em *B. glabrata* infectados pela linhagem LE, quando comparado com

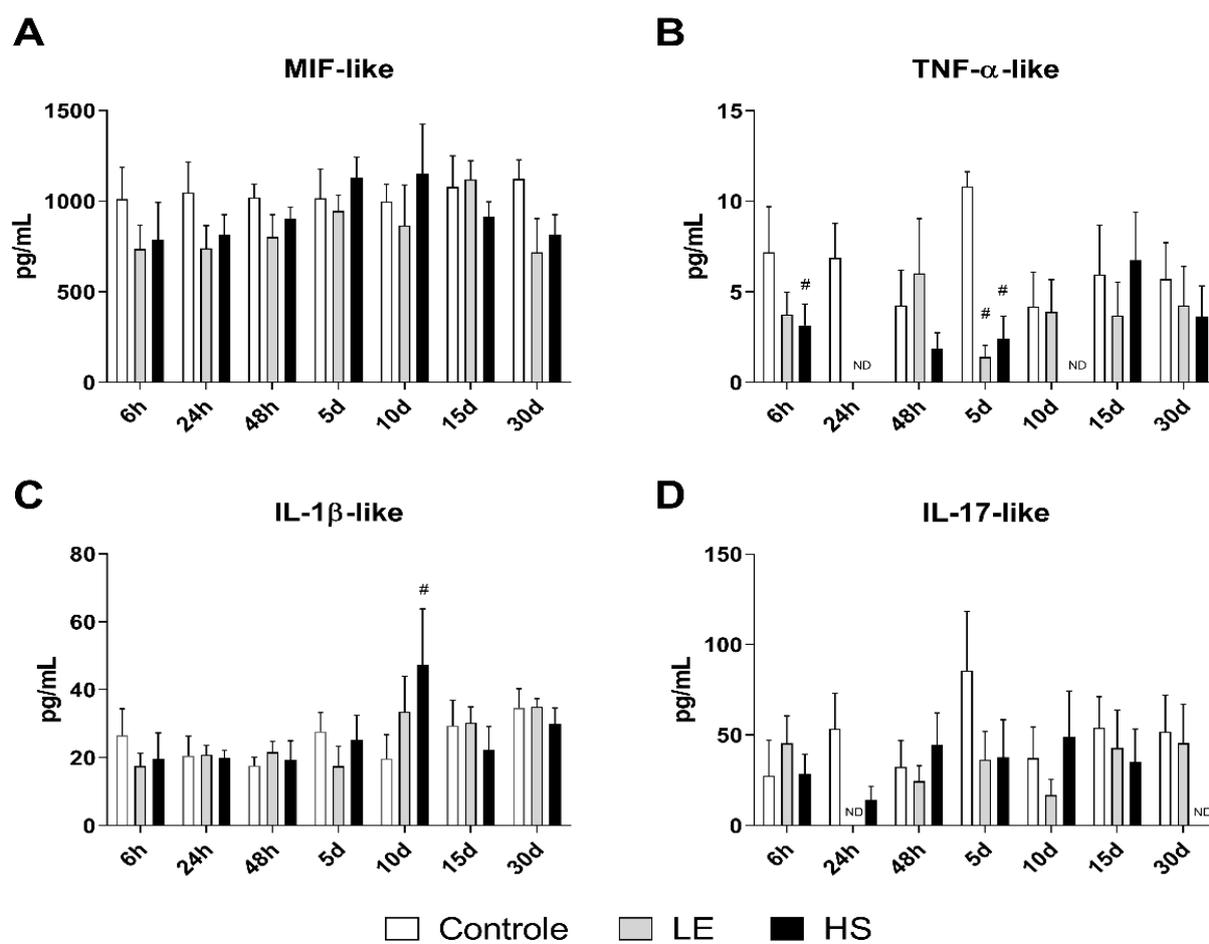
os caramujos não infectados. Nesse mesmo período de avaliação (15dpi), o número total de hemócitos (**figura 40. A**), células viáveis (**figura 40. B**), granulócitos (**figura 40. C**) e hialinócitos (**figura 40. D**) circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* infectados pela linhagem HS foi semelhante ao observado no grupo controle e, portanto, significativamente menor que o número detectado na hemolinfa dos caramujos infectados com a linhagem LE de *S. mansoni*.



**Figura 40. Hemócitos circulantes.** Número de células totais (A), viáveis (B), granulócitos (C) e hialinócitos (D) presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados por *Schistosoma mansoni* das linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*). Os caramujos foram infectados individualmente com 15 miracídeos das linhagens LE ou HS do parasito e avaliados entre 6–48hrs e 5–30dpi. Os dados representam uma combinação de dois experimentos independentes (24 caramujos por grupo e ponto de análise) com resultados similares e são mostrados como média e desvio padrão. Foi utilizado o teste ANOVA (Two-way) seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos. #Dados estatisticamente significativos em comparação com o grupo controle; \*Dados estatisticamente diferentes entre os grupos LE vs HS (#, ° ou \* p < 0,05; ##, °° ou \*\* p < 0,01; ###, °°° ou \*\*\* p < 0,001; ####, #, °°°° ou \*\*\*\* p < 0,0001).

### 3.3 Perfil de proteínas semelhantes a citocinas humanas na fração acelular da hemolinfa

De modo geral, os ensaios utilizando anticorpos de humanos permitiram a detecção de MIF, IL-1 $\beta$ - e IL-17 na hemolinfa de *B. glabrata* infectados ou não, mas a detecção de TNF- $\alpha$  foi baixa quando comparado com as demais citocinas avaliadas (**figura 41**). Dentre as citocinas avaliadas, somente MIF (**figura 41. A**) apresentou níveis semelhantes entre todos os grupos de caramujos avaliados e em todos os pontos de análise. Para IL-1 $\beta$  (**figura 41. C**), foi possível observar apenas um aumento aos 10 dpi na hemolinfa de *B. glabrata* infectado com a linhagem HS de *S. mansoni*, quando comparado com o grupo controle. Em relação a citocina IL-17 (**figura 41. D**), sua detecção foi ausente após 24hrs de infecção pela linhagem LE e aos 30 dpi pela linhagem HS de *S. mansoni*. Interessantemente, nas primeiras horas de infecção (6 e 24 h), houve uma redução significativa nos níveis de TNF- $\alpha$  na hemolinfa de caramujos infectados pela linhagem HS de *S. mansoni*, quando comparado com o grupo controle. Essa redução foi verificada em *B. glabrata* infectados pela linhagem LE somente após 24hrs de infecção. Após 5dpi., a hemolinfa de caramujos infectados com ambas as linhagens de *S. mansoni* avaliadas também apresentaram redução significativa nos níveis de TNF- $\alpha$  em relação ao grupo de caramujos não infectados. Aos 10 dpi., somente caramujos infectados pela linhagem HS de *S. mansoni* não apresentaram níveis detectáveis de TNF- $\alpha$  na hemolinfa (**figura 41. B**).

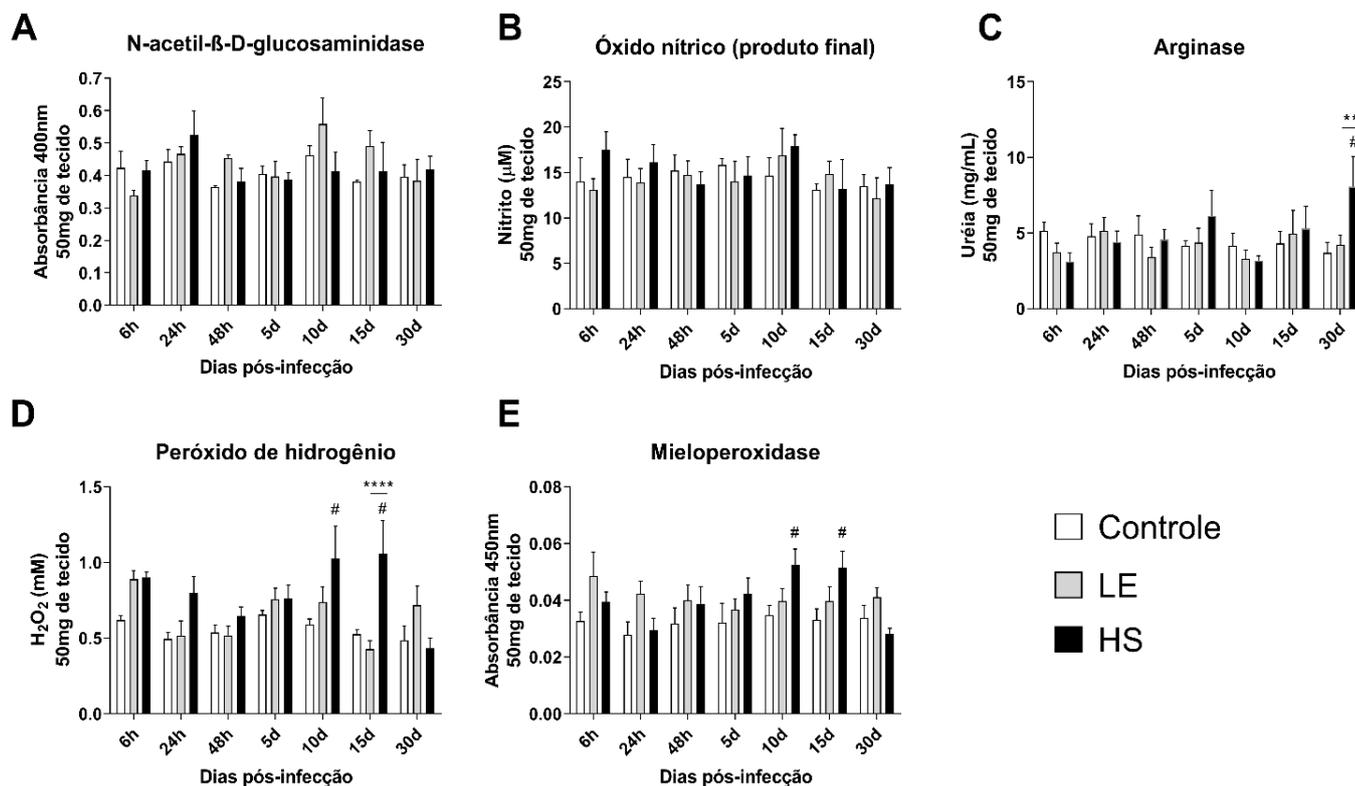


**Figura 41. Concentração de proteínas homólogas a citocinas pró-inflamatórias de humanos na hemolinfa.** Níveis de MIF (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-1 $\beta$  (C) e IL-17 (D) presentes na fração acelular da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados por *Schistosoma mansoni* das linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*). Os caramujos foram infectados individualmente com 15 miracídios das linhagens LE ou HS do parasito e avaliados entre 6–48hrs e 5–30dpi. Os dados representam uma combinação de dois experimentos independentes (24 caramujos por grupo e ponto de análise) com resultados similares e são mostrados como média e desvio padrão. Foi utilizado o teste ANOVA (Two-way) seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos. #Dados estatisticamente significativos em comparação com o grupo controle.

### 3.4 Perfil bioquímico tecidual

A partir de metodologias propostas para vertebrados, foi possível detectar a presença ou atividade de NAG, NO, arginase, MPO e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no homogenato tecidual da região cefalopodal de *B. glabrata* infectados ou não (figura 42). Dentre as moléculas avaliadas, NAG (figura 42. A) e NO (figura 42. B) apresentaram níveis semelhantes entre todos os grupos de caramujos avaliados e em todos os tempos de análise. Os níveis da atividade de arginase (figura 42. C) também foram semelhantes até os 15 dpi. entre os grupos de caramujos avaliados; entretanto, aos 30 dpi. houve um aumento de arginase no homogenato tecidual de *B. glabrata* infectado com a linhagem HS de *S. mansoni*, quando comparado com o grupo controle e aos caramujos infectados com a linhagem

LE (figura 42. C). Por outro lado, os níveis de  $H_2O_2$  (figura 42. D) e MPO (figura 42. E) estiveram elevados aos 10 e 15 dpi. no tecido de *B. glabrata* infectado pela linhagem HS, quando comparado com o grupo controle. Especificamente aos 15 dpi., a linhagem HS também induziu um maior aumento nos níveis de  $H_2O_2$  quando comparado com a infecção pela linhagem LE (figura 42. D e E).



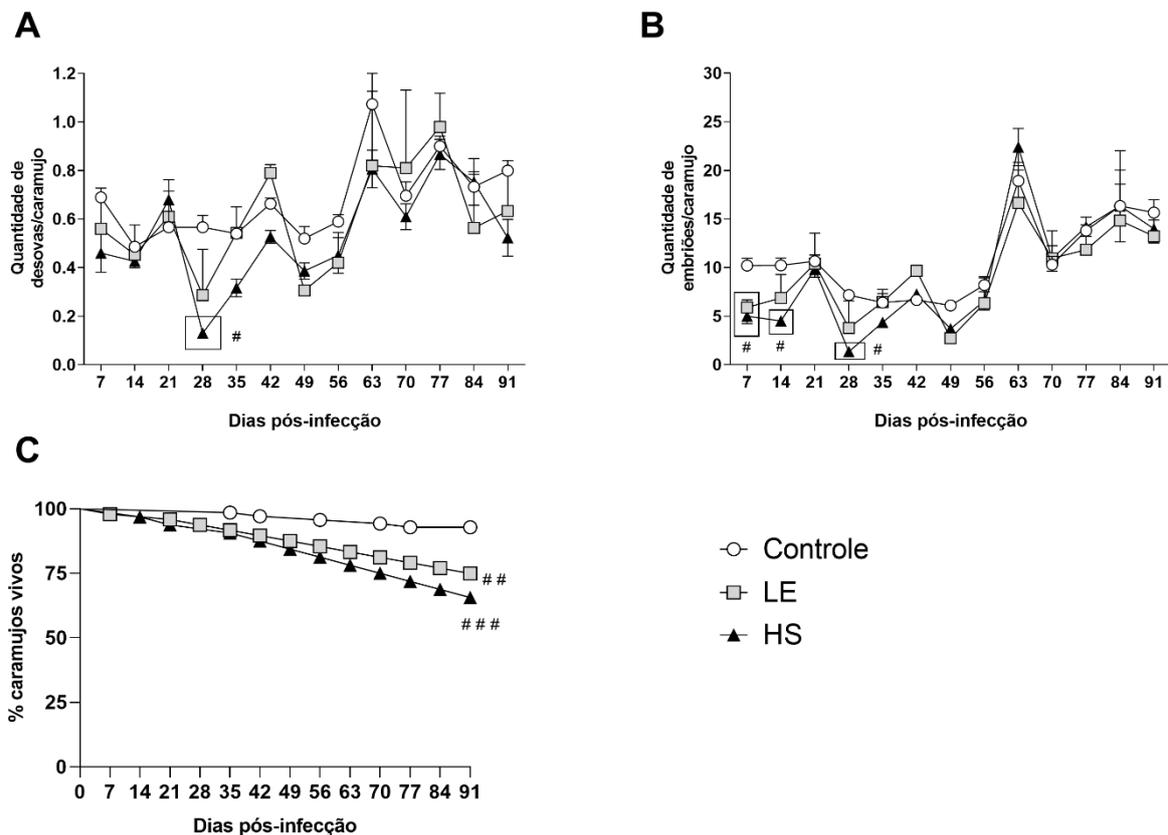
**Figura 42. Perfil bioquímico do tecido.** Níveis de NAG (A), nitrito (B), arginase (C), peróxido de hidrogênio (D) e mieloperoxidase (E) presentes na região cefalopodal de *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados por *Schistosoma mansoni* das linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*). Os caramujos foram infectados individualmente com 15 miracídios das linhagens LE ou HS do parasito e avaliados entre 6–48hrs e 5–30dpi. Os dados representam uma combinação de dois experimentos independentes (24 caramujos por grupo e ponto de análise) com resultados similares e são mostrados como média e desvio padrão. Foi utilizado o teste ANOVA (Two-way) seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos. #Dados estatisticamente significativos em comparação com o grupo controle.

### 3.5 Parâmetros biológicos

A avaliação da fecundidade dos caramujos demonstrou que aos 28 dpi., houve uma diminuição na quantidade de desovas produzidas por *B. glabrata* infectado com a linhagem HS de *S. mansoni*, quando comparado com o grupo controle (Figura 42. A). Em relação aos embriões, foi observada uma diminuição na sua produção por *B. glabrata* infectado por ambas as linhagens avaliadas (LE ou HS) após 7 dpi., em comparação aos caramujos não infectados (Figura 42. B).

Por outro lado, somente caramujos infectados com a linhagem HS produziram significativamente menos embriões aos 14 e 28 dpi., quando comparado com o grupo controle (**Figura 43. B**).

Os grupos de caramujos infectados por ambas as linhagens de *S. mansoni* avaliadas apresentaram mortalidade a partir dos primeiros dias de infecção (7–14 dpi.), período em que todos os caramujos do grupo controle permaneceram vivos (**Figura 43.C**). A mortalidade no grupo de caramujos infectados por ambas as linhagens do parasito foi intensificada progressivamente ao longo da infecção, especialmente no grupo infectado pela linhagem HS de *S. mansoni*, mas sem diferenças estatísticas quando comparado com a linhagem LE. Portanto, ao final dos 91 dias de avaliação, os caramujos infectados por ambas as linhagens do parasito apresentaram uma taxa de mortalidade estatisticamente maior quando comparada com o grupo de caramujos não infectados (**Figura 43.C**).



**Figura 43. Avaliação biológica.** Número de desovas (A) e embriões (B) e taxa de mortalidade (C) de *Biomphalaria glabrata* não infectados e infectados por *Schistosoma mansoni* das linhagens LE (referência humana) e HS (*Holochilus sciureus*). Os caramujos foram infectados individualmente com 15 miracídeos das linhagens LE ou HS do parasito e avaliados entre 6–48hrs e 5–30dpi. Os dados representam uma combinação de dois experimentos independentes (80 caramujos por grupo) com resultados similares e são mostrados como média e desvio padrão. Foi utilizado o teste ANOVA (Two-way) seguido do pós-teste de Bonferroni para a comparação entre os grupos. #Dados estatisticamente significativos em comparação com o grupo controle.

#### 4. DISCUSSÃO

Linhas e genótipos de *S. mansoni* isoladas de roedores silvestres naturalmente infectados já foram encontradas em diversas áreas endêmicas para esquistossomose no mundo (BASTOS et al., 1978; BASTOS et al., 1982; BARRAL et al., 1996; SIRE et al., 1999; CATALANO et al., 2020); entretanto, ainda não conhecemos como essa diversidade do parasito pode impactar na morbidade e transmissão da esquistossomose. Os caramujos do gênero *Biomphalaria* são os hospedeiros invertebrados obrigatórios de *S. mansoni* e são responsáveis por ampliarem assexuadamente o número de parasitos, gerando milhares de larvas infectantes aos hospedeiros vertebrados. Portanto, avaliar o desenvolvimento intramolusco de linhagens de *S. mansoni* isolada de roedores silvestres, pode nos ajudar a compreender o padrão de transmissão do parasito e a propor novas estratégias de controle da esquistossomose. No presente estudo, nós investigamos comparativamente a interação entre a linhagem HS de *S. mansoni* isolada do roedor silvestre *H. sciureus* naturalmente infectado, e uma linhagem humana referência do parasito (linhagem LE), durante infecções experimentais em caramujos *B. glabrata*. Nossos dados mostraram que *B. glabrata* da linhagem BH foi mais susceptível a infecção pela linhagem HS de *S. mansoni*; entretanto o padrão de migração dos esporocistos secundários e da eliminação de cercárias foi mais tardio quando comparado com a linhagem LE. Além disso, a infecção com linhagem HS induziu uma menor circulação de granulócitos, hialinócitos e hemócitos viáveis, assim como menor concentração das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-17 semelhante às de humanos, na hemolinfa de *B. glabrata*, em momentos específicos da infecção. No tecido, a infecção pela linhagem HS promoveu um aumento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MPO e arginase. Por fim, caramujos infectados com a linhagem HS de *S. mansoni* mostraram uma menor fecundidade durante o período de maturação e migração dos esporocistos e início da produção de cercárias, quando comparado aos caramujos não infectados.

