

Laura Liana Maggi Fernandes

Participação da ativação da via IL-33/ST2 na lesão
intestinal em camundongos infectados com
Schistosoma mansoni.

Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia
Belo Horizonte- MG, 2016.

Laura Liana Maggi Fernandes

Participação da ativação da via IL-33/ST2 na lesão
intestinal em camundongos infectados com
Schistosoma mansoni.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia.

Orientação: Dra. Deborah Aparecida Negrão-Corrêa. Depto de Parasitologia – ICB/UFMG.

Belo Horizonte - MG

2016.

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS

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

Mecanismos gerais de Infecções Fúngicas – ICB/UFMG – Prof. Dr. Ary Corrêa
Júnior

Grupo Integrado de pesquisas em biomarcadores- CPqRR-Fiocruz Minas- Prof^o.
Olindo Assis Martins Filho e Andréa Teixeira de Carvalho

Apoio:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES

Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG

*“Trabalha constantemente. Edifica sempre.
Não consintas que o gelo do desencanto te entorpeça o coração.
Não te impressiones nas dificuldades.
Convence-te de que a vitória espiritual é construção para o dia-a-dia.
Não desistas da paciência.
Não creias em realizações sem esforço ..”*

Emmanuel- Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

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

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

Aos amigos do Laboratório de Imunologia de Helmintos Jailza, Vanessa, João, Michelle, Vinícius, Fernanda, Samira, Emília que me receberam de braços abertos assim que entrei no laboratório, por todo o ensinamento, paciência, confiança, disponibilidade, imprescindível ajuda, convivências diárias, companheirismo, dedicação e principalmente pelos momentos de descontração que foram fundamentais nesta caminhada.

Aos funcionários do GIDE Zenir, Selma, Beth que proporcionaram toda a estrutura para a realização dos experimentos com muita dedicação e carinho. E agradeço principalmente ao Zé Carlos que sempre esteve pronto para me ajudar. Obrigado Zé, você foi essencial na reta final deste trabalho!!

A todos os amigos da turma maravilhosa do Mestrado, por todo companheirismo e momentos de descontração.

Ao Ary Corrêa pela disponibilidade do laboratório e aprendizado.

A Fernanda Araújo pelo carinho, disponibilidade de tempo, do laboratório, ensinamentos e auxílio com as análises hematológicas.

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

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

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

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

RESUMO

A morbidade da esquistossomose crônica tem sido associada à intensidade da reação celular induzida por antígenos liberados pelos ovos do parasito que ficam retidos nos tecidos do hospedeiro, especialmente no fígado e intestino. A formação do granuloma depende da indução da resposta Th2, que participa na eliminação dos ovos, na remodelação dos tecidos lesados e na contenção da ação lesiva dos antígenos do parasito aos tecidos do hospedeiro, mas também pode gerar fibrose e contribuir para evolução dos casos graves da doença. Tem sido demonstrado que a citocina IL-33, produzida por células endoteliais, epiteliais e fibroblastos durante a resposta imune inata, estimula a produção precoce de IL-13 e IL-5, auxiliando a diferenciação da resposta Th2, além de intensificar a formação de fibrose e a infiltração de neutrófilos. Entretanto, a participação da ativação da via IL-33/ST2 na evolução da esquistossomose intestinal não foi descrita até o momento e constitui o objetivo deste estudo. Para isso utilizamos camundongos Balb/c não deficientes e Balb/c geneticamente deficientes na expressão do receptor de IL-33, denominado ST2 (ST2^{-/-}). Os animais foram infectados subcutaneamente com *S. mansoni* e comparativamente examinados por 14 semanas para avaliar taxa de mortalidade, carga parasitária, alterações imunológicas e a morbidade (lesões intestinais, peso corporal, parâmetros hematológicos e nutricionais). Os dados indicam que camundongos ST2^{-/-} infectados por *S. mansoni* apresentaram aumento da taxa de mortalidade comparado aos WT. A esquistossomose mais grave não foi associada à carga parasitária ou translocação bactéria e sepse. Em ambos os grupos experimentais a esquistossomose também induziu anemia, especialmente na fase aguda. Entretanto, na ausência do receptor ST2, camundongos com esquistossomose aguda apresentaram redução do número de plaquetas e não foi observado aumento de leucócitos circulantes. No intestino, a ausência da ativação da via IL-33/ST2 resultou em aumento da retenção de ovos do parasito e redução significativa da concentração de citocinas IL-17 e Th2, e, conseqüentemente, menor infiltração de neutrófilos e eosinófilos nos granulomas de fase aguda. Esta alteração inicial resultou em granulomas intestinais de fase crônica com intenso infiltrado celular, menor atividade de arginase-1 e desorganização da deposição de matriz extracelular, que sugere uma diferenciação inadequada de macrófago alternativamente ativado. Camundongos ST2^{-/-} infectados também mostraram maior frequência de sangue oculto nas fezes e perda brusca de peso. Os dados sugerem que a ativação da via IL-33/ST2 participa da ativação da resposta Th2 induzida pela deposição de ovos de *S. mansoni* e auxilia nos mecanismos de modulação do granuloma e remodelação tecidual, que são importantes para proteção da mucosa intestinal e redução da morbidade durante a infecção por *S. mansoni*.