A compatibilidade entre *B. glabrata* e *S. mansoni*, definida pela capacidade de miracídios gerarem cercárias nesses caramujos, é essencial para mensurar o nível de transmissão da esquistossomose em uma determinada região (MUTUKU et al., 2014). Em nosso estudo, demonstramos que a linhagem HS de *S. mansoni* apresentou uma elevada taxa de infectividade (número de caramujos eliminando cercárias) em *B. glabrata* BH (48,7%), quando comparado com linhagem LE referência (13,7%). Esses achados demonstram que a combinação alopátrica (linhagem HS vs *B. glabrata* BH) foi mais compatível que a combinação simpátrica (linhagem LE vs *B. glabrata* BH). Estudos demonstram que a interação entre linhagens do parasito e dos hospedeiros intermediários da mesma região (simpátricas) são, na maioria das vezes, mais

compatíveis (MORAND et al., 1996; SANDLAND et al., 2009). Entretanto, esse fenômeno biológico tem gerado dados controversos, uma vez que combinações alopatricas entre *S. mansoni* e *B. glabrata* também são capazes de induzir altas taxas de infecção dos caramujos (FRANSEN, 1979; THERON et al., 2014; LIMA et al., 2019). Além disso, precisamos ter cautela ao interpretar os resultados encontrados em nosso estudo, pois a linhagem LE é mantida em contato com caramujos *B. glabrata* BH sob condições de laboratório desde a década de 60 (PARAENSE; CORRÊA, 1963), e, portanto, seleções artificiais de caramujos resistentes podem ter acontecido, o que explicaria a baixa compatibilidade que encontramos para linhagem LE de *S. mansoni* em *B. glabrata* BH (simpátricos). Nesse sentido, é importante mencionar que tentativas de isolamento de novas linhagens humanas de *S. mansoni* estão sendo realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, para que futuros trabalhos forneçam um parâmetro complementar de comparação para a linhagem HS, e melhor comprove suas características encontradas nesse estudo.

Apesar de *B. glabrata* BH ter se mostrado suscetível à infecção por *S. mansoni* da linhagem HS, notamos que houve um padrão mais tardio de migração de esporocistos secundários e de eliminação de cercárias, quando comparado com a infecção destes moluscos com parasitos da linhagem LE. Durante o processo de isolamento da linhagem HS de *S. mansoni* em laboratório, entre 2017-2018, nosso grupo de pesquisa demonstrou esse mesmo pico tardio de eliminação de cercárias (**Capítulo I** e **Miranda et al.**, artigo submetido), o que indica ser uma característica própria dessa linhagem e que foi mantida mesmo após diversas passagens em laboratório. Bastos et al. (1982) estudando um isolado humano de *S. mansoni* da mesma região em que isolamos a linhagem HS do parasito, também mostraram esse mesmo perfil de eliminação de cercárias, o que sugere que essa característica pode ser típica das linhagens de *S. mansoni* que infectam humanos e roedores silvestres nesta região.

A interação entre diferentes linhagens de *S. mansoni* e o sistema interno de defesa de *B. glabrata* é fator determinante para o sucesso ou o fracasso da infecção no hospedeiro invertebrado (LOCKYE et al., 2004; COUSTAU; THÉRON, 2004; PILA et al., 2017). É bem estabelecido que os hemócitos presentes na hemolinfa desses caramujos são fundamentais para reconhecer, encapsular e secretar substâncias tóxicas que podem destruir as formas intra molusco de *S. mansoni* (LOKER et al., 1982; HUMPHRIES; YOSHINO, 2008; PINA et al., 2017; HAMBROOK et al., 2020). Em nosso estudo, demonstramos que a infecção pela linhagem HS induziu um menor recrutamento e viabilidade dessas células, principalmente aos 15 dpi., quando comparado com a linhagem LE. Em contraste, estudos demonstram que durante esse período, há um nítido aumento no número de hemócitos circulantes na hemolinfa de *B. glabrata* infectados por *S. mansoni* (BEZERRA et al., 1997; SANTOS et al., 2011), provavelmente associado ao início da migração

dos esporocistos secundários. De fato, esporocistos de *S. mansoni* secretam metabólitos, como proteases e outros produtos de transformação larval, que são capazes de interferir na motilidade e disseminação de hemócitos de *B. glabrata* (LODES; YOSHINO, 1990; HAMBROOK; HANINGTON, 2021), além de inibir nessas células, a produção de espécies de oxigênio e nitrogênio reativas (ZAHOOR et al., 2009; HAMBROOK; HANINGTON, 2021). Portanto, nossos dados sugerem que os esporocistos secundários da linhagem HS de *S. mansoni* poderiam estar induzindo mecanismos capazes de inibir a produção e a viabilidade de hemócitos, permitindo o melhor desenvolvimento dessas larvas.

Estudos prévios também demonstram que os hemócitos ativados de *B. glabrata* produzem e secretam proteínas semelhantes a citocinas humanas, como MIF, TNF- $\alpha$ , IL-17 e IL-1- $\beta$  (GRANATH; CONNORS; TARLETON, 1994; OUWE-MISSI-OUKEM-BOYER et al, 1994; BAEZA GARCIA et al., 2010; ZHANG et al., 2015; ADEMA et al., 2017). Destas citocinas, apenas BgMIF teve seu papel elucidado na imunidade inata de *B. glabrata*, sendo demonstrado que essa proteína possui uma função quimiotática para hemócitos (BAEZA GARCIA et al., 2010). Em nosso estudo, utilizamos a técnica de ELISA com proteínas humanas para detectar a presença e quantificar os níveis dessas citocinas-like na hemolinfa livre de células de *B. glabrata* frente à infecção por *S. mansoni* e nos controles não infectados. Assim, nós verificamos que houve uma boa detecção de MIF, IL-1 $\beta$  e IL-17 (semelhante com às de humanos) na hemolinfa dos caramujos infectados, mas baixos níveis de TNF- $\alpha$ . Além disso, caramujos infectados com ambas as linhagens do parasito avaliadas apresentaram níveis não detectáveis de TNF- $\alpha$  após 24 horas de infecção; entretanto, apenas em caramujos infectados com a linhagem HS, não houve detecção dessa citocina aos 10 dpi. Nossos achados foram semelhantes ao descrito por Ouwe-Missi-Oukem-Boyer et al. (1994), que mostraram que o parasito pode induzir uma redução dessa citocina ou que células ativadas podem consumi-la logo nas primeiras 24hrs de infecção. Nossos dados também mostraram que houve uma redução de TNF- $\alpha$  em caramujos infectados pela linhagem HS aos 10 dpi., período associado ao início da migração dos esporocistos secundários pelos tecidos. Assim, acreditamos ser provável que a ausência de TNF- $\alpha$  na hemolinfa de *B. glabrata* pode estar associada à mecanismos de evasão do parasito, como também pode indicar uma possível ação tecidual dessa citocina como forma de combater a infecção; entretanto, a presença de TNF- $\alpha$  no tecido de *B. glabrata* ainda precisa ser melhor investigada em trabalhos futuros. Apesar de não termos detectado IL-17 na hemolinfa de caramujos infectados pela linhagem LE ou HS, após 24hrs e 30 dpi, respectivamente, ainda é incerto afirmar se a ausência dessa citocina poderia estar associada com estratégias de defesa das formas intramolusco de *S. mansoni*, devido à falta de estudos que demonstrem o papel de IL-17 na resposta imune de *B. glabrata*.

Para tentar esclarecer a resposta imune tecidual de *B. glabrata* frente a infecção por *S. mansoni* da linhagem HS, nós utilizamos metodologias classicamente usadas para modelos vertebrados, com o propósito de verificar a presença e quantificar os níveis de NAG, nitritos que são produto final do metabolismo de NO, arginase e mieloperoxidase. Assim, foi demonstrado que todas essas moléculas estão presentes no tecido dos caramujos infectados ou não, indicando que essas metodologias podem ser usadas para complementar os estudos da resposta imune tecidual de *B. glabrata*. Dentre as moléculas avaliadas, nós verificamos que a infecção pela linhagem HS de *S. mansoni* induziu um aumento de arginase aos 30 dpi. no tecido de *B. glabrata*, período em que esses caramujos começaram a eliminar cercárias. O aumento nos níveis de arginase está associada aos mecanismos de escape induzidos por *S. mansoni*, pois a formação dessa molécula inibe a produção de NO, que é tóxico ao parasito (HAHN et al., 2001b; DINGUIRARD et al., 2018). O peróxido de hidrogênio é outra molécula capaz de lesar as formas intramolusco de *S. mansoni* (HAHN et al., 2001a), além de também ser danoso aos tecidos de *B. glabrata* (ALLAN; BLOUIN, 2020). Em nosso estudo, demonstramos que a infecção pela linhagem HS induziu um aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aos 10 e 15 dpi., quando comparado com o grupo controle. Entretanto, nesse mesmo período, houve também um aumento de MPO no tecido de *B. glabrata* infectado com a linhagem HS, principalmente aos 15 dpi, quando comparado com a linhagem LE. Estudos demonstram que *S. mansoni* é capaz de induzir a produção de MPO para neutralizar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a partir da sua conversão em HOCl, um composto com reduzida toxicidade (SCHLENK et al., 1991; WEIS et al., 1996; TORREILLES et al., 1997). Portanto, caramujos infectados com a linhagem HS do parasito que apresentam maior atividade tecidual de MPO possivelmente controlam o aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzida pela infecção, a partir da conversão dessa substância em HOCl, que, conseqüentemente, pode ser um dos fatores relacionados a maior sobrevivência do parasito.

A mortalidade e a fecundidade de *B. glabrata* infectados por *S. mansoni* também são parâmetros essenciais para avaliar o potencial de transmissão da esquistossomose (FARO et al., 2013; MUTUKU et al., 2014). Em nosso estudo, verificamos que a linhagem HS induziu uma redução na quantidade de desovas e embriões produzidos por *B. glabrata*, quando comparado com o grupo controle, principalmente aos 7, 14 e 28 dpi., período estimado para a multiplicação assexuada dos esporocistos primários, migração dos esporocistos secundários e início da produção de cercárias, respectivamente. Apesar disso, ambas as linhagens de *S. mansoni* avaliadas induziram taxas de mortalidade semelhantes, e estatisticamente maiores quando comparado com o grupo controle. Dados experimentais prévios demonstram que elevadas taxas de mortalidade (GUARALDO et al., 1981) e uma diminuição na fecundidade (FARO et al., 2013) de *B. glabrata* infectados, estão relacionadas com uma maior taxa de multiplicação de esporocistos nos tecidos.

Portanto, nossos dados indicam que o maior impacto na fisiologia reprodutiva de *B. glabrata* infectado com a linhagem HS de *S. mansoni*, pode estar associado à maior susceptibilidade dessa linhagem de caramujo a esse parasito.

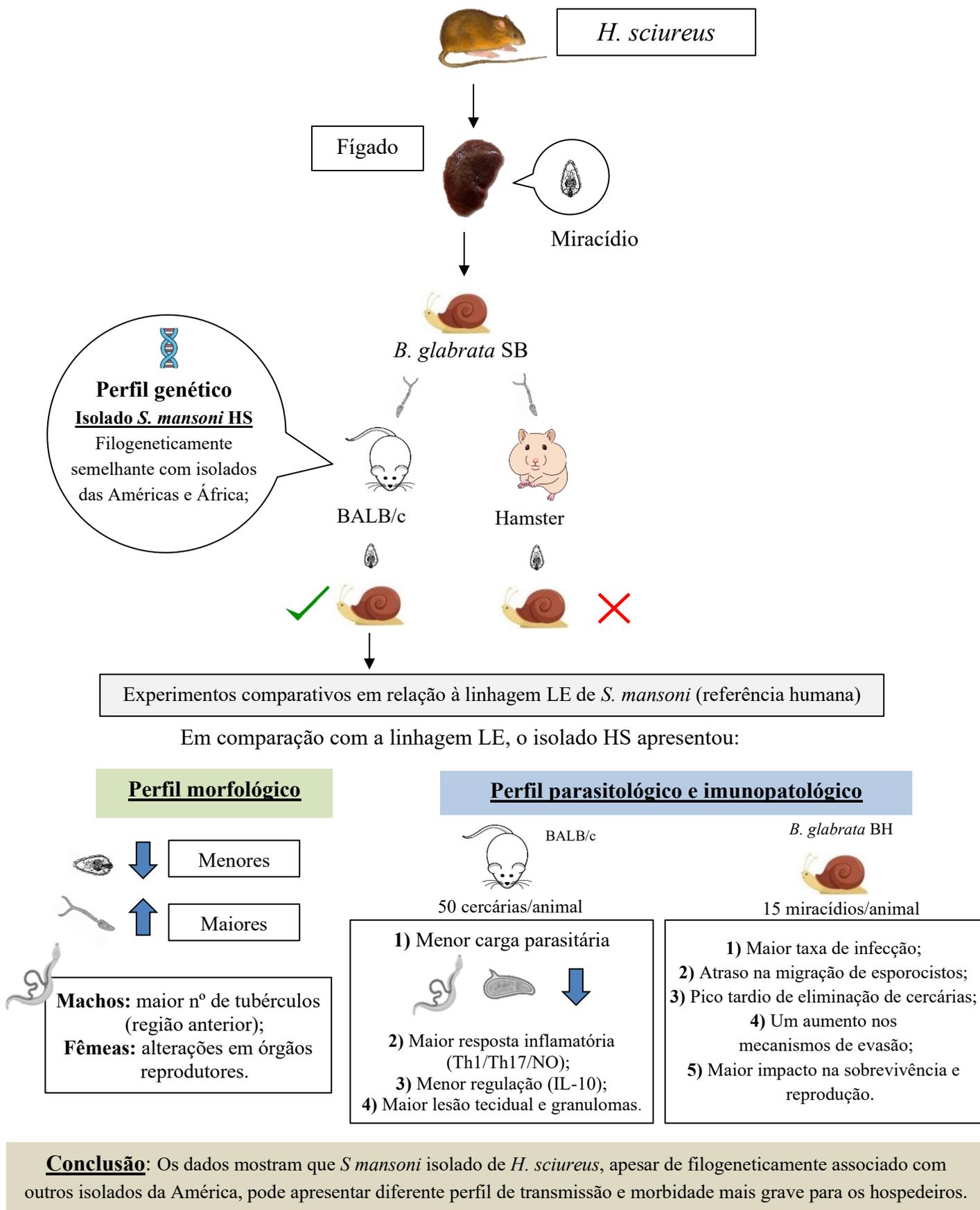
## 5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Em resumo, foi demonstrado que *B. glabrata* da linhagem BH é mais susceptível a infecção pela linhagem HS de *S. mansoni*, quando comparado com a linhagem LE. Parte dos mecanismos associados a esse perfil de compatibilidade pode ser explicado pelo menor recrutamento de hemócitos e menor viabilidade dessas células, assim como uma redução de TNF- $\alpha$  semelhante à de humano, na hemolinfa de caramujos infectados pela linhagem HS de *S. mansoni*. Além disso, essa linhagem do parasito também foi capaz de induzir uma maior diversidade de mecanismos de escape no hospedeiro intermediário, com aumento de arginase e MPO, quando comparado com a infecção produzida pela linhagem LE do parasito. Associado a esta maior susceptibilidade, a linhagem HS de *S. mansoni* induziu mais impactos na fisiologia de *B. glabrata* quando comparado com a linhagem LE.

A partir desses resultados foi possível conhecer como a linhagem HS de *S. mansoni* interage com seu hospedeiro intermediário para promover sua propagação, o que pode nos ajudar a propor novas medidas de controle focadas no ciclo de desenvolvimento intra molusco desse parasito.

## 6. CONCLUSÃO GERAL

A partir dos dados encontrados nesta tese, confirmamos nossa hipótese de que o isolado HS de *S. mansoni* obtido do roedor silvestre *H. sciureus* naturalmente infectado, apresenta características morfológicas próprias e uma interação diferenciada com seus hospedeiros vertebrados e invertebrados, quando comparado com uma linhagem humana referência (**figura 44**). Como consequências dessa interação, foi demonstrado experimentalmente que a infecção pelo isolado HS induziu uma maior gravidade da esquistossomose em camundongos e apresentou uma série de mecanismos de evasão em caramujos *B. glabrata*, favorecendo sua sobrevivência e, conseqüentemente, sua propagação. Esses dados sugerem que a interação entre *S. mansoni* e roedores silvestres pode selecionar diferentes linhagens do parasito, com o potencial de afetar a morbidade e o controle da esquistossomose.



**Figura 44. Resumo dos resultados obtidos.** O isolamento de *S. mansoni* HS foi realizado com sucesso a partir da utilização de *B. glabrata* SB e camundongos BALB/c. O perfil genético desse isolado mostrou-se semelhante com outros das Américas e África. Entretanto, quando comparado com a linhagem LE, *S. mansoni* HS apresentou diferenças morfológicas, e induziu maior severidade da esquistossomose em camundongos e um maior repertório de mecanismos de evasão em *B. glabrata*.

## REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C.; MORAIS, C. N.; MONTENEGRO, C. E.; WYNN, T. A.; MONTENEGRO, S. M. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends in Parasitology**, vol. 22, n. 2, p. 85-91, 2006.
- ADEMA, C. M.; HERTEL, L. A.; MILLER, R. D.; LOKER, E. S. A family of fibrinogen-related proteins that precipitates parasite-derived molecules is produced by an invertebrate after infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 94, n. 16, p. 8691-8696, 1997.
- ADEMA, C. M.; HILLIER, L. W.; JONES, C. S.; LOKER, E. S.; KNIGHT, M.; MINX, P., ...; WILSON, R. K. Whole genome analysis of a schistosomiasis-transmitting freshwater snail. **Nature Communications**, vol. 8, n. 1, p. 1-12, 2017.
- ALLAN, E. R.; BLOUIN, M. S. Heat shock increases hydrogen peroxide release from circulating hemocytes of the snail *Biomphalaria glabrata*. **Fish & shellfish immunology**, vol. 105, 203-208, 2020.
- ALARCÓN DE NOYA, B.; POINTIER, J. P.; COLMENARES, C.; THÉRON, A.; BALZAN, C.; CESARI, I. M.; GONZALES, S.; NOYA, O. Natural *Schistosoma mansoni* infection in wild rats from Guadeloupe: parasitological and immunological aspects. **Acta Tropica**, vol. 68, n. 1, p. 11-21, 1997.
- ALLAN, E. R.; TENNESSEN, J. A.; BOLLMANN, S. R.; HANINGTON, P. C.; BAYNE, C. J.; BLOUIN, M. S. Schistosome infectivity in the snail, *Biomphalaria glabrata*, is partially dependent on the expression of Grctm6, a Guadeloupe Resistance Complex protein. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 11, n. 2, p. e0005362, 2017.
- ALVES, W. Observations on *S. mattheei* and *S. haematobium* – adults from experimental animals and man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 41, n. 4, p. 430–431, 1948.
- AMARAL, K. B.; SILVA, T. P.; MALTA, K. K.; CARMO, L. A.; DIAS, F. F.; ALMEIDA, M. R.; ANDRADE, G. F.; MARTINS, J. S.; PINHO, R. R.; COSTA-NETO, S. F.; GENTILE, R.; MELO, R. C. Natural *Schistosoma mansoni* infection in the wild reservoir *Nectomys squamipes* leads to excessive lipid droplet accumulation in hepatocytes in the absence of liver functional impairment. **PLoS One**, vol. 11, n. 11, e0166979, 2016.
- AMORIM, J. P. Infestação experimental e natural de murídeos pelo *Schistosoma mansoni* (Nota prévia). **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 5, p. 219-22, 1953.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, vol. 31, n. 11, p. 656-663, 2009.
- ANDRADE, Z. A. Hepatopathy Schistosomal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 99, suppl.1, p. 51-57, 2004.

- ANGELI, V.; FAVEEUW, C.; ROYE, O.; FONTAINE, J.; TEISSIER, E.; CAPRON, A.; WOLOWCZUK, I.; CAPRON, M.; TROTTEIN, F. Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, n. 10, p. 1135-1148, 2001.
- ANTHONY, B. J.; RAMM, G. A.; McMANUS, D. P. Role of resident liver cells in the pathogenesis of schistosomiasis. **Trends in Parasitology**, vol. 28, n. 12, p. 572–579, 2012.
- ANTUNES, C. M. F.; DE ANDRADE, R. M.; KATZ, N.; COELHO, P. M. Z.; PELLEGRINO, J. Role of *Nectomys squamipes squamipes* in the epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, vol. 67, n. 1, p. 67-73, 1973.
- ARAÚJO, M. I.; DE JESUS, A. R.; BACELLAR, O. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **European Journal of Immunology**, vol. 26, n.6, p. 1399-1403, 1996.
- ARNOLD, M. L. Natural hybridization and the evolution of domesticated, pest and disease organisms. **Molecular Ecology**, vol. 13, n. 5, 997–1007, 2004.
- ASHTON, P. D.; HARROP, R.; SHAH, B.; WILSON, R. A. The schistosome egg: development and secretions. **Parasitology**, vol. 122, n. 3, p. 329-338, 2001.
- ATAEV, G. L.; PROKHOROVA, E. E.; KUDRYAVTSEV, I. V.; POLEVSHCHIKOV, A. V. The influence of trematode infection on the hemocyte composition in *Planorbarius corneus* (Gastropoda, Pulmonata). **Invertebrate Survival Journal**, vol. 13, n. 1, p. 164-171, 2016.
- BAEZA GARCIA, A.; PIERCE, R. J.; GOUBAL, B.; WERKMEISTER, E.; COLINET, D.; REICHHART, J.-M.; DISSOUS, C.; COUSTAU, C. Involvement of the cytokine MIF in the snail host immune response to the parasite *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, vol. 6, p. e1001115, 2010.
- BAILEY, P. J. Sponge implants as models. **Methods Enzymology**, vol. 162, p. 327-34, 1988.
- BARBOSA, F. S.; BARBOSA, I.; ARRUDA, F. *Schistosoma mansoni*: natural infection of cattle in Brazil. **Science**, vol. 138, n. 3542, p. 831, 1962.
- BARCELOS, L. S.; TALVANI, A.; TEIXEIRA, A. S.; VIEIRA, L. Q.; CASSALI, G. D.; ANDRADE, S. P.; TEIXEIRA, M. M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 78, n. 2, p. 352-358, 2005.
- BARRAL, V.; MORAND, S.; POINTIER, J. P.; THÉRON, A. Distribution of schistosome genetic diversity within naturally infected *Rattus rattus* detected by RAPD markers. **Parasitology**, vol. 113, n. 6, p. 511-517, 1996.
- BARRETO, G. R.; GARCÍA-RANGEL, S. *Holochilus sciureus*. **Mammalian Species**, vol. 2005, n. 780, p. 1-5, 2005.
- BARRON, L.; WYNN, T. A. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, vol. 300, n. 5, p.723-728, 2011a.

BARRON, L; WYNN, T. A. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 9, p. 2509-2514, 2011b.

BARTLEY, P. B.; RAMM, G. A.; JONES, M. K.; RUDDELL, R. G.; LI, Y.; McMANUS, D. P. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. **International Journal for Parasitology**, vol. 36, n. 9, p. 993-1001, 2006.

BARTON, N. H. The role of hybridization in evolution. **Molecular Ecology**, vol. 10, n. 3, p. 551-568, 2001.

BASTOS, O. C.; SILVA, A. M. A.; SOUZA, E. P. de, LEMOS NETO, R. C.; PIEDRABUENA, A. E. Occurrence of wild and human strains of *Schistosoma mansoni* in lower Amazonia: I - study in molluscs. **Revista de Saúde Pública**, vol. 16, n. 5, p. 292 - 298, 1982.

BASTOS, O.C.; SADIGURKY, M.; NASCIMENTO, M.D.S.B.; BRAZIL, R.P.; HOLANDA, J.C. *Holochilus brasiliensis nanus* Thomas, 1897: Sugestão de modelo experimental para filariose, leishimaniose e esquistossomose. **Revista do Instituto de Medicina Tropical São Paulo**, vol. 26, n. 6, p. 307-315, 1984

BEHM, C. A; OVINGTON, K. S. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. **Parasitology Today**, vol. 16, n. 5, p. 202-209, 2000.

BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Purification and characterization of a tetrameric alpha-macroglobulin proteinase inhibitor from the gastropod mollusc *Biomphalaria glabrata*. **Biochemical Journal**, vol. 316, n. 3, p. 893-900, 1996.

BENDER, R. C.; BRODERICK, E. J.; GOODALL, C. P.; BAYNE, C. J. Respiratory burst of *Biomphalaria glabrata* hemocytes: *Schistosoma mansoni*-resistant snails produce more extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> than susceptible snails. **Journal of Parasitology**, vol. 91, n. 2, p. 275-279, 2005.

BERGQUIST, R.; ZHOU, X. N.; ROLLINSON, D.; REINHARD-RUPP, J.; KLOHE, K. Elimination of schistosomiasis: the tools required. **Infectious Diseases of Poverty**, vol. 6, n. 1, p. 1-9, 2017.

BETSON, M.; SOUSA-FIGUEIREDO, J. C.; KABATEREINE, N. B.; STOTHARD, J. R. Use of fecal occult blood tests as epidemiologic indicators of morbidity associated with intestinal schistosomiasis during preventive chemotherapy in young children. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 87, n. 4, p. 694, 2012.

BEZERRA, F. S. M; NOGUEIRA-MACHADO, J. A., CHAVES, M. M., MARTINS, R. L.; COELHO, P. M. Z. Quantification of the number and phagocytary activity of hemocytes of resistant and susceptible strains of *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 39, p. 197-201, 1997.

BINA, J. C. Estudo de variáveis que podem influenciar na evolução da esquistossomose mansônica: efeito da terapêutica específica e da interrupção da transmissão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 29, n. 6, p. 629-630, 1996.

BINA, J. C.; PRATA, A. Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I - *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 36, n.2, p.211-216. 2003.

BLOCH, E. H. *In vivo* microscopy of schistosomiasis. II. Migration of *Schistosoma mansoni* in the lungs, liver, and intestine. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 29, n. 1, p. 62-70, 1980.

BOISSIER, J.; MOUAHID, G.; MONÉ, H. *Schistosoma* spp. In: Rose, J. B.; JIMÉNEZ-CISNEROS, B. (eds), **Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project)**. (L. Robertson (eds), Part 3: Specific Excreted Pathogens: Environmental and Epidemiology Aspects - Section 4: Helminths), Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO. p. 35.

BOISSIER, J.; GRECH-ANGELINI, S.; WEBSTER, B. L.; ALLIENNE, J-F.; HUYSE, T.; MAS-COMA, S.; ...MITTA, G. Outbreak of urogenital schistosomiasis in Corsica (France): an epidemiological case study. **The Lancet Infectious Diseases**, vol. 16, n. 8, p. 971-979, 2016.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D'ANDREA, P. S. **Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS; 2008. 120 p. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/media/livro%20roedores.pdf>. Acesso em junho de 2022.

BOON, N. A.; MBOW, M.; PAREDIS, L.; MORIS, P.; SY, I.; MAES, T.; WEBSTER, B. L.; SACKO, M.; VOLCKAERT, F. A. M.; POLMAN, K.; HUYSE, T. No barrier breakdown between human and cattle schistosome species in the Senegal River Basin in the face of hybridisation. **International Journal Parasitology**, vol. 49, n. 13-14, p. 1039-1048, 2019.

BOOTH, M., MWATHA, J. K.; JOSEPH, S.; JONES, F. M.; KADSO, H.; IRERI, E.; KAZIBWE, F.; KEMIJUMBI, J.; KARIUKI, C.; KIMANI, G.; OUMA, J. H.; KABATEREINE, N. B.; VENNERVALD, B. J.; DUNNE, D. W. 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. **The Journal of Immunology**, vol. 172, n. 2, p. 1295-1303, 2004.

BOROS, D. L.; WARREN, K. S. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 132, n. 3, p. 488-507, 1970.

BOURBOUZE, R.; RAFFI, F.; DAMERON, G.; HALI-MIRAFTAB, H.; LOKO, F.; VILDE, J. L. N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminidase (NAG) isoenzymes release from human monocyte-derived macrophages in response to zymosan and human recombinant interferon- $\gamma$ . **Clinica Chimica Acta**, vol. 199, n. 2, p. 185-194, 1991.

BRANDÃO, M. V.; NASCIMENTO, F. O. On the occurrence of *Holochilus chacarius* (Cricetidae: Sigmodontinae) in Brazil, with taxonomic notes on *Holochilus* species. **Papéis Avulsos de Zoologia**, vol. 55, n. 3, p. 47-67, 2015.

BRANDÃO-BEZERRA, L.; DE CARVALHO MARTINS, J. S. C.; DE OLIVEIRA, R. M. F.; LOPES-TORRES, E. J.; NEVES, R. H.; CORRÊA, C. L.; MACHADO-SILVA, J. R. Long-term ethanol intake causes morphological changes in *Schistosoma mansoni* adult worms in mice. **Experimental Parasitology**, vol. 203, p. 30-35, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e Controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas**: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 2ª ed., Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. 178 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii**: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE). 4ª ed., Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 144 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de informação do programa de vigilância e controle da esquistossomose**. 2016. Disponível em: <http://tabnet.datas.us.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinan/pce/cnv/pceMA.def>. Acesso em: 01 Março/2021.

BRAUN, L.; GRIMES, J. E. T.; TEMPLETON, M. R. The effectiveness of water treatment processes against schistosome cercariae: A systematic review. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. e0006364, 2018.

BRENER, Z. Esquistossomose experimental. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, vol. 11, p. 473-506, 1959.

BRENER, Z. Observações sobre a infecção do camundongo pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, vol. 8, p. 565-570, 1956.

BRENNAN, J. J.; GILMORE, T. D. Evolutionary origins of toll-like receptor signaling. **Molecular Biology and Evolution**, vol. 35, n. 7, p. 1576-1587, 2018.

BROWN, D. R.; FOWELL, D. J.; CORRY, D. B.; WYNN, T. A.; MOSKOWITZ, N. H.; Cheever, A. W.; LOCKSLEY, R. M.; REINER, S. L.  $\beta$ 2-Microglobulin-dependent NK1.1+ T cells are not essential for T helper cell 2 immune responses. **The Journal of Experimental Medicine**, vol. 184, n. 4, p. 1295-1304, 1996.

BRUNET, L. R.; FINKELMAN, F. D.; CHEEVER, A.W.; KOPF, M. A.; PEARCE, E. J. IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. **The Journal of Immunology**, vol. 159, n. 2, p. 777-785, 1997.

BURCHARD, G. D.; KERN, P. Probable hybridization between *S. intercalatum* and *S. haematobium* in western Gabun. **Tropical and Geographical Medicine**, vol. 37, n. 2, 119-123, 1985.

BURKE, M. L.; JONES, M. K.; GOBERT, G. N.; LI, Y. S.; ELLIS, M. K.; McMANUS, D. P. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, vol. 31, n. 4, p. 163-176, 2009.

BUSTINDUY, A. L.; SOUSA-FIGUEIREDO, J. C.; ADRIKO, M.; BETSON, M.; FENWICK, A.; KABATEREINE, N.; STOTHARD, J. R. Fecal occult blood and fecal calprotectin as point-of-care markers of intestinal morbidity in Ugandan children with *Schistosoma mansoni* infection. **Plos Neglected Tropical Diseases**, vol. 7, n. 11, p. e2542, 2013.

CALANDRA, T.; ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, vol. 3, n. 10, p. 791-800, 2003.

CALDAS, I. R., CAMPI-AZEVEDO, A. C., OLIVEIRA, L. F. A., SILVEIRA, A. M. S., OLIVEIRA, R. C.; GAZZINELLI, G. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta tropica**, vol. 108, n. 2-3, p. 109-117, 2008.

CAMERON, T. W. M. A new definitive host for *Schistosoma mansoni*. **Journal of Helminthology**, vol. 5, p. 219 – 222, 1928.

CANTANHEDE, S. P. D.; FERNANDEZ, M. A.; MATTOS, A. C.; MONTRESOR, L. C.; SILVA-SOUZA, N.; THIENGO, S. C. Freshwater gastropods of the Baixada Maranhense Microregion, an endemic area for schistosomiasis in the State of Maranhao, Brazil: I - qualitative study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 47, n. 1, p. 79-85, 2014.

CARDIM, L. L.; FERRAUDO, A. S.; PACHECO, S. T. A.; REIS, R. B.; SILVA, M. M. N.; CARNEIRO, D. D. M. T.; BAVIA, M. E. Análises espaciais da identificação das áreas de risco para a esquistossomose mansônica no município de Lauro de Freitas, Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, vol. 27, n. 5, p. 899- 908, 2011.

CARNEIRO, C. S.; BASTOS, O. C.; NETO, R. C. L.; LIANCE, M.; PICOT, H.; HOUIN, R. Identity of two strains of *Schistosoma mansoni* studied by Western blot. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 24, sup II, p. 65 – 66., 1991.

CARVALHO, O. S.; ANDRADE, R. M.; CORTÊS, M. I. N. Ciclo vital de *Schistosoma mansoni* através do *Holochilus brasiliensis* (Desmarest, 1818), em ambiente semi-natural (Trematoda: Schistosomatidae; Rodentia: Cricetidae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 10, n. 5, p. 235-247, 1976.

CARVALHO, S. A. D.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; AMATO NETO, V.; SHIROMA, M.; LUCCAS, F. J. C. Neurotoxicidade do oxamniquine no tratamento da infecção humana pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 27, n. 3, p. 132-142, 1985.

CASTILLO, M. G.; HUMPHRIES, J. E.; MOURÃO, M. M.; MARQUEZ, J.; GONZALEZ, A.; MONTELONGO, C. E. *Biomphalaria glabrata* immunity: Post-genome advances. **Developmental & Comparative Immunology**, vol. 104, p. 103557, 2020.

CATALANO, S., LÉGER, E., FALL, C. B., BORLASE, A., DIOP, S. D., BERGER, D.; WEBSTER, B. L.; FAYE, B.; DIOUF, N. D.; ROLLINSON, D.; SÈNE, M.; BÂ, K.; WEBSTER, J. P. Multihost Transmission of *Schistosoma mansoni* in Senegal, 2015–2018. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 26, n. 6, p. 1234, 2020.

- CATALANO, S.; SÈNE, M.; DIOUF, N. D.; FALL, C. B.; BORLASE, A.; LÉGER, E.; BÂ, K.; WEBSTER, J. P. Rodents as natural hosts of zoonotic *Schistosoma* species and hybrids: an epidemiological and evolutionary perspective from West Africa. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 218, n. 3, p. 429-433, 2018.
- CHAIA, G. Technique for Concentration of Miracidia. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais*, vol. 8, p. 355–357, 1956.
- CHEEVER, A. W. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide Digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. **Bulletin of the World Health Organization**, vol. 39, n. 2, p. 328, 1968.
- CHEEVER, A. W.; BYRAM, J. E.; HIENY, S.; VON LICHTENBERG, F.; LUNDE, M. N.; SHER, A. Immunopathology of *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* infection in B cell depleted mice. **Parasite Immunology**, v. 7, n. 4, p. 399-413, 1985.
- CHEEVER, A. W.; DUVALL, R. H.; HALLACK, T. A. J. R.; MINKER, R. G.; MALLEY, J. D.; MALLEY, K. G. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 37, n. 1, p. 85-97, 1987.
- CHEEVER, A. W.; LENZI, J. A.; LENZI, H. L.; ANDRADE, Z. A. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 97, p. 917–940, 2002.
- CHEEVER, A. W.; MACEDONIA, J. G.; MOSIMANN, J. E.; CHEEVER, E. A. Kinetics of egg production and egg excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in mice infected with a single pair of worms. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 50, n. 3, p. 281-295, 1994.
- CHERNIN, E. Observations on hearts explanted in vitro from the snail *Australorbis glabratus*. **Journal of Parasitology**. vol 49, p. 353-364, 1963.
- CHUAH, C.; GOBERT, G. N.; LATIF, B.; HEO, C. C.; LEOW, C. Y. Schistosomiasis in Malaysia: A review. **Acta Tropica**, vol. 190, p. 137-143, 2019.
- CHUAH, C; JONES, M. K.; BURKE, M. L.; McMANUS, D. P.; GOBERT, G. N. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, vol. 30, n. 3, p. 141-150, 2014.
- CNOPS, L.; HUYSE, T.; MANIEWSKI, U.; SOENTJENS, P.; BOTTIEAU, E.; VAN ESBROECK, M.; CLERINX, J. Acute Schistosomiasis with a *Schistosoma mattheei* × *Schistosoma haematobium* Hybrid Species in a Cluster of 34 Travelers Infected in South Africa. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 72, n. 10, p. 1693-1698, 2021.
- COELHO, P. M. Z.; ANDRADE, Z. de A.; BORGES, C. M. da C; RIBEIRO, F.; BARBOSA, L. **Evolução de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário**. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (orgs). *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 147-160, 2008.

- COLLEY, D. G.; ANDROS, T. S.; CAMPBELL, Jr C. H. Schistosomiasis is more prevalent than previously thought: what does it mean for public health goals, policies, strategies, guidelines and intervention programs? **Infectious Diseases of Poverty**, vol. 6, n.1, p. 1-8, 2017.
- COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A. L.; SECOR, W. E.; KING, C. H. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253-2264, 2014.
- COLLEY, D. G.; LOKER, E. S. New tools for old questions: how strictly human are "Human Schistosomes"-and does it matter? **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 218, n. 3, p. 344-346, 2018.
- COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, vol. 36, n. 8, p. 347-357, 2014.
- CONNORS, V. A.; LODES, M. J.; YOSHINO, T. P. Identification of a *Schistosoma mansoni* sporocyst excretory-secretory antioxidant molecule and its effect on superoxide production by *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 58, n. 3, p. 387-395, 1991.
- CORRALIZA, I. M.; CAMPO, M. L.; SOLER, G.; MODOLELL, M. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. **Journal of Immunological Methods**, vol. 174, n. 1-2, p. 231-235, 1994.
- COSTA NETO, S. F. D.; ALVES, V. M. T.; ALVES, V. M. T.; GARCIA, J. S.; SANTOS, M. A. J. D.; NOGUEIRA, V. D. A.; PINHEIRO, J. Biochemical and histological changes in liver of *Nectomys squamipes* naturally infected by *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol. 22, n. 4, p. 519-524, 2013.
- COSTAIN, A. H.; MACDONALD, A. S.; SMITS, H. H. Schistosome egg migration: mechanisms, pathogenesis and host immune responses. **Frontiers in Immunology**, vol. 9, p. 3042, 2018.
- COSTA-NETO JP, BARBIERE R, IBAÑEZ M DO SR, CAVALCANTE PRS, PIORSKI NM. Limnologia de três ecossistemas aquáticos da Baixada Maranhense. **Boletim do Laboratório de Hidrobiologia**, vol. 14, n. 1, p. 19-38, 2001.
- COSTA-SILVA, M.; BARROS, L. A.; GARCIA, J. S.; NEVES, R. H.; RODRIGUES-SILVA, R.; MACHADO-SILVA, J. R.; MALDONADO-JÚNIOR, A. Susceptibility of a Brazilian wild rodent isolate of *Schistosoma mansoni* to praziquantel in mice. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 4, p. 394-399, 2012.
- COULSON, P. S. The radiation-attenuated vaccine against schistosomes in animal models: paradigm for a human vaccine? **Advances in Parasitology**, vol. 39, p. 271-336, 1997.
- COULSON, P. S.; SMYTHIES, L. E.; BETTS, C.; MABBOTT, N. A.; STERNBERG, J. M.; WEI, X. G.; LIEW, F. Y.; WILSON, R. A. Nitric oxide produced in the lungs of mice immunized with the radiation-attenuated schistosome vaccine is not the major agent causing challenge parasite elimination. **Immunology**, vol. 93, n. 1, p. 55, 1998.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 99, p. 13-19, 2004.