Palavras chave: receptor ST2; *Schistosoma mansoni*; resposta imune; lesão intestinal.

ABSTRACT

The morbidity of chronic schistosomiasis has been linked to the intensity of cellular response induced by the antigens released by the parasite eggs which are retained in host tissues, especially the liver and intestine. The granuloma formation depends on the induction of Th2 response, which participates in the elimination of eggs in remodeling of damaged tissues and containment of harmful action from parasite antigens to host tissues, but can also cause fibrosis and contribute to development the severe form of the disease. It has been shown that IL-33 cytokine, produced by endothelial cells, epithelial cells and fibroblasts during the innate immune response, stimulates the early production of IL-13 and IL-5, supporting the differentiation of Th2 response, and enhance the formation of fibrosis and infiltration of neutrophils. However, the participation of the activation of the IL-33 / ST2 in the evolution of intestinal schistosomiasis has not been reported to date and is the goal of this study. For this we used non-disabled Balb/c mice WT and a Balb/ c strain genetically deficient in expression of the receptor IL-33, called ST2 (ST2^{-/-}). The animals were infected subcutaneously with *S. mansoni* cercariae and comparatively examined for 14 weeks to evaluate mortality, parasite load, immunological changes and morbidity (intestinal lesions, body weight, hematological and nutritional parameters). The data indicate that ST2^{-/-} mice infected with *S. mansoni* showed increased mortality rate compared to WT. The most severe form of schistosomiasis was not associated with parasitic load or bacteria translocation and sepsis. In both experimental groups schistosomiasis also induced anemia, especially in the acute phase. However, in the absence of ST2 receptor, mice with acute schistosomiasis decreased the number of platelets and was not observed increase in circulating leukocytes. In the intestine, the absence of activation of the IL-33/ST2 resulted in increase in the retention of parasite eggs and a significant reduction of the concentration of IL-17 and Th2 cytokines, and therefore less infiltration of neutrophils and eosinophils in the acute phase of granulomas. This initial change resulted in intestinal chronic granulomas with intense cellular infiltrate, lower arginase-1 activity and disorganization of extracellular matrix deposition, which suggest an inadequate differentiation in alternatively activated macrophages. ST2^{-/-} infected mice also showed higher frequency of occult blood in the stool and sudden weight loss. The data suggest that the activation of the IL-33 / ST2 participates in the activation of the Th2 response induced by deposition of *S. mansoni* eggs and assists the mechanisms of granuloma modulation and tissue remodeling that are important for intestinal mucosal protection and reduction of morbidity during infection with *S. mansoni*.

Key words: ST2 receptor; *Schistosoma mansoni*; immune response; intestinal injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica dos países endêmicos para a esquistossomose no ano de 2013.	16
Figura 2. Distribuição mundial das espécies do gênero <i>Schistosoma</i>	19
Figura 3. Prevalência da esquistossomose no Brasil.	21
Figura 4. Ciclo evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i>	24
Figura 5. Resposta imune a <i>Schistosoma mansoni</i>	30
Figura 6. Ativação da via IL-33/ST2.....	34
Figura 7. Organograma experimental 1.....	43
Figura 8. Organograma experimental 2.....	43
Figura 9. Organograma experimental 3.....	44
Figura 10. Esquema da divisão do intestino delgado e grosso.....	45
Figura 11. Avaliação da translocação de bactérias.....	67
Figura 12. Sangue oculto nas fezes.	72