COURA, J. R.; CAMILLO-COURA, L.; KALACHE, A.; ARGENDO, C. A. Esquistossomose aguda autóctone de foco na cidade do Rio de Janeiro. Estudo de 22 casos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 4, n. 6, p. 387-397, 1970.

COURA, J. R.; CONCEIÇÃO, M. J.; SANTOS, M. L. D.; MENDONÇA, Z. G. D.; CUTRIM, R. N. M. Cross-sectional and evolutive studies of schistosomiasis mansoni in untreated and mass treated endemic areas in the southeast and northeast of Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 87, suppl. 4, p. 175-182, 1992.

COUSTAU, C; THERON, A. Resistant or resisting: seeking consensus terminology. **Trends Parasitology**, vol. 20, n. 5, p. 209-210, 2004.

CRELLEN, T.; ALLAN, F.; DAVID, S.; DURRANT, C.; HUCKVALE, T.; HOLROYD, N.; EMERY, A. M.; ROLLINSON, D.; AANENSEN, D. M.; BERRIMAN, M.; WEBSTER, J. P.; COTTON, J. A. Whole genome resequencing of the human parasite *Schistosoma mansoni* reveals population history and effects of selection. **Scientific Reports**, vol. 6, p. 20954, 2016.

CUNIN, P.; TCHUEM TCHUENTÉ, L. A.; POSTE, B.; DJIBRILLA, K.; MARTIN, P. M. V. Interactions between *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* in humans in north Cameroon. **Tropical Medicine & International Health**, vol. 8, n. 12, p. 1110-1117, 2003.

CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends Parasitology**, vol. 19, n.2, p. 63-66, 2003.

CUTRIM, R. N. M.; CHIEFFI, P. P.; MORAES, J. C. D. Schistosomiasis mansoni in the "Baixada Ocidental Maranhense", state of Maranhao, Brazil: cross-sectional studies performed in 1987 and 1993. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 40, p. 165-172, 1998.

D'ANDREA, P. S.; MAROJA, L. S.; GENTILE, R.; CERQUEIRA, R.; MALDONADO JR., A.; REY, L. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea-Trematoda) in a naturally infected population of water-rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil. **Parasitology**, vol.120, n. 6, p. 573-582, 2000.

DABBAGH, K; LEWIS, D. B. Toll-like receptors and T-helper-1/Thelper- 2 responses. **Current Opinion in Infectious Diseases**, vol. 16, n. 3, p. 199-204, 2003.

DE JESUS, A. R.; SILVA, A.; SANTANA, L. B.; MAGALHÃES, A.; DE JESUS, A. A.; DE ALMEIDA, R. P.; RÊGO, M. A.; BURATTINI, M. N.; PEARCE, E. J.; CARVALHO, E. M. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **The Journal of Infectious Disease**, vol. 185, n. 1, p. 98-105, 2002.

DE OLIVEIRA FRAGA L. A.; TORRERO, M. N.; TOCHEVA, A. S.; MITRE, E.; DAVIES, S. J. Induction of type 2 responses by schistosome worms during prepatent infection. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 201, n. 3, p. 464-472, 2010.

- DE REZENDE, M. C.; MOREIRA, J. M. P.; FERNANDES, L. L. M.; RODRIGUES, V. F.; NEGRÃO-CORRÊA, D. *Strongyloides venezuelensis*-infection alters the profile of cytokines and liver inflammation in mice co-infected with *Schistosoma mansoni*. **Cytokine**, vol. 127, p. 154931, 2020.
- DHEILLY, N. M.; DUVAL, D.; MOUAHID, G.; EMANS, R.; ALLIENNE, J.-F.; GALINIER, R.; GENTHON, C.; DUBOIS, E.; DU PASQUIER, L.; ADEMA, C.M.; GRUNAU, C.; MITTA, G.; GOURBAL, B. A family of variable immunoglobulin and lectin domain containing molecules in the snail *Biomphalaria glabrata*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 48, n. 1, p. 234-243, 2015.
- DIAS NETO, E.; PEREIRA DE SOUZA, C.; ROLLINSON, D.; KATZ, N.; PENA, S. D. J.; SIMPSON, A. J. G. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 57, n. 1, p. 83-88, 1993.
- DIAS, L. C. S.; ÁVILA-PIRES, F. S.; PINTO, A. C. M. Parasitological and ecological aspects of schistosomiasis mansoni in the valley of Paraíba do Sul River (São Paulo State, Brazil). 1. Natural infection of small mammals with *Schistosoma mansoni*. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 72, n. 5, p. 496-500, 1978.
- DIAS, L. C.; PIEDRABUENA, A. E. Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* in naturally infected *Holochilus brasiliensis leucogaster*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 74, n.5, p. 690-690, 1980.
- DINGUIRARD, N.; CAVALCANTI, M. G. S.; WU, X. J.; BICKHAM-WRIGHT, U.; SABAT, G.; YOSHINO, T. P. Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* hemocytes during *in vitro* encapsulation of *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Frontiers in Immunology**, vol. 9, p. 2773, 2018.
- DO CARMO-SILVA, C. F.; TELES-REIS, A.; SILVA-SOARES, R. F.; RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; VIEGAS-MELO, D.; CARDOSO, D. T.; MIRANDA, G. S.; SILVA-SOUZA, N. Spatial and seasonal distribution of *Holochilus sciureus* with *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area for schistosomiasis in Brazil. **Acta Parasitologica**, vol. 64, n. 4, p. 932-937, 2019.
- DUNNE, D. W.; COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**, vol. 5, n. 5, p. 420-426, 2005.
- DUPLANTIER, J. M.; SÈNE, M. Rodents as reservoir hosts in the transmission of *Schistosoma mansoni* in Richard-Toll, Senegal, West Africa. **Journal of Helminthology**, vol. 74, p. 129-135, 2000.
- DUVAL, D.; PICHON, R.; LASSALLE, D.; LAFFITTE, M.; GOURBAL, B.; GALINIER, R. A New Assessment of Thioester-Containing Proteins Diversity of the Freshwater Snail *Biomphalaria glabrata*. **Genes**, vol. 11, n. 1, p. 69, 2020.

- EL RIDI, R.; VELUPILLAI, P.; HARN, D. A. Regulation of schistosome egg granuloma formation: host-soluble L-selectin enters tissue-trapped eggs and binds to carbohydrate antigens on surface membranes of miracidia. **Infection and Immunity**, vol. 64, n. 11, p. 4700-4705, 1996.
- EUZÉBIO, A. A.; ZUIM, N. R. B.; LINHARES, A. X.; MAGALHAES, L. A.; ZANOTTI-MAGALHAES, E. M. Experimental Evaluation of the Pathogenicity of Different Strains of *Schistosoma mansoni*. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, vol. 2012, p. 1-7, 2012.
- EVERTS, B.; PERONA-WRIGHT, G.; SMITS, H. H.; HOKKE, C. H.; VAN DER HAM, A. J.; FITZSIMMONS, C. M.; DOENHOFF, M. J.; VAN DER BOSCH, J.; MOHRS, K.; HAAS, H.; MOHRS, M.; YAZDANBAKHS, M.; SCHRAMM, G. Omega-1, a glycoprotein secreted by *Schistosoma mansoni* eggs, drives Th2 responses. **Journal of Experimental Medicine**, vol. 206, n. 8, p. 1673-1680, 2009.
- FALL, C. B.; LAMBERT, S.; LÉGER, E.; YASENEV, L.; GARBA, A. D.; DIOP, S. D.; BORLASE, A.; CATALANO, S.; FAYE, B.; WALKER, M.; SENE, M.; WEBSTER, J. P. Hybridized Zoonotic *Schistosoma* Infections Result in Hybridized Morbidity Profiles: A Clinical Morbidity Study amongst Co-Infected Human Populations of Senegal. **Microorganisms**, vol. 9, n. 8, p. 1776, 2021.
- FALLON, P. G.; RICHARDSON, E. J.; MCKENZIE, G. J.; MCKENZIE, A. N. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **The Journal of Immunology**, vol. 164, n. 5, p. 2585-2591, 2000.
- FALLON, P. G.; SMITH, P.; ANDDUNNE, D.W. Type 1 and type 2 cytokine producing mouse CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. **European Journal of Immunology**, vol. 28, n. 4, p. 1408-1416, 1998.
- FAN, P. C.; KANG, Y. C. Egg production capacity of one-pair worms of *Schistosoma japonicum* in albino mice. **Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, vol. 34, n. 4, p. 708-712, 2003.
- FARO, M. J.; PERAZZINI, M.; CORRÊA, L. DOS R.; MELLO-SILVA, C. C.; PINHEIRO, J.; MOTA, E. M.; DE SOUZA, S.; DE ANDRADE, Z.; JÚNIOR, A. M. Biological, biochemical and histopathological features related to parasitic castration of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, vol. 134, n. 2, p. 228-234, 2013.
- FERNANDES, A.; PEREIRA, A. T.; ESCHENAZI, P. D.; SCHILTER, H. C.; SOUSA, A. L.; TEIXEIRA, M. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Evaluation of the immune response against *Strongyloides venezuelensis* in antigen-immunized or previously infected mice. **Parasite Immunology**, vol. 30, n. 3, p. 139-49, 2008.
- FINLAY, J. B.; LIU, X.; ERMEL, R. W.; ADAMSON, T. W. Maternal weight gain as a predictor of litter size in Swiss Webster, C57BL/6J, and BALB/cJ mice. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, vol. 54, n. 6, p. 694-699, 2015.

FLOUDAS, A.; CLUXTON, C. D.; FAHEL, J.; KHAN, A. R.; SAUNDERS, S. P.; AMU, S.; ALCAMI, A.; FALLON, P. G. Composition of the *Schistosoma mansoni* worm secretome: identification of immune modulatory cyclophilin A. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 11, n. 10, p. e0006012, 2017.

FRANDSEN, F. Studies of the relationship between *Schistosoma* and their intermediate hosts. III. The genus *Biomphalaria* and *Schistosoma mansoni* from Egypt, Kenya, Sudan, Uganda, West Indies (St. Lucia) and Zaire (two different strains: Katanga and Kinshasa). **Journal of Helminthology**, vol. 53, n. 4, p. 321-348, 1979.

FU, C. L.; ODEGAARD, J. I.; HSIEH, M. H. Macrophages are required for host survival in experimental urogenital schistosomiasis. **The FASEB Journal**, vol. 29, n. 1, p. 193-207, 2015.

GALINIER, R.; PORTELA, J.; MONÉ, Y.; ALLIENNE, J. F.; HENRI, H.; DELBECQ, S.; MITTA, G.; GOURBAL, B.; DUVAL, D. Biomphalysin, a new  $\beta$  pore-forming toxin involved in *Biomphalaria glabrata* immune defense against *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, vol. 9, n. 3, e1003216, 2013.

GALINIER, R.; ROGER, E.; MONÉ, Y.; DUVAL, D.; PORTET, A.; PINAUD, S.; CHAPARRO, C.; GRUNAU, C.; GENTHON, C.; DUBOIS, E.; ROGNON, A.; ARANCIBIA, N.; DEJEAN, B.; THÉRON, A.; GOURBAL, B. A multistrain approach to studying the mechanisms underlying compatibility in the interaction between *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 11, n. 3, p. e0005398, 2017.

GENTILE, R.; COSTA-NETO, F. S.; D'ANDREA, S. P. A review on the role of the water-rat *Nectomys squamipes* on the transmission dynamics of mansonic schistosomiasis: a long-term multidisciplinary study in an endemic area. **Oecologia Australis**, vol. 14, n. 3, p. 711 – 725, 2010.

GENTILE, R.; COSTA-NETO, S. F.; GONÇALVES, M. M. L.; BONECKER, S. T.; FERNANDES, F. A.; GARCIA, J. S.; BARRETO, M. G. M.; SOARES, M. S.; D'ANDREA, P. S.; PERALTA, J. M.; REY, L. An ecological field study of the water-rat *Nectomys squamipes* as a wild reservoir indicator of *Schistosoma mansoni* transmission in an endemic area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 101, N. 1, p. 111-117, 2006.

GENTILE, R.; SOARES, M. S.; BARRETO, M. G. M.; GONÇALVES, M. M. L.; D'ANDREA, P. S. The role of wild rodents in the transmission of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Schistosomiasis*. London: INTECH Open Access Publisher, p. 231-54, 2012.

GOBERT, G. N.; STENZEL, D. J.; McMANUS, D. P.; JONES, M. K. The ultrastructural architecture of the adult *Schistosoma japonicum* tegument. **International Journal for Parasitology**, vol. 33, n. 14, p. 1561-1575, 2003.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. **Nature Reviews Immunology**, vol. 3, n. 1, p. 23-35, 2003.

GRANATH JR, W. O.; CONNORS, V. A.; TARLETON, R. L. Interleukin 1 activity in haemolymph from strains of the snail *Biomphalaria glabrata* varying in susceptibility to the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*: presence, differential expression, and biological function. **Cytokine**, vol. 6, n. 1, p. 21-27, 1994.

GROUP, N. M. C. S. Insights from quantitative and mathematical modelling on the proposed WHO 2030 goal for schistosomiasis. **Gates Open Research**, vol. 3, p. 1417, 2019.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Diseases Clinics of North American**, vol. 26, n. 9541, p. 383-397, 2012.

GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS. Human schistosomiasis. **The Lancet**, vol. 368, p. 1106–1118, 2006.

GRZYCH, J. M.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.; CAULADA, Z. A.; CASPAR, P.; HEINY, S.; LEWIS, F.; SHER, A. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **The Journal of Immunology**, vol. 146, n. 4, p. 1322-1327, 1991.

HAEBERLEIN, S.; OBIEGLO, K.; OZIR-FAZALALIKHAN, A.; CHAYÉ, M. A. M.; VENINGA, H.; VAN DER VLUGT, L. E. P. M.; VOSKAMP, A.; BOON, L.; DEN HAAN, J. M. M.; WESTERHOF, L. B.; WILBERS, R. H. P.; SCHOTS, A.; SCHRAMM, G.; HOKKE, C. H.; SMITS, H. H. Schistosome egg antigens, including the glycoprotein IPSE/alpha-1, trigger the development of regulatory B cells. **PLoS Pathogens**, vol. 13, p. e1006539, 2017.

HAHN, U. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Involvement of nitric oxide in killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Parasitology**, v. 87, n. 4, p. 778-785, 2001b.

HAHN, U. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Killing of *Schistosoma mansoni* sporocysts by hemocytes from resistant *Biomphalaria glabrata*: role of reactive oxygen species. **Journal of Parasitology**, vol. 87, n. 2, p. 292-299, 2001a.

HAHN, U. K.; BENDER, R. C.; BAYNE, C. J. Production of reactive oxygen species by hemocytes of *Biomphalaria glabrata*: carbohydrate-specific stimulation. **Developmental & Comparative Immunology**, vol. 24, n. 6-7, p. 531-541, 2000.

HAMBROOK, J. R.; GHARAMAH, A. A.; PILA, E. A.; HUSSEIN, S.; HANINGTON, P. C. *Biomphalaria glabrata* Granulin Increases Resistance to *Schistosoma mansoni* Infection in Several *Biomphalaria* Species and Induces the Production of Reactive Oxygen Species by Haemocytes. **Genes**, vol. 11, n. 1, p. 38, 2020.

HAMBROOK, J. R.; HANINGTON, P. C. Immune Evasion Strategies of Schistosomes. **Frontiers in Immunology**, vol. 11, p. 624178, 2021.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? **Frontiers in Immunology**, vol. 4, n. 89, p. 1-8, 2013.

HANELT, B.; MWANGI, L. N.; KINUTHIA, J. M.; MAINA, G. M.; AGOLA, L. E.; MUTUKU, M. W.; STEINAUER, M. L.; AGWANDA, B. R.; KIGO, L.; MUNGAI, B. N.; LOKER, E. S.; MKOJI, G. M. Schistosomes of small mammals from the Lake Victoria Basin, Kenya: new species, familiar species, and implications for schistosomiasis control. **Parasitology**, vol., n. 7, 137, p. 1109-118, 2010.

HANINGTON, P. C.; FORYS, M. A.; DRAGOO, J. W.; ZHANG, S. M.; ADEMA, C. M.; LOKER, E. S. Role for a somatically diversified lectin in resistance of an invertebrate to parasite infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 107, n. 49, p. 21087-21092, 2010.

HANINGTON, P. C.; FORYS, M. A.; LOKER, E. S. A somatically diversified defense factor, FREP3, is a determinant of snail resistance to schistosome infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 6, n. 3, p. e1591, 2012.

HANINGTON, P. C.; ZHANG, S. M. The primary role of fibrinogen-related proteins in invertebrates is defense, not coagulation. **Journal of Innate Immunity**, vol. 3, n. 1, p. 17-27, 2011.

HARIZI, H.; JUZAN, M.; PITARD, V.; MOREAU, J. F.; GUALDE, N. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin E2 enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. **The Journal of Immunology**, vol. 168, n. 5, p. 2255-2263, 2002.

HE, Y. X.; SALAFSKY, B.; RAMASWAMY, K. Host-parasite relationships of *Schistosoma japonicum* in mammalian hosts. **Trends in parasitology**, vol. 17, n. 7, p. 320-324, 2001.

HERBERT, D. R.; HOLSCHER, C.; MOHRS, M.; ARENDSE, B.; SCHWEGMANN, A.; RADWANSKA, M.; LEETO, M.; KIRSCH, R.; HALL, P.; MOSSMANN, H.; CLAUSSEN, B.; FÖRSTER, I.; BROMBACHER, F. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology. **Immunity**, vol. 20, n. 5, p. 623-635, 2004.

HERTEL, L. A.; ADEMA, C. M.; LOKER, E. S. Differential expression of FREP genes in two strains of *Biomphalaria glabrata* following exposure to the digenetic Trematodes *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei*. **Developmental & Comparative Immunology**, vol. 29, n. 4, p. 295-303, 2005.

HERVE, M.; ANGELI, V.; PINZAR, E.; WINTJENS, R.; FAVEEUW, C.; NARUMIYA, S.; CAPRON, A.; URADE, Y.; CAPRON, M.; RIVEAU, G.; TROTTEIN, F. Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. **European Journal of Immunology**, vol. 33, n. 10, p. 2764-2772, 2003.

HESSE, M.; MODOLELL, M.; LA FLAMME, A. C.; SCHITO, M.; FUENTES, J. M.; CHEEVER, A. W.; PEARCE, E. J.; WYNN, T. A. 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. **The Journal of Immunology**, vol. 167, n. 11, p. 6533-6544, 2001.

HESSE, M.; PICCIRILLO, C. A.; BELKAID, Y.; PRUFER, J.; MENTINK-KANE, M.; LEUSINK, M.; CHEEVER, A. W.; SHEVACH, E. M.; WYNN, T. A. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **The Journal of Immunology**, vol. 172, n. 5, p. 3157-3166, 2004.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. The Sedimentation-Concentration Method in Schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico Health Sciences Journal**, vol. 9, p. 283-291, 1934.

HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **Journal of Immunology**, vol. 164, p. 6.406-6.416, 2000.

HOGG, K. G.; KUMKATE, S.; ANDERSON, S.; MOUNTFORD, A. P. Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c+ and F4/80+ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infection and Immunity**, vol. 71, n. 6, p. 3563-3571, 2003.

HOGG, K. G.; KUMKATE, S.; MOUNTFORD, A. P. IL-10 regulates early IL-12-mediated immune responses induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. **International Immunology**, vol. 15, n. 12, p. 1451-1459, 2003.

HOTEZ, P. J... et al. The Global Burden of Disease Study 2010: interpretation and implications for the neglected tropical diseases. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 8, n. 7, p. e2865, 2014.

HUMPHRIES, J. E.; YOSHINO, T. P. Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*. **Developmental & Comparative Immunology**, vol. 32, n. 5, p. 554-562, 2008.

HUMPHRIES, J.E.; DENECKER, L.E. Characterization of a Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in *Biomphalaria glabrata* and its potential regulation by NF-kappaB. **Developmental & Comparative Immunology**, vol. 86, p. 118-129, 2018.

HUYSE, T.; VAN DEN BROECK, F.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A.; POLMAN, K. Hybridisation between the two major African schistosome species of humans. **International Journal for Parasitology**, vol. 43, n. 8, p. 687-689, 2013.

HUYSE, T.; WEBSTER, B. L.; GELDOF, S.; STOTHARD, J. R.; DIAW, O. T.; POLMAN, K.; ROLLINSON, D. Bidirectional introgressive hybridization between a cattle and human schistosome species. **PLoS Pathogens**, vol. 5, n. 9, p. e1000571, 2009.

ICHIKAWA-SEKI, M.; PENG, M.; HAYASHI, K.; SHORIKI, T.; MOHANTA, U. K.; SHIBAHARA, T.; ITAGAKI, T. Nuclear and mitochondrial DNA analysis reveals that hybridization between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* occurred in China. **Parasitology**, vol. 144, n. 2, p. 206-213, 2017.

INCANI, R. N.; MCLAREN, D. J. Histopathological and ultrastructural studies of cutaneous reactions elicited in naive and chronically infected mice by invading schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **International Journal for Parasitology**, vol. 14, n. 3, p. 259-276, 1984.

INGRAM, J. R.; RAFI, S. B.; EROY-REVELES, A. A.; RAY, M.; LAMBETH, L.; HSIEH, I.; RUELAS, D.; LIM, K. C.; SAKANARI, J.; CRAIK, C. S.; JACOBSON, M. P.; MCKERROW, J. H. Investigation of the proteolytic functions of an expanded cercarial elastase gene family in *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 6, p. e1589, 2012.

JARNE, P.; POINTIER, J. P.; DAVID, P. **Biosystematics of *Biomphalaria* spp. with an Emphasis on *Biomphalaria glabrata***. p. 1-32. In: TOLEDO, R.; FRIED, B. *Biomphalaria* Snails and Larval Trematodes. Springer, 2011. 141p.

JENKINS S. J.; MOUNTFORD, A. P. Dendritic cells activated with products released by schistosome larvae drive Th2-type immune responses, which can be inhibited by manipulation of CD40 co-stimulation. **Infection and Immunity**, vol. 73, n. 1, p. 395-402, 2005.

JENKINS-HOLICK, D. S.; KAUL, T. L. Schistosomiasis. **Urologic Nursing**, vol. 33, n.4, p. 163-170, 2013.

JOHNSTON, L. A.; YOSHINO, T. P. Larval *Schistosoma mansoni* excretory–secretory glycoproteins (ESPs) bind to hemocytes of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda) via surface carbohydrate binding receptors. **Journal of Parasitology**, vol. 87, n. 4, p. 786-793, 2001.

KABATEREINE, N. B.; VENNERVALD, B. J.; OUMA, J. H.; KEMIJUMBI, J.; BUTTERWORTH, A. E.; DUNNE, D. W.; FULFORD, A. J. Adult Resistance to *Schistosomiasis mansoni*: Age-Dependence to Reinfection Remains Constant in Communities with Diverse Exposure Patterns. **Parasitology**, vol. 118, p. 101–5, 1999.

KANE, C. M.; CERVI, L.; SUN, J.; MCKEE, A. S.; MASEK, K. S.; SHAPIRA, S.; HUNTER, C. A.; PEARCE, E. J. Helminth antigens modulate TLR-initiated dendritic cell activation. **The Journal of Immunology**, vol. 173, n. 12, p. 7454-7461, 2004.

KANE, R. A.; BARTLEY, J.; STOTHARD, J. R.; VERCRUYSSSE, J.; ROLLINSON. D.; SOUTHGATE, V. R. Application of single strand conformational polymorphism (SSCP) analysis with fluorescent primers for differentiation of *Schistosoma haematobium* group species. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 96, p. S235-S241, 2002.

KARLMARK, K. R.; WASMUTH, H. E.; TRAUTWEIN, C.; TACKE. F. Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease. **Expert Review of Gastroenterology & Hepatology**, vo. 2, n. 2, p. 233-242, 2008.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, vol.55, n.1, p. 38-43, 2003.

KATZ, N.; DIAS, E. P.; ARAÚJO, N.; SOUZA, C. D. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 7, n. 6, p. 381-387, 1973.

KATZ, N.; PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 33, n. 3, p. 303-308, 2000.

KATZ. N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses**. 22nd ed. Belo Horizonte: CPqRR, 2018. 76 p.

KAWAZOE, U.; PINTO, A. C. M. Importância epidemiológica de alguns animais silvestres na esquistossomose mansônica. **Revista de Saúde Pública**, vol. 17, n.5, p.345-366, 1983.

KINCAID-SMITH, J.; BOISSIER, J.; ALLIENNE, J. F.; OLEAGA, A.; DJUIKWO-TEUKENG, F.; TOULZA, E. A genome wide comparison to identify markers to differentiate the sex of larval stages of *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma bovis* and their respective hybrids. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 10, n. 11, p. e0005138, 2016.

KING, K. C.; STELKENS, R. B.; WEBSTER, J. P.; SMITH, D. F.; BROCKHURST, M. A. Hybridization in parasites: consequences for adaptive evolution, pathogenesis, and public health in a changing world. **PLoS Pathogens**, vol. 11, n. 9, p. e1005098, 2015.

KLEMENT, P.; AUGUSTINE, J. M.; DELANEY, K. H.; KLEMENT, G.; WEITZ, J. I. An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. **Laboratory Animal Science**, vol. 46, n. 3, p. 286-290, 1996.

KLOOS, H.; CORREA-OLIVEIRA, R.; dos REIS, D. C.; RODRIGUES, E. W.; MONTEIRO, L. A.; GAZZINELLI, A. The role of population movement in the epidemiology and control of schistosomiasis in Brazil: a preliminary typology of population movement. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 105, n. 4, p. 578-586, 2010.

KOHN, A.; LOPEZ-ALVAREZ, M. L.; KATZ, N. Transmission and scanning electron microscopical studies in the tegument of male *Schistosoma mansoni* after oxamniquine treatment. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, vol. 57, n. 3, p. 285-291, 1982.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V. K. IL-17 and Th17 Cells. **Annual Review of Immunology**, vol. 27, p. 485-517, 2009.

KUNTZ, R. E. Natural infection of an Egyptian gerbil with *Schistosoma mansoni*. **Proceedings of the Helminthological Society of Washington**, vol. 19, n. 2, p. 123 – 124, 1952.

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

LASSALLE, D.; TETREAU, G.; PINAUD, S.; GALINIER, R.; CRICKMORE, N.; GOURBAL, B.; DUVAL, D. Glabralysins, Potential New  $\beta$ -Pore-Forming Toxin Family Members from the Schistosomiasis Vector Snail *Biomphalaria glabrata*. **Genes**, vol. 11, n. 1, p. 65, 2020.

LATIF, B.; HEO, C. C.; RAZUIN, R.; SHAMALAA, D. V.; TAPPE, D. Autochthonous human schistosomiasis. **Malaysia Emerging Infectious Diseases Journal**, vol. 19, n. 8, p. 1340-1341, 2013.

LE GOVIC, Y.; KINCAID-SMITH, J.; ALLIENNE, J. F.; REY, O.; DE GENTILE, L.; BOISSIER, J. *Schistosoma haematobium-Schistosoma mansoni* Hybrid Parasite in Migrant Boy, France, 2017. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 25, n. 2, p. 365–367, 2019.

LE ROUX, P. L. Hybridisation of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 48, n. 3–4, 1954a.

LE ROUX, P. L. Hybridisation of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma rodhaini*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 48, p. 3-4, 1954.

LE´ONARD, P. M.; ADEMA, C. M.; ZHANG, S. M.; LOKER, E. S. Structure of two FREP genes that combine IgSF and fibrinogen domains, with comments on diversity of the FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*. **Gene**, vol. 269, n. 1-2, p. 155–165, 2001.

LEGER, E.; GARBA, A.; HAMIDOU, A. A.; WEBSTER, B. L.; PENNANCE, T.; ROLLINSON, D.; WEBSTER, J. P. Introgressed animal schistosomes *Schistosoma curassoni* and *S. bovis* naturally infecting humans. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 22, n. 12, p. 2212, 2016.

LEGER, E.; WEBSTER, J. P. Hybridizations within the Genus *Schistosoma*: implications for evolution, epidemiology and control. **Parasitology**, vol. 144, n. 1, p. 65-80, 2017.

LEHR, T.; BEUERLEIN, K.; DOENHOFF, M. J.; GREVELDING, C. G.; GEYER, R. Localization of carbohydrate determinants common to *Biomphalaria glabrata* as well as to sporocysts and miracidia of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, vol. 135, n. 8, p. 931–942, 2008.

LEHR, T.; GEYER, H.; MAASS, K.; DOENHOFF, M. J.; GEYER, R. Structural characterization of N-glycans from the freshwater snail *Biomphalaria glabrata* cross-reacting with *Schistosoma mansoni* glycoconjugates. **Glycobiology**, vol. 17, n. 1, p. 82–103, 2007.

LENZI, H. L.; JURBERG, A. D.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, J. A. **Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo**. In: Carvalho OS, COELHO, P. M. Z. & LENZI HL. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar. 1ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.

LENZI, H. L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M.; ROMANHA, W. S.; PACHECO, R. G.; RONALDO, G.; MARIANO, M.; LENZI, J. A. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 93, suppl. I, p. 141- 151, 1998.

LENZI, H. L.; LENZI, J. A.; SOBRAL, A. C. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, vol. 20, n. 3-4, p. 433-435, 1987.

LI, H.; HAMBROOK, J. R.; PILA, E. A.; GHARAMAH, A. A.; FANG, J.; WU, X.; HANINGTON, P. Coordination of humoral immune factors dictates compatibility between *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. **Elife**, vol. 9, p. e51708, 2020.

LICÁ, I. C. L., MIRANDA, G. S., RODRIGUES, J. G. M., LIRA, M. G. S., NOGUEIRA, R. A., SOUZA, N. S.; RIBEIRO, H. S.; SOUSA, A. R. F.; CARDOSO, A. S. Fauna endoparasitária em roedores *Holochilus sciureus* (Rodentia: Cricetidae), reservatório silvestre da esquistossomose no Maranhão, Brasil. **Amazonian Biota**, 8(2), 44-47, 2018.

LICHTENBERG, F.; SHER, A.; GIBBONS, N.; DOUGHTY, B. L. Eosinophil-enriched inflammatory response to schistosomula in the skin of mice immune to *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Pathology**, vol. 84, n. 3, p. 479–500, 1976.

- LIE, J. K.; HEYNEMAN, D.; JEONG, K. H. Studies on resistance in snails. 4. Induction of ventricular capsules and changes in the amebocyte-producing organ during sensitization of *Biomphalaria glabrata* snails. **The Journal of Parasitology**, vol. 62, n. 2, p. 286-291, 1976.
- LIE, K. J.; HEYNEMAN, D.; YAU, P. The origin of amebocytes in *Biomphalaria glabrata*. **The Journal of Parasitology**, vol. 61, n. 3, p. 574-576, 1975.
- LIE, K.J., JEONG, K.H., HEYNEMAN, D. Acquired resistance in snails. Induction of resistance to *Schistosoma mansoni* in *Biomphalaria glabrata*. **International Journal for Parasitology**, vol. 13, n. 3, p. 301-304, 1983.
- LIMA, M. G.; MONTRESOR, L. C.; PONTES, J.; AUGUSTO, R. D. C.; SILVA, J. P. D.; THIENGO, S. C. Compatibility polymorphism based on long-term host-parasite relationships: cross talking between *Biomphalaria glabrata* and the trematode *Schistosoma mansoni* from endemic areas in Brazil. **Frontiers in Immunology**, vol. 10, p. 328, 2019.
- LINDER E. The schistosome egg in transit. **Annals of Clinical Pathology**, v. 5, n. 3, p. 1110, 2017.
- LIRA, M. G. S.; MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G.; MENDES, N.; RANIELLY, A.; GOMES, G. C. C.; CANTANHÊDE, L. G.; SILVA-SOUZA, N. Aspectos biológicos de *Holochilus* sp., hospedeiro natural da esquistossomose. **Ciência Animal Brasileira**, vol. 17, n.1, p.143-153, 2016.
- LIU, Y.; MUNKER, S.; MÜLLENBACH, R.; WENG, H. L. IL-13 signaling in liver fibrogenesis. **Frontiers in Immunology**, vol, 3, p. 116, 2012.
- LOCKYER, A. E.; EMERY, A. M.; KANE, R. A.; WALKER, A. J.; MAYER, C. D.; MITTA, G.; COUSTAU, C.; ADEMA, C. M.; HANELT, B.; ROLLINSON, D.; NOBLE, L. R.; JONES, C. S. Early differential gene expression in haemocytes from resistant and susceptible *Biomphalaria glabrata* strains in response to *Schistosoma mansoni*. **PLoS One**, vol. 7, p. e51102, 2012.
- LOCKYER, A. E.; JONES, C. S.; NOBLE, L. R.; ROLLINSON, D. Trematodes and snails: an intimate association. **Canadian Journal of Zoology**, vol. 82, p. 251–69, 2004.
- LODES, M. J.; CONNORS, V. A.; YOSHINO, T. P. Isolation and functional characterization of snail hemocyte modulating polypeptide from primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 49, n. 1, p. 1-10, 1991.
- LODES, M. J; YOSHINO, T. P. The effect of schistosome excretory-secretory products on *Biomphalaria glabrata* hemocyte motility. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 56, n. 1, p. 75-85, 1990.
- LOKER, E. S.; BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; KRUSE, K. T. Ultrastructure of encapsulation of *Schistosoma mansoni* mother sporocysts by hemocytes of juveniles of the 10-R2 strain of *Biomphalaria glabrata*. **The Journal of Parasitology**, vol. 68, n. 1, p. 84-94, 1982.

- LOMBARDO, F. C.; PASCHE, V.; PANIC, G.; ENDRISS, Y.; KEISER, J. Life cycle maintenance and drug-sensitivity assays for early drug discovery in *Schistosoma mansoni*. **Nature Protocols**, vol. 14, n. 2, p. 461-481, 2019.
- LOUREIRO, S. A questão do social na epidemiologia e controle da esquistossomose mansônica. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 84, supl.1, p. 124-133, 1989.
- LOVERDE, P. T.; CARVALHO-QUERIOZ, C.; COOK, R. Vaccination with antioxidant enzymes confers protective immunity against challenge infection with *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 99, p. 37-43, 2004a.
- LOVERDE, P. T.; NILES, E. G.; OSMAN, A.; WU, W. *Schistosoma mansoni* male–female interactions. **Canadian Journal of Zoology**, vol. 82, n. 2, p. 357-374, 2004b.
- LOVERDE, P. T.; SHOULBERG, N.; GHERSON, J. Role of cellular and humoral components in the encapsulation response of *Biomphalaria glabrata* to *Schistosoma mansoni* sporocysts *in vitro*. **Progress in Clinical and Biological Research**, vol. 157, p. 17-29, 1984.
- LOVERDE, P.T. Schistosomiasis. In: TOLEDO R., FRIED B. (orgs.) Digenetic Trematodes. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Estados Unidos: Springer, p. 45-70, 2019.
- LU, D. B.; WANG, T. P.; RUDGE, J. W.; DONNELLY, C. A.; FANG, G. R.; WEBSTER, J. P. Contrasting reservoirs for *Schistosoma japonicum* between marshland and hilly regions in Anhui, China – a two-year longitudinal parasitological survey. **Parasitology**, vol. 137, n. 1, p. 99-110, 2010b.
- LU, D. B.; WANG, T. P.; RUDGE, J. W.; DONNELLY, C. A.; FANG, G. R.; WEBSTER, J. P. Evolution in a multi-host parasite: chronobiological circadian rhythm and population genetics of *Schistosoma japonicum* cercariae indicates contrasting definitive host reservoirs by habitat. **International Journal for Parasitology**, vol. 39, n. 14, p. 1581-1588, 2009.
- LUNA, L. G. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3rd Edition. New York: McGraw-Hill, 1968. 258p.
- LUNDY, S. K.; LUKACS, N. W. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. **Frontiers in Immunology**, vol. 4, p. 39, 2013.
- MACHADO-SILVA, J. R.; GALVÃO, C.; PRESGRAVE, O. A. F.; REY, L.; GOMES, D. C. Host-induced morphological changes of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 male worms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 89, n. 3, p. 411-416, 1994.
- MACHADO-SILVA, J. R.; NEVES, R. H.; RODRIGUES-SILVA, R. Do schistosomes grow old? A confocal laser scanning microscopy study. **Journal of Helminthology**, v. 84, n. 3, p. 305, 2010.
- MACHADO-SILVA, J. R.; SILVA, C. H. D.; PEREIRA, M. J. D. S.; OLIVEIRA, R. M. F. D.; PINTO, R. M.; GOMES, D. C. Differences in Brazilian strains of *Schistosoma mansoni* evaluated by means of morphometric analysis of cercariae of both sexes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 95, n. 6, p. 839-842, 2000.

- MACIEL, M. C. G.; FIALHO, E. M. S.; GUERRA, R. N. M.; BORGES, V. M.; KWASNIEWSKI, F. H.; NASCIMENTO, F. R. F. *Tityus serrulatus* scorpion venom improves survival and lung inflammation in lethal sepsis induced by CLP in mice. **Toxicon**, vol. 89, p. 1-8, 2014.
- MAIZELS, R. M.; YAZDANBAKHSI, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. **Nature Reviews Immunology**, vol. 3, n. 9, p. 733–743, 2003.
- MALDONADO JR, A; MACHADO E SILVA, J. R.; RODRIGUES E SILVA, R.; LENZI, H. L.; REY, L. Evaluation of the resistance to *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Cricetidae), a natural host of infection in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 36, n. 3, p. 193-198, 1994.
- MALEK, E. A. **Snail hosts of schistosomiasis and other snail-transmitted diseases in tropical America: a manual**. 1st Edition. Washington, DC: PAHO, 1985. 325 p.
- MARTINEZ, E. M.; COSTA-SILVA, M.; NEVES, R. H.; OLIVEIRA, R. M. F.; MACHADO-SILVA, J. R. Biological implications of the phenotypic plasticity in the *Schistosoma mansoni*-*Nectomys squamipes* model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol.50, n. 4, p. 229-232, 2008.
- MARTINEZ, G. J.; NURIEVA, R. I.; YANG, X. O.; DONG, C. Regulation and function of proinflammatory Th17 cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol. 1143, p. 188, 2008.
- MARTINO, A. M.; AGUILERA, M. Trophic relationships among four cricetid rodents in rice fields. **Revista de Biología Tropical**, vol. 41, n. 1, p. 131-141, 1993.
- MARTINS-LEITE, P.; GAZZINELLI, G.; ALVES-OLIVEIRA, L. F.; GAZZINELLI, A.; MALAQUIAS, L. C.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; SILVEIRA, A. M. Effect of chemotherapy with praziquantel on the production of cytokines and morbidity associated with schistosomiasis mansoni. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 52, n. 8, p. 2780-2786, 2008.
- MARTINS-SOUZA, R. L.; PEREIRA, C. A. J.; COELHO, P. M. Z.; CORRÊA, JR. A.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Differential lectin labelling of circulating hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* resistant or susceptible to *Schistosoma mansoni* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 101, Supl. I, p. 185-92, 2006.
- MARTINS-SOUZA, R. L.; PEREIRA, C. A. J.; COELHO, P. M. Z.; MARTINS-FILHO, O. A.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Flow cytometry analysis of the circulating haemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria tenagophila* following *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitology**, vol. 136, n. 1, p. 67-76, 2009.
- MARTINS-SOUZA, R. L.; PEREIRA, C. A. J.; COELHO, P. M. Z.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Silica treatment increases the susceptibility of the Cabo Frio strain of *Biomphalaria tenagophila* to *Schistosoma mansoni* infection but does not alter the natural resistance of the Taim strain. **Parasitology Research**, v. 91, n. 6, p. 500-507, 2003.