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Número de vermes (machos, fêmeas e total) recuperados pela técnica de perfusão, na fase aguda e na fase crônica da infecção por <i>S.mansoni</i> em camundongos Balb/c WT e ST2 ^{-/-}	55
Gráfico 2. Número de ovos presentes nas fezes de camundongos Balb/c e ST2 ^{-/-} , em 8 e 14 semanas após a infecção por <i>S. mansoni</i> , fase aguda e fase crônica respectivamente.	56
Gráfico 3. Número de ovos retidos no intestino delgado e intestino grosso na fase aguda e crônica da infecção por <i>S. mansoni</i> em camundongos Balb/c e ST2 ^{-/-}	57
Gráfico 4. Contagem de células sanguíneas em amostras de sangue total dos animais Balb/c WT e ST2 ^{-/-} de 8 e 9 semanas após infecção com <i>S.mansoni</i>	58
Gráfico 5. Concentração de citocinas pró-inflamatória IL-17 e IFN- γ no homogenato de intestino grosso em animais Balb/c WT e ST2 ^{-/-} durante a infecção por <i>S.mansoni</i>	59
Gráfico 6. Concentração de citocinas de perfil Th2 no homogenato de intestino grosso em animais Balb/c WT e ST2 ^{-/-} durante a infecção por <i>S.mansoni</i>	60
Gráfico 7. Concentração de citocina de perfil modulatório no homogenato de intestino grosso em animais Balb/c WT e ST2 ^{-/-} durante a infecção por <i>S.mansoni</i>	61
Gráfico 8. Atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO) no intestino delgado (A) e grosso (B) de camundongos Balb/c WT e ST2 ^{-/-} durante a fase aguda e fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	63
Gráfico 9. Atividade de mieloperoxidase (MPO) no intestino delgado (A) e grosso (B) de camundongos Balb/c WT e ST2 ^{-/-} durante a fase aguda e fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	64
Gráfico 10. Atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) no intestino delgado (A) e grosso (B) de camundongos Balb/c WT e ST2 ^{-/-} durante fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	64
Gráfico 11. Quantificação da atividade de arginase no homogenato de intestino delgado (A) e grosso (B) dos animais Balb/c e ST2 ^{-/-} durante a infecção crônica por <i>S.mansoni</i>	65
Gráfico 12. Curva de mortalidade induzida pela infecção por <i>S. mansoni</i> em camundongos Balb/c e ST2 ^{-/-}	66
Gráfico 13. Curva de mortalidade induzida pela infecção por <i>S. mansoni</i> em camundongos Balb/c WT (A) e ST2 ^{-/-} (B) não tratados e tratados com antibiótico Baytril®.	68
Gráfico 14. Quantificação dos níveis séricos de albumina em amostras de soro dos animais Balb/c WT e ST2 ^{-/-} de 8 e 14 semanas após infecção com <i>S.mansoni</i>	69
Gráfico 15. Avaliação de células vermelhas em amostras de sangue total dos animais Balb/c WT e ST2 ^{-/-} de 8, 9 e 10 semanas após infecção com <i>S.mansoni</i>	70
Gráfico 16. Avaliação plaquetária em amostras de sangue total dos animais Balb/c WT e ST2 ^{-/-} de 8, 9 e 10 semanas após infecção com <i>S.mansoni</i>	71
Gráfico 17. Avaliação de sangue oculto nas fezes.	72

Gráfico 18. Análise comparativa entre o peso corporal dos animais Balb/c WT (A e C) e ST2^{-/-} (B e D) a partir da terceira semana de infecção por *S.mansoni*. 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Avaliação do crescimento bacteriano pela translocação de bactérias do intestino de animais Balb/c WT e ST2 ^{-/-} infectados com <i>S.mansoni</i> não tratados e tratados com antibiótico.....	67
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT- Alanina aminotransferase
AAM- Macrófago alternativamente ativado
ANOVA - Análise de Variância
Arg-1- Arginase
AST- Aspartato transpeptidase
BSA - Albumina de Soro Bovino
CEBIO- Centro de Bioterismo
DALY'S- Disability adjusted life years
DAMPs- Moléculas associadas a danos teciduais
ECM- Matriz extracelular
ELISA – Ensaio imunoenzimático
EPM- Erro padrão de media
EPO- Peroxidase de eosinófilo
Fcgbp- Protein- binding FC- γ
GRK2- G protein-coupled receptor kinase 2
H&E- Hemotoxilina e eosina
HSC- Células hepáticas estreladas
ICB – Instituto de Ciências Biológicas
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucinas
IL1RL1- IL-1 receptor-like 1
ILC2- Células linfóides inatas do tipo 2
INF- γ – Interferon gama
LDL- lipoproteínas iodadas de baixa densidade
LE- Luís Evangelista
LTB4- leucotrienos B4
LPS- Lipopolissacarídeos
MAPK- Proteínas Map Quinase
MPO- Mieloperoxidase
MUC- Mucinas
NAG- N-acetilglicosaminidase
NOS2- Nitric oxide synthase 2