- MARTINS-SOUZA, R. L.; PEREIRA, C. A.; RODRIGUES, L.; ARAÚJO, E. S.; COELHO, P. M.; CORRÊA, A.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Participation of N-acetyl-D-glucosamine carbohydrate moieties in the recognition of *Schistosoma mansoni* sporocysts by haemocytes of *Biomphalaria tenagophila*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 106, n. 7, p. 884-891, 2011.
- MATRICON-GONDRAN, M. The site of ultrafiltration in the kidney sac of the pulmonate gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Tissue and Cell**, vol. 22, n. 6, p. 911-923, 1990.
- MAZZONI, A.; YOUNG, H. A.; SPITZER, J. H.; VISINTIN, A.; SEGAL, D. M. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. **The Journal of Clinical Investigation**, vol. 108, n. 12, p. 1865-1873, 2001.
- MBOW, M.; LARKIN, B. M.; MEURS, L.; WAMMES, L. J.; DE JONG, S. E.; LABUDA, L. A.; CAMARA, M.; SMITS, H. H.; POLMAN, K.; DIEYE, T. N.; MBOUP, S.; STADECKER, M. J.; YAZDANBAKHSI, M. T-helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis. **The Journal of Infectious Diseases**, vol. 207, n. 1, p. 186-195, 2013.
- McMANUS, D. P.; DUNNE, D. W.; SACKO, M.; UTZINGER, J.; VENNERVALD, B. J.; ZHOU, X. N. Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease primers**, vol. 4, n. 1, p. 13, 2018.
- MENTINK-KANE, M. M.; CHEEVER, A. W.; THOMPSON, R. W.; HARI, D. M.; KABATEREINE, N. B.; VENNERVALD, B. J.; OUMA, J. H.; MWATHA, J. K.; JONES, F. M.; DONALDSON, D. D.; GRUSBY, M. J.; DUNNE, D. W.; WYNN, T. A. IL-13 receptor alpha 2 down-modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 101, n. 2, p. 586-590, 2004.
- MILLER, P.; WILSON, R. A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from the lungs to the hepatic portal system. **Parasitology**, vol. 80, n. 2, p. 267-288, 1980.
- MILLER, P.; WILSON, R. A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. **Parasitology**, vol. 77, n. 3, p. 281-302, 1978.
- MIRANDA, G. S.; MIRANDA, B. S.; RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; VIEGAS-MELO, D.; SILVA-SOUZA, N. Research Note. The wild water-rats and their relevance in the context of schistosomiasis mansoni in Brazil: what we know and recommendations for further research. **Helminthologia**, vol. 54, n. 2, p. 165-169, 2017.
- MIRANDA, G. S.; RESENDE, S. D.; CARDOSO, D. T.; CAMELO, G. M. A.; SILVA, J. K. A. O.; DE CASTRO, V. N.; GEIGER, S. M.; CARNEIRO, M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Previous history of American Tegumentary Leishmaniasis alters susceptibility and immune response against *Schistosoma mansoni* infection in humans. **Frontiers in Immunology**, vol. 12, p. 630934, 2021.
- MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; GOMES, G. C. C.; SILVA-SOUZA, N. *Schistosoma mansoni* Infection in *Holochilus sciureus* Shows Sex-Related Differences in Parasitological Patterns. **Open Journal of Animal Sciences**, vol. 9, n. 2, p. 173-182, 2019.

- MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; GOMES, G. C. C.; SILVA-SOUZA, N. Monitoring positivity for *Schistosoma mansoni* in rodents *Holochilus* sp. naturally infected. **Ciência Animal Brasileira**, vol. 16, n. 3, p. 456 – 463, 2015.
- MODENA, C. M.; LIMA, W. S.; COELHO, P. M. Wild and domesticated animals as reservoirs of schistosomiasis mansoni in Brazil. **Acta Tropica**, vol. 108, n. 2-3, p. 242–244, 2008.
- MONÉ, H.; HOLTFRETER, M. C.; ALLIENNE, J. F.; MINTSA-NGUÉMA, R.; IBIKOUNLÉ, M.; BOISSIER, J.; BERRY, A.; MITTA, G.; RICHTER, J.; MOUAHID, G. Introgressive hybridizations of *Schistosoma haematobium* by *Schistosoma bovis* at the origin of the first case report of schistosomiasis in Corsica (France, Europe). **Parasitology Research**, vol. 114, n. 11, p. 4127-4133, 2015.
- MONÉ, H.; MINGUEZ, S.; IBIKOUNLÉ, M.; ALLIENNE, J. F.; MASSOUGBODJI, A.; MOUAHID, G. Natural Interactions between *S. haematobium* and *S. guineensis* in the Republic of Benin. **The Scientific World Journal**, vol. 2012, p. 1-8, 2012.
- MONÉ, Y.; GOURBAL, B.; DUVAL, D.; DU PASQUIER, L.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; MITTA, G. A large repertoire of parasite epitopes matched by a large repertoire of host immune receptors in an invertebrate host/parasite model. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 4, n. 9, p. e813, 2010.
- MONRAD, J.; PFUKENYI, D. M.; MUKARATIRWA, S.; WILLINGHAM, A. L. Epidemiological studies of *Schistosoma mattheei* infections in cattle in the highveld and lowveld communal grazing areas of Zimbabwe. **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, vol. 73, n. 3, p. 179-191, 2006.
- MOORE, D. V.; YOLLES, T. K.; MELENEY, H. E. A comparison of common laboratory animals as experimental hosts for *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Parasitology**, vol. 35, n. 2, p. 156-70, 1949.
- MORAND, S.; MANNING, S. D.; WOOLHOUSE, M. E. Parasite-host coevolution and geographic patterns of parasite infectivity and host susceptibility. **Proceedings of the Royal Society**, vol. 263, n. 1366, p. 119–128, 1996.
- MORAND, S.; POINTIER, J. P.; THÉRON, A. Population biology of *Schistosoma mansoni* in the black rat: host regulation and basic transmission rate. **International Journal for Parasitology**, vol. 29, n. 5, p. 673-684, 1999.
- MORGAN, J. A.; DEJONG, R. J.; LWAMBO, N. J.; MUNGAI, B. N., MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. First report of a natural hybrid between *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini*. **Journal of Parasitology**, vol. 89, n. 2, p. 416-418, 2003.
- MORGAN, J. A.; DEJONG, R. J.; ADEOYE, G. O.; ANSA, E. D.; BARBOSA, C. S.; BRÉMOND, P.; CESARI, I. M.; CHARBONNEL, N.; CORRÊA, L. R.; COULIBALY, G.; D'ANDREA, P. S.; DE SOUZA, C. P.; DOENHOFF, M. J.; FILE, S.; IDRIS, M. A.; INCANI, R. N.; JARNE, P.; KARANJA, D. M.; KAZIBWE, F.; KPIKPI, J.; LWAMBO, N. J.; MABAYE, A.; MAGALHÃES, L. A.; MAKUNDI, A.; MONÉ, H.; MOUAHID, G.; MUCHEMI, G. M.; MUNGAI, B. N.; SÉNE, M.; SOUTHGATE, V.; TCHUENTÉ, L. A.; THÉRON, A.; YOUSIF, F.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. Origin and diversification

of the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Molecular Ecology**, vol. 14, n. 12, p. 3889–3902, 2005.

MOUCHET, F.; THERON, A.; BRÉMOND, P.; SELLIN, E.; SELLIN, B. Pattern of cercarial emergence of *Schistosoma curassoni* from Niger and comparison with three sympatric species of schistosomes. **The Journal of parasitology**, vol. 78, n. 1, p. 61-63, 1992.

MUTUKU, M. W.; DWENI, C. K.; MWANGI, M.; KINUTHIA, J. M.; MWANGI, I. N.; MAINA, G. M.; AGOLA, L. E.; ZHANG, S. M.; MARANGA, R.; LOKER, E. S.; MKOJI, G. M. Field-derived *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria pfeifferi* in Kenya: a compatible association characterized by lack of strong local adaptation, and presence of some snails able to persistently produce cercariae for over a year. **Parasites & Vectors**, vol. 7, n. 1, p. 1-13, 2014.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; MATTOS, A. C. A.; PEREIRA, C. A. J.; MARTINS-SOUZA, R. L.; COELHO, P. M. Z. Interaction of *Schistosoma mansoni* sporocysts and hemocytes of *Biomphalaria*. **Journal of Parasitology Research**, vol. 2012, p. 1-6, 2012.

NEGRÃO-CORRÊA, D.; SOUZA, D. G.; PINHO, V.; BARSANTE, M. M.; SOUZA, A. L.; TEIXEIRA, M. M. Platelet-activating factor receptor deficiency delays elimination of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*-infected mice. **Infection and Immunity**, vol. 72, n. 2, p. 1135-1142, 2004.

NELSON, G. S. Schistosome infections as zoonoses in Africa. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 54, p. 301 – 324, 1960.

NETO, E. D.; DE SOUZA, C. P.; ROLLINSON, D.; KATZ, N.; PENA, S. D.; SIMPSON, A. J. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 57, n. 1, p. 83-88, 1993.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 13<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016. 616 p.

NEVES, R. H.; ALENCAR, A. C.; AGUILA, M. B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C. A.; MACHADO-SILVA, J. R.; GOMES, D. C. Gomes Light and confocal microscopic observations of adult *Schistosoma mansoni* from mice fed on a high-fat diet. **Journal of helminthology**, vol. 81, n. 4, p. 361, 2007.

NEVES, R. H.; PEREIRA, M. J. S.; DE OLIVEIRA, R. M. F.; GOMES, D. C.; MACHADO-SILVA, J. R. *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907: morphometric differences between adult worms from sympatric rodent and human isolates. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 93, p. 309-312, 1998.

NOGUEIRA, R. A.; LIRA, M. G. S.; MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; GOMES, G. C. C.; SILVA-SOUZA, N. Distribuição dos moluscos transmissores da esquistossomose no município endêmico de São Bento, Maranhão, Brasil. **Journal of Tropical Pathology**, vol. 45, n. 3, p. 295-304, 2016.

NORTON, A. J.; WEBSTER, J. P.; KANE, R. A.; ROLLINSON, D. Inter-specific parasite competition: mixed infections of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini* in the definitive host. **Parasitology**, vol. 135, n. 4, p. 473, 2008b.

- NORTON, A.; ROLLINSON, D.; RICHARDS, L.; WEBSTER, J. Simultaneous infection of *Schistosoma mansoni* and *S. rodhaini* in *Biomphalaria glabrata*: impact on chronobiology and cercarial behaviour. **Parasites & Vectors**, vol. 1, n. 1, p. 1-9, 2008a.
- OKANO, M.; SATOSKAR, A. R.; NISHIZAKI, K.; HARN, D. A. Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing TH2-type response. **The Journal of Immunology**, vol. 167, n. 1, p. 442-450, 2001.
- OLIVEIRA, W. J.; MAGALHÃES, F. C.; ELIAS, A. M. S.; CASTRO, V. N.; FAVERO, V.; LINDHOLZ, C. G.; OLIVEIRA, A. A.; BARBOSA, F. S.; GIL, F.; GOMES, M. A.; GRAEFF-TEIXEIRA, C.; ENK, M. J.; COELHO, P. M. Z.; CARNEIRO, M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A.; GEIGER, S. M. 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 Neglected Tropical Diseases**, vol. 12, n. 2, p. e0006232, 2018.
- OLIVEIRA, V. G.; RODRIGUES, V. F.; MOREIRA, J. M. P.; RODRIGUES, J. L.; MAGGI, L.; RESENDE, S. D.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Eosinophils participate in modulation of liver immune response and tissue damage induced by *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Cytokine**, vol. 149, p. 155701, 2022.
- OUWE-MISSI-OUKEM-BOYER, O.; PORCHET, E.; CAPRON, A.; DISSOUS, C. Characterization of immunoreactive TNF $\alpha$  molecules in the gastropod *Biomphalaria glabrata*. **Developmental & Comparative Immunology**, vol. 18, n. 3, p. 211-218, 1994.
- PARAENSE, W. L. **Fauna planorbídica do Brasil**. In: LACAZ, C. da S.; BARUZZI, R.G; SIQUEIRA, W, editors. Introdução à geografia médica do Brasil. São Paulo: Edgar Blucher e Universidade de São Paulo, p. 213-239, 1972.
- PARAENSE, W. L.; CORREA, L. R. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to a strain of *Schistosoma mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 5, p. 15-22, 1963.
- PARAENSE, W. L. Planorbidae, Lymnaeidae and Physidae of Ecuador (Mollusca: Basommatophora). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 99, n. 4, p. 357-362, 2004.
- PEARCE, E. J.; KANE, C. M.; SUN, J.; TAYLOR, J. J.; MCKEE, A. S.; CERVI, L. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunological Reviews**, vol. 201, n. 1, p. 117-126, 2004.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, vol. 2, p. 499-511, 2002.
- PEARCE, E. J.; CASPAR, P.; GRZYCH, J. M.; LEWIS, F. A.; SHER, A. Downregulation of Th1 Cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Experimental Medicine**, vol. 173, p. 159-166, 1991.
- PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. **Advances in Parasitology**, vol. 6, p. 233-290, 1968.

PELLEGRINO, J.; MACEDO, D. G. A simplified method for the concentration of cercariae. **Journal of Parasitology**, vol. 41, n. 3, p. 329-330, 1955.

PELLEGRINO, J.; MACEDO, D. G. New criterion for interpretation of the intradermal reaction in schistosomiasis. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, vol. 8, n. 3, p. 500-509, 1956.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. **Revista Brasileira Malariologia Doenças Tropicais**, vol. 8, p. 589-597, 1956.

PEREIRA, C. A.; MARTINS-SOUZA, R. L.; CORRÊA, A.; COELHO, P. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Participation of cell-free haemolymph of *Biomphalaria tenagophila* in the defence mechanism against *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Parasite Immunology**, vol. 30, n. 11-12, p. 610-19, 2008.

PETERSON, N. A.; HOKKE, C. H.; DEELDER, A. M.; YOSHINO, T. P. Glycotope analysis in miracidia and primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*: differential expression. during the miracidium-to-sporocyst transformation. **International Journal for Parasitology**, vol. 39, n. 12, p. 1331-1344, 2009.

PICOT, H. *Holochilus brasiliensis* and *Nectomys squamipes* (Rodentia, Cricetidae) natural hosts of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 87, n. 4, p. 255-260, 1992.

PILA, E. A.; GORDY, M. A.; PHILLIPS, V. K.; KABORE, A. L.; RUDKO, S. P.; HANINGTON, P. C. Endogenous growth factor stimulation of hemocyte proliferation induces resistance to *Schistosoma mansoni* challenge in the snail host. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 113, n. 19, p. 5305-5310, 2016c

PILA, E. A.; LI, H.; HAMBROOK, J. R.; WU, X.; HANINGTON, P. C. Schistosomiasis from a snail's perspective: advances in snail immunity. **Trends in Parasitology**, vol. 33, n. 11, p. 845-857, 2017.

PILA, E. A.; SULLIVAN, J. T.; WU, X. Z.; FANG, J.; RUDKO, S. P.; GORDY, M. A.; HANINGTON, P. C. Haematopoiesis in molluscs: are view of haemocyte development and function in gastropods, cephalopods and bivalves. **Developmental & Comparative Immunology**, vol. 58, p. 119-128, 2016a.

PILA, E. A.; TARRABAIN, M.; KABORE, A. L.; HANINGTON, P. C. A Novel Toll-Like Receptor (TLR) Influences Compatibility between the Gastropod *Biomphalaria glabrata*, and the Digenean Trematode *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, vol. 12, p. e1005513, 2016b.

PINAUD, S.; PORTELA, J.; DUVAL, D.; NOWACKI, F. C.; OLIVE, M. A.; ALLIENNE, J. F.; GALINIER, R.; DHEILLY, N. M.; KIEFFER-JAQUINOD, S.; MITTA, G.; THÉRON, A. A shift from cellular to humoral responses contributes to innate immune memory in the vector snail *Biomphalaria glabrata*. **PLoS Pathogens**, vol. 12, n. 1, p. e1005361, 2016.

- PINHEIRO, M. C. C.; FERREIRA, A. F.; SILVA, FILHO, J. D. D.; LIMA, M. D. S.; MARTINS-MELO, F. R.; BEZERRA, F. S. M.; SOUSA, M. S.; RAMOS, A. N. Jr. Burden of schistosomiasis-related mortality in Brazil: epidemiological patterns and spatial-temporal distribution, 2003-2018. **Tropical Medicine & International Health**, vol. 24, n. 11, p. 1395-1407, 2020.
- PITCHFORD, R. J. Observations on a possible hybrid between the two schistosomes *S. haematobium* and *S. mattheei*. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 55, n. 1, p. 44-51, 1961.
- PIVA, N.; RUBENS, P.; BARROS, P. R. Natural infection of wild and domestic animals by *Schistosoma mansoni* in Sergipe. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, vol. 18, p. 221 – 233, 1966.
- PORTELA, J.; DUVAL, D.; ROGNON, A.; GALINIER, R.; BOISSIER, J.; COUSTAU, C.; MITTA, G.; THERON, A.; GOURBAL, B. Evidence for specific genotype-dependent immune priming in the lophotrochozoan *Biomphalaria glabrata* snail. **Journal of Innate Immunity**, vol. 5, n. 3, p. 261-276, 2013.
- PORTET, A.; GALINIER, R.; PINAUD, S.; PORTELA, J.; NOWACKI, F.; GOURBAL, B.; DUVAL, D. BgTEP: an antiprotease involved in innate immune sensing in *Biomphalaria glabrata*. **Frontiers in Immunology**, vol. 9, p. 1206, 2018.
- PUNNONEN, J.; CARBALLIDO, J. M.; AVERSA, G.; DE VRIES, J. E. **Interleukin 13 and its receptor**. In: DELVES, P. J.; ROITT, I. M.; (orgs). Encyclopedia of Immunology. 2nd Edition. San Diego, CA: Publisher is Academic Press, p. 1489–1492, 1998.
- RABELLO, A. Acute human schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 90, n. 2, p. 277-280, 1995.
- RAGHEB, S.; BOROS, D. L. Characterization of granuloma T lymphocyte function from *Schistosoma mansoni*-infected mice. **The Journal of Immunology**, vol. 142, n. 9, p. 3239-3246, 1989.
- RAMASWAMY, K.; KUMAR, P.; HE, Y. X. A role for parasite-induced PGE2 in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Immunology**, vol. 165, n. 8, p. 4567-4574, 2000.
- REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. **Clinical Biochemistry**, vol. 29, n. 3, p. 225-229, 1996.
- REIMAN, R. M.; THOMPSON, R. W.; FENG, C. G.; HARI, D.; KNIGHT, R.; CHEEVER, A.; W.; ROSENBERG, H. F.; WYNN, T. A. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. **Infection and immunity**, vol. 74, n. 3, p. 1471-1479, 2006.
- REY, L. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis transmission in Brazil. **Research and Reviews in Parasitology**, vol. 53, n. 1-2, p. 13-25, 1993.

REY, O.; TOULZA, E.; CHAPARRO, C.; ALLIENNE, J. F.; KINCAID-SMITH, J.; MATHIEU-BEGNÉ, E.; ALLAN, F.; ROLLINSON, D.; WEBSTER, B.L.; BOISSIER, J. Diverging patterns of introgression from *Schistosoma bovis* across *S. haematobium* African lineages. **PLoS Pathogens**, vol. 17, n. 2, p. e1009313, 2021.

ROBINSON, D. S.; O'GARRA, A. Further checkpoints in Th1 development. **Immunity**, vol. 16, n. 6, p. 755-758, 2002.

RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; GOMES, G. C. C.; LICÁ, I. C. L.; VIEGAS-MELO, D., TELES-REIS, A.; MIRANDA, G.; SILVA-SOUZA, N. Effectiveness of a handmade shell-based substrate for the breeding of *Biomphalaria glabrata* under laboratory conditions. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 62, 2020.

RODRIGUES, J. P. F.; CALDAS, I. S.; GONÇALVES, R. V.; ALMEIDA, L. A.; SOUZA, R. L. M.; NOVAES, R. D. *S. mansoni*-*T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. **Nitric Oxide**, vol. 66, p. 43-52, 2017.

ROGER, E.; GOURBAL, B.; GRUNAU, C.; PIERCE, R. J.; GALINIER, R.; MITTA, G. Expression analysis of highly polymorphic mucin proteins (SmPoMuc) from the parasite *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 157, n. 2, p. 217-227, 2008.

ROGER, E.; MITTA, G.; MONE, Y.; BOUCHUT, A.; ROGNON, A.; GRUNAU, C.; BOISSIER, J.; THERON, A.; GOURBAL, B. E. Molecular determinants of compatibility polymorphism in the *Biomphalaria glabrata*/*Schistosoma mansoni* model: new candidates identified by a global comparative proteomics approach. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 157, n. 2, p. 205-216, 2008.

ROGERS, S. H.; BUEDING, E. Hycanthone resistance: development in *Schistosoma mansoni*. **Science**, vol. 172, n. 3987, p. 1057-1058, 1971.

ROLLEMBERG, C.V. V.; SANTOS, C. M. B.; SILVA, M. M. B. L.; SOUZA, A. M. B.; SILVA, A. M.; ALMEIDA, J. A. P.; ALMEIDA, R. P.; RIBEIRO-JESUS, A. Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helminthos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 44, n. 1, p. 91-96, 2011.

ROLLINSON, D.; SIMPSON, A. J. G. **The biology of schistosomes: From genes to latrines**. 1st Edition. London: Academic Press, Harcourt Brace Jovanovich, 1987. 472 p.

ROSA, F. M.; MARQUES, D. P.; MACIEL, E.; COUTO, J. M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A.; TELES, H. M.; SANTOS, J. B., COELHO, P. M. Breeding of *Biomphalaria tenagophila* in mass scale. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 55, n. 1, p. 39-44, 2013.

RUDGE, J. W.; WEBSTER, J. P.; LU, D. B.; WANG, T. P.; FANG, G. R.; BASÁÑEZ, M. G. Identifying host species driving transmission of schistosomiasis japonica, a multihost parasite system, in China. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 110, n. 28, p. 11457-11462, 2013.

- RUMBLEY, C. A.; SUGAYA, H.; ZEKAVAT, S. A.; EL REFAEI, M.; PERRIN, P. J.; PHILLIPS, S. M. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. **The Journal of Immunology**, vol. 162, n. 2, p. 1003-1009, 1999.
- RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. CD4 T cells producing pro-inflammatory, interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 101, p. 327-330, 2006.
- RUZICKA, T.; PRINTZ, M. P. Arachidonic acid metabolism in skin: a review. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, vol. 100, p. 121-160, 1984.
- SABIN, E. A.; KOPF, M. A.; PEARCE, E. J. *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. **The Journal of Experimental Medicine**, vol. 184, n. 5, p. 1871-1878, 1996.
- SAIMAN, Y.; FRIEDMAN, S. L. The role of chemokines in acute liver injury. **Frontiers in Physiology**, vol. 3, p. 213, 2012.
- SANDLAND, G. J.; WETHINGTON, A. R.; FOSTER, A.V.; MINCHELLA, D. J. Effects of host outcrossing on the interaction between an aquatic snail and its locally adapted parasite. **Parasitology Research**, vol. 105, p. 555–561, 2009.
- SANIN, D. E.; PRENDERGAST, C. T.; BOURKE, C. D.; MOUNTFORD, A. P. Helminth infection and commensal microbiota drive early IL-10 production in the skin by CD4<sup>+</sup> T cells that are functionally suppressive. **PLoS Pathogens**, vol. 11, e1004841, 2015.
- SARVEL, A.K.; OLIVEIRA, A.A.; SILVA, A.R.; LIMA, A.C.; KATZ, N., 2011. Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, vol. 5, n. 3, p. e990, 2011.
- SANTOS, D. V. V., SANTOS, M. A. V., & RODRIGUES, I. R. D. C. Produção de hemócitos de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* após a exposição a diferentes protocolos de infecção por *Schistosoma mansoni*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, vol. 2, n. 2, p. 33-38, 2011.
- SAUTHIER, W. O. U.; ABBA, A. M.; SAUTHIER, D. E. U. Nests of *Oligoryzomys* sp. and *Holochilus brasiliensis* (Rodentia, Cricetidae) Eastern entre Ríos Province, Argentina. **Mastozoologia Neotropical**, vol. 17, n. 1, p. 207- 211, 2010.
- SAVASSI, B.; DOBIGNY, G.; ETOUGBÉTCHÉ, J. R.; AVOCEGAN, T. T.; QUINSOU, F. T.; GAUTHIER, P.; IBIKOUNLÉ, M.; MONÉ, H.; MOUAHID, G. *Mastomys natalensis* (Smith, 1834) as a natural host for *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852) Weinland, 1858 x *Schistosoma bovis* Sonsino, 1876 introgressive hybrids. **Parasitology Research**, vol. 120, n. 5, p. 1755-1770, 2021.
- SCHALL, V.; MASSARA, C. L.; ENK, M. J.; BARROS, H. S.; MIRANDA, E. S. **Os caminhos da esquistossomose dentro do nosso corpo**. Série Esquistossomose nº 8 Parte 1. Belo Horizonte: FIOCRUZ/Instituto René Rachou, 2007.

SCHLENK, D., MARTINEZ, P. G.; LIVINGSTONE, D. R. Studies on myeloperoxidase activity in the common mussel, *Mytilus edulis* L. **Comparative Biochemistry and Physiology**, vol. 99, p. 63–68, 1991.

SCHWARTZ, C.; FALLON, P. G. *Schistosoma* “eggs-iting” the host: granuloma formation and egg excretion. **Frontiers in Immunology**, vol. 9, p. 2492, 2018.

SCHWETZ, J. On a new schistosome of wild rodents found in the Belgian Congo. *Schistosoma mansoni* var. *rodentorum* var. nov. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, vol. 47, n. 2, p. 183-6, 1953.

SCHWETZ, J. On two schistosomes of wild rodents of the Belgian Congo. *Schistosoma rodhaini* Brumpt, 1931 and *Schistosoma mansoni* var. *rodentorum* Schwetz, 1953 and their relationship to *S. mansoni* of man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 48, n. 1, p. 89-100, 1954.

SECOR, W. E. Water-based interventions for schistosomiasis control. **Pathogens and Global Health**, vol. 108, n. 5, p. 246-254, 2014.

SEKI, E.; DE MINICIS, S.; OSTERREICHER, C. H.; KLUWE, J.; OSAWA, Y.; BRENNER, D. A.; SCHWABE, R. F. TLR4 enhances TGF-beta signaling and hepatic fibrosis. **Nature Medicine**, vol. 13, n. 11, p. 1324-1332, 2007.

SHER, A.; COFFMAN, R. L.; HIENY, S.; SCOTT, P.; CHEEVER, A. W. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 87, n. 1, p. 61-65, 1990.

SHIN, M. H.; LEE, Y. A.; MIN, D. Y. Eosinophil-mediated tissue inflammatory responses in helminth infection. **The Korean Journal of Parasitology**, vol. 47, n. Suppl, p. S125, 2009.

SILVA, T. M. C.; ANDRADE, Z. A. Infecção natural de roedores silvestres pelo *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 84, n. 2, p. 227-235, 1989.

SILVA-SOUZA, N. D.; SILVA, A. P. C. D.; OLIVEIRA, R. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; PENHA-SILVA, T. A. D.; MELO, S. A.; ANDRADE, F. H. E.; SANTOS-RIBEIRO, L. S. D.; CARVALHO NETA, A. V.; ABREU-SILVA, A. L. Parasitological and histological aspects of *Holochilus sciureus* naturally infected by *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, vol. 28, n. 4, p. 769-772, 2019.

SILVA-SOUZA, N.; VASCONCELOS, S. D. Histopathology of *Holochilus brasiliensis* (Rodentia: Cricetidae) infected with *Schistosoma mansoni* (Schistosomatida: Schistosomatidae). **Journal of Tropical Pathology**, vol. 34, n. 2, p. 145-150, 2005.

SILVEIRA, A. M. S.; BETHONY, J.; GAZZINELLI, A.; KLOOS, H.; FRAGA, L. A. O.; ÁLVARES, M. C. B.; PRATA, A.; GUERRA, H. L.; LOVERDE, P. T.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, G. High level of IgG4 to *Schistosoma mansoni* egg antigens in individuals with periportal fibrosis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 66, n. 5, p. 542-549, 2002.

SILVEIRA, M. R.; NUNES, K. P.; CARA, D. C.; SOUZA, D. G.; CORRÊA, J. R. A.; TEIXEIRA MM, NEGRÃO-CORRÊA D. Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. **Infection and Immunity**, vol. 70, n. 11, p. 6263-6272, 2002.

SILVEIRA-LEMOES, D.; FERNANDES COSTA-SILVA, M.; CARDOSO DE OLIVEIRA SILVEIRA, A.; AZEVEDO BATISTA, M.; ALVES OLIVEIRA-FRAGA, L.; SOARES SILVEIRA, A. M.; BARBOSA ALVAREZ, M. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. Cytokine pattern of T lymphocytes in acute schistosomiasis mansoni patients following treated praziquantel therapy. **Journal of Parasitology Research**, vol. 2013, n. 1-13, 2013.

SIQUEIRA--BATISTA, R. RAMOS JÚNIOR, A. N.; FARINAZZO, R. J. M. et al. O *Schistosoma mansoni*. In: HUGGINS, D. W.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; MEDEIROS, L. B. et al, (editores). *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr; 1998. p. 26-32.

SIRE, C.; DURAND, P.; POINTIER, J. P.; THÉRON, A. Genetic diversity and recruitment pattern of *Schistosoma mansoni* in a *Biomphalaria glabrata* snail population: a field study using random-amplified polymorphic DNA markers. **The Journal of Parasitology**, vol. 85, n.3, p. 436-441, 1999.

SIRE, C.; ROGNON, A.; THERON, A. Failure of *Schistosoma mansoni* to reinfect *Biomphalaria glabrata* snails: acquired humoral resistance or intra-specific larval antagonism? **Parasitology**, vol. 117, n. 2, p. 117-122, 1998.

SKELLY, P. J.; DA'DARA, A. A.; LI, X. H.; CASTRO-BORGES, W.; WILSON, R. A. Schistosome feeding and regurgitation. **PLoS Pathogens**, vol. 10, p. e1004246, 2014.  
SKELLY, P. J.; WILSON, R. A. Making sense of the schistosome surface. **Advances in Parasitology**, vol. 63, p. 185-284, 2006.

SOUZA, C. P. F.; VITORINO, R. R.; COSTA, A. P.; FARIA-JUNIOR, F. C.; SANTANA, L. A.; GOMES, A. P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, vol. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

SOUZA, S.; ANDRADE, Z. A. On the origin of the *Biomphalaria glabrata* hemocytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 101, n. 1, p. 213-218, 2006.

SOUZA, V. A. M.; SILVA, R. R.; MALDONADO, Jr. A.; SILVA, J. R. M.; REY, L. *Nectomys squamipes* (Rodentia - Cricetidae) as an experimental model for schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 87, suppl.1, p. 277-280, 1992.

STADECKER, M. J.; HERNANDEZ, H. J. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. **Parasite Immunology**, vol. 20, n. 5, p. 217-221, 1998.

STANDEN, O. D. Experimental infection of *Australorbis glabratus* with *S. mansoni*. I - Individual and mass infection to temperature and season. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 46, p. 48-53, 1952.

STANDLEY, C. J.; MUGISHA, L.; VERWEIJ, J. J.; ADRIKO, M.; ARINAITWE, M.; ROWELL, C.; ATUHAIRE, A.; BETSON, M.; HOBBS, E.; VAN TULLEKEN, C. R.; KANE, R. A.; VAN LIESHOUT, L.; AJAROVA, L.; KABATEREINE, N. B.; RUSSELL STOTHARD, R. J. Confirmed infection with intestinal schistosomiasis in semi-captive wild-born chimpanzees on Ngamba Island, Uganda. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, vol. 11, n. 2, p. 169–176, 2011.

STEINAUER, M. L.; HANELT, B.; MWANGI, I. N.; MAINA, G. M.; AGOLA, L. E.; KINUTHIA, J. M.; MUTUKU, M. W.; MUNGAI, B. N.; WILSON, W. D.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. Introgressive hybridization of human and rodent schistosome parasites in western Kenya. **Molecular Ecology**, vol. 17, n. 23, p. 5062-5074, 2008.

STEINAUER, M. L.; MWANGI, I. N.; MAINA, G. M.; KINUTHIA, J. M.; MUTUKU, M. W.; AGOLA, E. L.; MUNGAI, B.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. Interactions between natural populations of human and rodent schistosomes in the Lake Victoria region of Kenya: a molecular epidemiological approach. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 2, n. 4, p. e222, 2008.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, vol. 6, n. 7, p. 411–25, 2006.

STIREWALT, M. A. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. **Advances in Parasitology**, vol. 12, p. 115-182, 1974.

STIREWALT, M. A.; COUSIN, C. E.; DORSEY, C. H. *Schistosoma mansoni*: stimulus and transformation of cercariae into schistosomules. **Experimental parasitology**, vol. 56, n. 3, p. 358-368, 1983.

STOTHARD, J. R.; WEBSTER, B. L.; WEBER, T.; NYAKAANA, S.; WEBSTER, J. P.; KAZIBWE, F.; KABATEREINE, N. B.; ROLLINSON, D. Molecular epidemiology of *Schistosoma mansoni* in Uganda: DNA barcoding reveals substantive genetic diversity within Lake Albert and Lake Victoria populations. **Parasitology**, vol. 136, n. 13, p. 1813, 2009b.

STRATH, M.; WARREN, D. J.; SANDERSON, C. J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. **Journal of Immunological Methods**, vol. 83, n. 2, p. 209-215, 1985.

SULLIVAN, J. T.; CASTRO, L. Mitotic arrest and toxicity in *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Pulmonata) exposed to colchicine. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 90, n. 1, p. 32–38, 2005.

SULLIVAN, J. T.; PIKIOS, S. S.; ALONZO, A. Q. Mitotic responses to extracts of miracidia and cercariae of *Schistosoma mansoni* in the amebocyte-producing organ of the snail intermediate host *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Parasitology**, vol. 90, n. 1, p. 92-96, 2004.

SWARTZ, J. M.; DYER, K. D.; CHEEVER, A. W.; RAMALINGAM, T.; PESNICAK, L.; DOMACHOWSKIE, J. B.; LEE, J. J.; LEE, N. A.; FOSTER, P. S.; WYNN, T. A.; ROSENBERG, H. F. **Blood**, vol. 108, n. 7, p. 2420-2427, 2006.

TETREAU, G.; PINAUD, S.; PORTET, A.; GALINIER, R.; GOURBAL, B.; DUVAL, D. Specific Pathogen Recognition by Multiple Innate Immune Sensors in an Invertebrate. **Frontiers in Immunology**, vol. 8, p. 1249, 2017.

THÉRON, A. Early and late shedding patterns of *Schistosoma mansoni* cercarie: ecological significance in transmission to human and murine hosts. **The Journal of Parasitology**, vol. 70, p. 652-655, 1984.

THÉRON, A.; PAGES, J.R.; ROGNON, A. *Schistosoma mansoni*: distribution patterns of miracidia among *Biomphalaria glabrata* snail as related to host susceptibility and sporocyst regulatory processes. **Experimental parasitology**, vol. 85, p. 1-9, 1997.

THÉRON, A.; POINTER, J.P.; MORAND, S.; IMBERT-ESTABLET, D.; BOREL, G. Long-term dynamics of natural populations of *Schistosoma mansoni* among *Rattus rattus* in patchy environment. **Parasitology**, vol.104, p. 291-298, 1992.

THÉRON, A.; POINTIER, J. P. Recherche des facteurs susceptibles démpêcher la réalisation du cycle de *Schistosoma mansoni* dans les mares de la Grand Terre de Guadeloupe. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**, vol. 60, p. 155-164, 1985.

THÉRON, A.; ROGNON, A.; GOURBAL, B.; MITTA, G. Multi-parasite host susceptibility and multi-host parasite infectivity: a new approach of the *Biomphalaria glabrata/Schistosoma mansoni* compatibility polymorphism. **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 26, p. 80-88, 2014.

TORREILLES, J.; M.-C. GUERIN, AND P. ROCH. 1997. Peroxidase-release associated with phagocytosis in *Mytilus galloprovincialis* haemocytes. **Developmental & Comparative Immunology**, vol. 21, n. 3, p. 267-275, 1997.

TORRES, E. J. L.; NASCIMENTO, A. P. F.; MENEZES, A. O.; GARCIA, J.; DOS SANTOS, M. A. J.; MALDONADO, A.; MIRANDA, K.; LANFREDI, R. M.; SOUZA, W. DE. A new species of *Trichuris* from *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae) in Brazil: morphological and histological studies. **Veterinary Parasitology**, vol. 176, n. 2-3, p. 226-235, 2011.

TSIKAS, D. 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 area of research. **Journal of Chromatography B**, vol. 851, n. 1-2, p. 51-70, 2007.

TWICE, G. I. Notes on *Holochilus sciureus* in British Guiana. **Journal of Mammalogy**, vol. 43, n. 3, p. 369-374, 1962.

UTZINGER, J.; N'GORAN, E.K.; Caffrey, C.R.; KEISER, J., 2011. From innovation to application: social-ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Tropica**, vol. 120, n. 1, p. S121-S137, 2011.

- VALADARES, T. E.; COELHO, P. M.; PELLEGRINO, J.; SAMPAIO, I. B. *Schistosoma mansoni*: comparison of oviposition of the LE (Belo Horizonte), SP (São Paulo) and ST (Liberia) strains in mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, vol. 23, n. 1, p. 1-5, 1981.
- VAN DER KLEIJ, D.; LATZ, E.; BROUWERS, J. F.; KRUIZE, Y. C.; SCHMITZ, M.; KURT-JONES, E. A.; ESPEVIK, T.; DE JONG, E. C., KAPSENBERG, M. L.; GOLENBOCK, D. T.; TIELENS, A. G.; YAZDANBAKHS, M. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 277, n. 50, p. 48122-48129, 2002.
- VAN DER KNAAP, W. P. W.; LOKER ES. Immune mechanisms in trematod–snail interactions. **Parasitology Today**, vol. 6, n. 6, p. 175-182, 1990.
- VAN DER WERF, M. J.; de VLAS, S. J.; BROOKER, S.; LOOMAN, C. W.; NAGELKERKE, N. J.; HABBEMA, J. D.; ENGELS, D. Habbema and Dirk Engels. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. **Acta Tropica**, vol. 89, n. 2-3, p. 125-139, 2003.
- VEIGA-BORGEAUD, T.; LEMOS-NETO, R. C.; PETER, F.; BASTOS, O. de C. Constatações sobre a importância dos roedores silvestres (*Holochilus brasiliensis nanus*. Thomas, 1981) na epidemiologia da esquistossomose própria da Pré-Amazônia. **Caderno de Pesquisa**, vol. 2, n. 1, p. 86 – 99, 1986.
- VELUPILLAI, P.; HARN, D. A. Oligosaccharide-specific induction of interleukin 10 production by B220+ cells from schistosome-infected mice: a mechanism for regulation of CD4+ T-cell subsets. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 91, n. 1, p. 18-22, 1994.
- WALDSCHMIDT, A. M.; SALOMÃO, T. M. F.; BARROS, E. G.; CAMPOS, L. A. O. Extraction of genomic DNA from *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera: Apidae, Meliponinae). **Brazilian Journal of Genetics**, vol. 20, n. 3, 1997.
- WANG, B.; LIANG, S.; WANG, Y.; ZHU, X. Q.; GONG, W.; ZHANG, H. Q.; LI, Y.; XIA, C. M. Th17 Down-regulation Is Involved in Reduced Progression of Schistosomiasis Fibrosis in ICOSL KO Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 9, n. 1, p. e0003434, 2015.
- WARMINGTON, K. S.; BORING, L.; RUTH, J. H.; SONSTEIN, J.; HOGABOAM, C. M.; CURTIS, J. L.; KUNKEL, S. L.; CHARO, I. R.; CHENSUE, S. W. Effect of C-C chemokine receptor 2 (CCR2) knockout on type-2 (schistosomal antigen-elicited) pulmonary granuloma formation: analysis of cellular recruitment and cytokine responses. **The American Journal of Pathology**, vol. 154, n. 5, p. 1407-1416, 1999.
- WARREN, K. S. The secret of the immunopathogenesis of schistosomiasis: in vivo models. **Immunological Reviews**, vol. 61, p. 189-213, 1982.
- WEBSTER, B. L., DIAW, O. T., SEYE, M. M., WEBSTER, J. P. AND ROLLINSON, D. Introgressive hybridization of *Schistosoma haematobium* group species in Senegal: species barrier break down between ruminant and human schistosomes. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 7, n. 4, p. e2110, 2013b.

WEBSTER, B. L.; ALHARBI, M. H.; KAYUNI, S.; MAKAULA, P.; HALSTEAD, F.; CHRISTIANSEN, R.; JUZIWELO, L.; STANTON, M. C.; LACOURSE, E. J.; ROLLINSON, D.; KALUA, K.; STOTHARD, J. R. Schistosome Interactions within the *Schistosoma haematobium* Group, Malawi. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 25, n. 6, p. 1245-1247, 2019.

WEBSTER, B. L.; SOUTHGATE, V. R.; TCHUEM TCHUENTÉ, L. A. Mating interactions between *Schistosoma haematobium* and *S. mansoni*. **Journal of helminthology**, vol. 73, n. 4, p. 351-356, 1999.

WEBSTER, B. L.; TCHUENTÉ, L. T.; JOURDANE, J.; SOUTHGATE, V. R. The interaction of *Schistosoma haematobium* and *S. guineensis* in Cameroon. **Journal of Helminthology**, vol. 79, n. 3, p. 193, 2005.

WEBSTER, B. L.; WEBSTER, J. P.; GOUVRAS, A. N.; GARBA, A.; LAMINE, M. S.; DIAW, O. T.; SEYE, M. M.; TCHUEM TCHUENTÉ, L. A.; SIMOONGA, C.; MUBILA, L.; MWANGA, J. R.; LWAMBO, N. J.; KABATEREINE, N. B.; LANGE, C. N.; KARIUKI, C.; MKOJI, G. M.; ROLLINSON, D.; STOTHARD, J. R. DNA 'barcoding' of *Schistosoma mansoni* across sub-Saharan Africa supports substantial within locality diversity and geographical separation of genotypes. **Acta Tropica**, vol. 128, n. 2, p. 250–260, 2013a.

WEBSTER, J. P.; NEVES, M. I.; WEBSTER, B. L.; PENNANCE, T.; RABONE, M.; GOUVRAS, A. N.; ALLAN, F.; WALKER, M.; ROLLINSON, D. Parasite Population Genetic Contributions to the Schistosomiasis Consortium for Operational Research and Evaluation within Sub-Saharan Africa. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 103, p. 80-91, 2020.

WEERAKOON, K. G. A. D.; GOBERT, G. N.; CAI, P.; McMANUS, D. P. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. **Clinical microbiology reviews**, vol. 28, n. 4, p. 939–967, 2015.

WEINSTOCK, J. V.; BOROS, D. L. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with *Schistosomiasis mansoni*. **The Journal of Immunology**, vol. 130, n. 1, p. 418-422, 1983.

WEIS, V. M.; SMALL, A. L.; MCFALL-NGAI, M. J. A peroxidase related to the mammalian antimicrobial protein myeloperoxidase in the *Euprymna–Vibrio* mutualism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 93, n. 24, p. 13683-13688, 1996.

WHEATER, P. R.; WILSON, R. A. *Schistosoma mansoni*: a histological study of migration in the laboratory mouse. **Parasitology**, vol. 79, n. 1, p. 49-62, 1979.

WHITFIELD, P. J.; BARTLETT, A.; KHAMMO, N.; BRAIN, A. P.; BROWN, M. B.; MARRIOTT, C.; CLOTHIER, R. Delayed tail loss during the invasion of human skin by schistosome cercariae. **Parasitology**, vol. 126, p. 135-140, 2003.

WHO, World Health Organization. **Investing to overcome the Global Impact of Neglected Tropical Diseases**. Geneva, 2015. 191 p.

WHO, World Health Organization. **Schistosomiasis: population requiring preventive chemotherapy and number of people treated in 2010**. Weekly Epidemiological Record, vol. 87, p. 37–44, 2012.

WILSON, M. S.; MENTIK-KANE, M. M.; PESCE, J. T.; RAMALINGAN, T. R.; THOMPSON, R.; WYNN, T. A. Immunopatology of schistosomiasis. **Immunology & Cell Biology**, vol. 85, p. 148-154, 2007.

WINZLER, C.; ROVERE, P.; RESCIGNO, M.; GRANUCCI, F.; PENNA, G.; ADORINI, L.; ZIMMERMANN, V. S.; DAVOUST, J.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. **The Journal of Experimental Medicine**, vol. 185, n. 2, p. 317-328, 1997.

WOLMARANS, C. T.; DE KOCK, K. N.; STRAUSS, H. D.; BORNMAN, M. Daily emergence of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* cercariae from naturally infected snails under field conditions. **Journal of Helminthology**, vol. 76, n. 3, p. 273-277, 2002.

WRIGHT, C. A.; ROSS, G. C. Hybrids between *Schistosoma haematobium* and *S. mattheei* and their identification by isoelectric focusing of enzymes. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 74, n. 3, p. 326–332, 1980.

WU, X. J.; DINGUIRARD, N.; SABAT, G.; LUI, H. D.; GONZALEZ, L.; GEHRING, M.; BICKHAM-WRIGHT, U.; YOSHINO, T. P. Proteomic analysis of *Biomphalaria glabrata* plasma proteins with binding affinity to those expressed by early developing larval *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, vol. 13, n. 5, p. e1006081, 2017.

WU, X. J.; SABAT, G.; BROWN, J. F.; ZHANG, M.; TAFT, A.; PETERSON, N.; HARMS, A.; YOSHINO, T. P. Proteomic analysis of *Schistosoma mansoni* proteins released during in vitro miracidium-to-sporocyst transformation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, vol. 164, n. 1, p. 32-44, 2009.

WYNN, T. A.; THOMPSON, R. W.; CHEEVER, A. W.; MENTINK-KANE, M. M. Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunological Reviews**, vol. 201, p. 156–167, 2004.

ZAHOOR, Z.; DAVIES, A. J.; KIRK, R. S.; ROLLINSON, D.; WALKER, A. J. Nitric oxide production by *Biomphalaria glabrata* haemocytes: effects of *Schistosoma mansoni* ESPs and regulation through the extracellular signal-regulated kinase pathway. **Parasites & Vectors**, vol. 2, n. 1, p. 1-10, 2009.

ZELCK, U. E. Glycosidase activities in plasma of naive and schistosome-infected *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). **Parasitology**, vol. 119, n. 6, p. 563-568, 1999.

ZELCK, U. E.; BECKER, W.; BAYNE, C. J. The plasma proteins of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. **Developmental & Comparative Immunology**, vol. 19, n. 3, p. 181-194, 1995.

ZELCK, U. E.; TRIPPENSEE, G.; BECKER, W. Detection and partial characterization of glycosidases in the hemolymph of *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, vol. 114, n. 3, p. 281-286, 1996.

- ZELCK, U.; BECKER, W. Lectin binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surrounding *Biomphalaria glabrata* tissue. **Journal of Invertebrate Pathology**, vol. 55, n. 1, p. 93-99, 1990.
- ZHANG, S. M.; BUDDENBORG, S. K.; ADEMA, C. M.; SULLIVAN, J. T.; LOKER, E. S. Altered gene expression in the schistosome-transmitting snail *Biomphalaria glabrata* following exposure to niclosamide, the active ingredient in the widely used molluscicide Bayluscide. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 9, n. 10, p. e0004131, 2015.
- ZHANG, S. M.; LÉONARD, P. M.; ADEMA, C. M.; LOKER, E. S. Parasite-responsive IgSF members in the snail *Biomphalaria glabrata*: characterization of novel genes with tandemly arranged IgSF domains and a fibrinogen domain. **Immunogenetics**, vol. 53, n. 8, p. 684-694, 2001.
- ZHANG, S. M.; LOKER, E. S. The FREP gene family in the snail *Biomphalaria glabrata*: additional members, and evidence consistent with alternative splicing and FREP retrosequences. **Developmental & Comparative Immunology**, vol. 27, n. 3, p. 175-187, 2003.
- ZHANG, S. M.; LOKER, E.S. Representation of an immune responsive gene Family encoding fibrinogen-related proteins in the freshwater mollusc *Biomphalaria glabrata*, an intermediate host for *Schistosoma mansoni*. **Gene**, vol. 27, n. 341, 255-66, 2004.
- ZHANG, Y.; CHEN, L.; GAO, W.; HOU, X.; GU, Y.; GUI, L.; HUANG, D.; LIU, M.; REN, C.; WANG, S.; SHEN, J. IL-17 neutralization significantly ameliorates hepatic granulomatous inflammation and liver damage in *Schistosoma japonicum* infected mice. **European Journal of Immunology**, vol. 42, n. 6, p. 1523-1535, 2012.
- ZHOU, X. N.; BERGQUIST, R.; LEONARDO, L.; YANG, G. J.; YANG, K.; SUDOMO, M.; OLVEDA, R. Schistosomiasis japonica control and research needs. **Advances in Parasitology**, vol. 72, p. 145-178, 2010.

## **ANEXOS**

## ANEXO A - Aprovação e registro da pesquisa no SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

### Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 67253-2	Data da Emissão: 29/02/2020 12:26:13	Data da Revalidação*: 01/12/2020
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

#### Dados do titular

Nome: Guilherme Silva Miranda	CPF: 600.417.883-70
Título do Projeto: Manutenção e isolamento de uma linhagem silvestre de Schistosoma mansoni em laboratório	
Nome da Instituição: IFMA CAMPUS SÃO RAIMUNDO DAS MANGABEIRAS	CNPJ: 10.735.145/0016-70

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de animais em campo e manutenção do ciclo silvestre de S. mansoni em laboratório	01/2019	03/2023

**ANEXO B – Aprovação e registro da pesquisa no SISGEN**

**Ministério do Meio Ambiente**  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**  
**SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO**

**Certidão**  
**Cadastro nº AB9E2EC**

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **AB9E2EC**  
Usuário: **IFMA**  
CPF/CNPJ: **10.735.145/0001-94**  
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**  
Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

**Espécie****Holochilus sciureus****Biomphalaria glabrata****Schistosoma mansoni****Título da Atividade: Caracterização de um isolado silvestre de Schistosoma mansoni**

## ANEXO C – Aprovação da pesquisa no Conselho de Ética Animal



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Caracterização morfológica, molecular e imunopatológica de um isolado silvestre de *Schistosoma mansoni* obtido de *Holochilus sciureus*", protocolo do CEUA: 46/2019 sob a responsabilidade de Deborah Aparecida Negrao Correa que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 08/04/2019.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A. Produção científica durante o doutorado (2018–2022)

### Artigos derivados da tese:

1) MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; SILVA, J. K. A. O.; CAMELO, G. M. A.; SILVA-SOUZA, N.; NEVES, R. H.; MACHADO-SILVA, J. R.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A. Wild rodents with natural *Schistosoma mansoni* infection: the current neglected status and new challenges for the control of schistosomiasis (2022)

(Submetido para publicação na revista **Acta Tropica**).

2) MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; RESENDE, S. D.; CAMELO, G. M. A.; SILVA, J. K. A. O.; REIS, J. C. S.; SILVA-SOUZA, N.; PEREIRA, F. B.; FURTADO, L. F. V.; RABELO, E. M. L.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A. From field to laboratory: isolation, genetic assessment and parasitological behavior of *Schistosoma mansoni* obtained from naturally infected wild rodent *Holochilus sciureus* (Rodentia, Cricetidae), collected in Northeastern of Brazil (2022).

(Submetido para publicação na revista **Parasitology Research**).

3) MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; REZENDE, M. C.; RESENDE, S. D.; CAMELO, G. M. A.; SILVA, J. K. A. O.; MAGGI, L.; RODRIGUES, V. F.; OLIVEIRA, V. G.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A. Experimental infection with *Schistosoma mansoni* isolated from the wild rodent *Holochilus sciureus* shows a low parasite burden but induces high schistosomiasis severity in BALB/c mice. **Parasitology**. Jun 1:1-55, 2022. doi: 10.1017/S0031182022000774.

(Publicado na revista **Parasitology**).

### Artigos como primeiro autor:

1) MIRANDA, G. S.; RESENDE, S. D.; CARDOSO, D.T.; CAMELO, G. M. A.; SILVA, J. K. A. O.; DE CASTRO, V. N.; GEIGER, S. M.; CARNEIRO, M.; NEGRÃO-CORRÊA, D. Previous history of American Tegumentary Leishmaniasis alters susceptibility and immune response against *Schistosoma mansoni* infection in humans. **Frontiers in Immunology**, v. 12, p. 638, 2021.

2) MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; GOMES, G. C. C.; SILVA-SOUZA, N. *Schistosoma mansoni* infection in *Holochilus sciureus* shows sex-related differences in parasitological patterns. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 09, p. 173-182, 2019.

### Artigos como autor correspondente:

1) RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; GOMES, G. C. C.; LICÁ, I. C. L.; SILVA, J. K. A. O.; MIRANDA, G. S.; SILVA-SOUZA, N. Alterations in blood glucose concentration in wild rodents, *Holochilus sciureus*, naturally infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, p. e021921, 2022.

2) DOS REIS, A. T.; DO CARMO SILVA, C. F.; SOARES, R. F. S.; CARDOSO, D. T.; RODRIGUES, J. G. M.; NOGUEIRA, R. A.; MIRANDA, G. S.; SILVA-SOUZA, N. A preliminary study on the distribution of breeding sites of *Biomphalaria glabrata* in the municipality of Peri Mirim,

a low endemicity area for schistosomiasis in Northeast Brazil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 50, p. 1-10, 2021.

3) NOLETO, J. V. O.; MORAES, H. L. M. N.; LIMA T. M.; RODRIGUES, J. G. M.; TAVARES, D. T.; LIMA, K. C.; MELO, R. S. S.; MIRANDA, G. S. Use of ovitraps for the seasonal and spatial monitoring of *Aedes* spp. in an area endemic for arboviruses in Northeast Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 14, p. 387-393, 2020.

4) MORAIS, H. L. M. N.; FEITOSA, T. C.; RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA R. A.; LUZ, T. R. S. A.; SILVA-SOUZA, N.; LIMA, N. M.; ANDRADE, T. J. A. D. S.; MIRANDA, G. S. Hydroalcoholic extract of *Caryocar brasiliense* Cambess. leaves affect the development of *Aedes aegypti* mosquitoes. **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1-7, 2020.

5) RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; GOMES, G. C. C.; LICÁ, I. C. L.; VIEGAS-MELO, D.; TELES-REIS, A.; MIRANDA, G. S.; SILVA-SOUZA, N. Effectiveness of a handmade shell-based substrate for the breeding of *Biomphalaria glabrata* under laboratory conditions. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 62, p. 1-6, 2020.

6) Alves, R. R. S.; RODRIGUES, J. G. M.; TELES-REIS, A.; NOGUEIRA, R. A.; LICÁ, I. C. L.; LIRA, M. G. S.; ALVES, R. D. S.; SILVA-SOUZA, N.; ANDRADE, T. D. J. A. D.; MIRANDA, G. S. M. Antiparasitic effects of ethanolic extracts of *Piper arboreum* and *Jatropha gossypifolia* leaves on cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 147, n.14, p. 1689-1699, 2020.

7) DO CARMO-SILVA, C. F.; TELES-REIS, A.; SILVA-SOARES, R. F.; RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; VIEGAS-MELO, D.; CARDOSO, D. T.; MIRANDA, G. S.; SILVA-SOUZA N Spatial and Seasonal Distribution of *Holochilus sciureus* with *Schistosoma mansoni* Infection in an Endemic Area for Schistosomiasis in Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 64, n. 4, p. 932-937, 2019.

### **Artigos como colaborador:**

1) MEDEIROS, C. D. S.; FURTADO, L. F. V.; MIRANDA, G. S.; DA SILVA, V. J.; DOS SANTOS, T. R.; RABELO, É. M. L. Moving beyond the state of the art of understanding resistance mechanisms in hookworms: confirming old and suggesting new associated SNPs. **Acta Tropica**, vol. 233, p. 106533, 2022.

2) GOMES, D. S.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A.; MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; GUEDES, T. J. F. L.; DE LUCCA JUNIOR, W.; SÁ FILHO, J. C. F.; NIZIO, D. A. C.; BLANK, A. F.; FEITOSA V. L. C.; DOLABELLA, S. S. *Lippia alba* and *Lippia gracilis* essential oils affect the viability and oviposition of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v. x, p. 106434, 2022.

3) RODRIGUES, J. G. M.; ALBUQUERQUE, P. S. V.; NASCIMENTO, J. R.; CAMPOS, J. A. V.; GODINHO, A. S. S.; ARAÚJO, S. J.; BRITO, J. M.; JESUS, C. M.; MIRANDA, G. S.; REZENDE, M. C.; NEGRÃO-CORRÊA, D. A.; ROCHA, C. Q.; SILVA, L. A.; GUERRA, R. N. M.; NASCIMENTO, F. R. F. The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113287, p. 113287, 2020.

4) FURTADO, L. F. V.; MEDEIROS, C. D. S.; ZUCCHERATO, L. W.; ALVES, W. P.; DE OLIVEIRA, V. N. G. M.; DA SILVA, V. J.; MIRANDA, G. S.; FUJIWARA, R. T.; RABELO, É. M.

L. First identification of the benzimidazole resistance-associated F200Y SNP in the beta-tubulin gene in *Ascaris lumbricoides*. **PLoS One**, v. 14, p. e0224108, 2019.

4) LICÁ, I. C. L.; MIRANDA, G. S.; RODRIGUES, J. G. M.; LIRA, M. G. S.; NOGUEIRA, R. A.; SOUZA, N. S.; RIBEIRO, H. S.; SOUSA, A. F. R.; CARDOSO, A. S. Fauna endoparasitária em roedores *Holochilus sciureus* (Rodentia: Cricetidae), reservatório silvestre da esquistossomose no Maranhão, Brasil. **Biota Amazônia**, v. 8, p. 44-47, 2018.