OPD - O-fenilenodiamina
OPG- Gramas por ovos
PAMPs- padrões moleculares associados a patógenos
PBMC- Mononucleares de sangue periférico
PBS – Salina tamponada “*phosphate buffered saline*”
PGD2- Prostaglandina D2
RELM- β - Resistin-like molecule β
SEA- Antígeno solúvel de ovo *Schistosoma mansoni*
STAT- Sinal transdutor e ativador de transcrição
SWAP - Antígeno solúvel de verme adulto de *Schistosoma mansoni*
TAA- tiocetamida
TFF-3- Trefoil peptide-3
TGF- β - Fator de transformação de crescimento
Th 1 - Resposta imune do tipo 1
Th2 – Resposta imune do tipo 2
Th17- Resposta imune do tipo 17
TLRs- Receptores do tipo Toll
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
Treg- Células TCD⁴⁺ designadas reguladoras
UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
USP- Universidade de São Paulo
WT- Selvagens “*Wild Type*”
WHO- Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1. ASPECTOS GERAIS.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1 Gênero <i>Schistosoma</i>	19
2.2 <i>Schistosoma mansoni</i>	20
2.2.2 Ciclo Evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i>	21
2.2.3 Formas clínicas da Esquistossomose.....	24
2.2.4 Resposta imune induzida pela infecção de <i>Schistosoma mansoni</i>	27
2.2.5 Interleucina 33 e o desenvolvimento da resposta imune intestinal	31
3. JUSTIFICATIVA	38
4. OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo geral	39
4.2 Objetivos específicos	39
5. MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1 Animais experimentais	41
5.2 <i>Schistosoma mansoni</i> e a infecção experimental.....	41
5.3 Delineamento experimental	42
5.4 Avaliação da infecção.....	45
5.4.1 Quantificação dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> nas fezes.....	45
5.4.2 Recuperação dos vermes adultos do sistema porta hepático	45
5.4.3 Quantificação dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> nos tecidos	46
5.5 Avaliações da resposta imunológica.....	46
5.5.1 Quantificação das citocinas	46
5.5.2 Infiltração celular no intestino.....	47
5.5.2.2 Dosagem da Atividade de Arginase	48
5.5.2.3 Determinação da Atividade de Peroxidase de Eosinófilos (EPO).....	49
5.5.2.4 Quantificação da Mieloperoxidase (MPO).....	50
5.6 Monitoramento do peso	51
5.7 Avaliação patológica	51
5.7.1 Curva de Mortalidade	51
5.7.2 Avaliação do sangue oculto nas fezes	51
5.7.3 Análise histopatológica	51

5.8 Tratamento com antibiótico.....	52
5.9 Avaliação de translocação de bactérias	52
5.10 Obtenção do soro	53
5.11 Avaliação de Albumina	53
5.12 Hemograma	53
5.13 Análises estatísticas	54
6. RESULTADOS	55
6.1 Avaliações parasitológicas em camundongos Balb/c WT e ST2 ^{-/-} infectados por <i>S.mansoni</i>	55
6.2 Perfil da resposta imunológica induzida pela infecção por <i>S.mansoni</i> em camundongos Balb/c WT e ST2 ^{-/-}	57
6.2.1 Quantificação de leucócitos no sangue periférico	57
6.2.2 Produção de citocinas no intestino delgado e grosso	58
6.3 Avaliação histopatológica	61
6.4 Infiltrado celular no tecido intestino delgado e grosso.....	62
6.6 Curva de mortalidade dos animais infectados por <i>S. mansoni</i>	65
6.7 Avaliação da translocação de bactérias	66
6.8 Parâmetros Nutricionais	69
6.8.1 Quantificação dos níveis séricos de albumina.....	69
6.9 Parâmetros Hematológicos	69
6.9.1 Células sanguíneas.....	69
6.9.2 Plaquetas.....	70
6.9.4 Sangue oculto	71
6.10 Monitoramento do peso	72
7. DISCUSSÃO	74
8. CONCLUSÃO	84
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
10. ANEXO	105

1. ASPECTOS GERAIS

A esquistossomose foi descrita pela primeira vez por Theodor Bilharz no Egito em 1851 e desde então permanece uma das doenças parasitárias mais estudadas (Amaral *et al.* 2006). É uma helmintose crônica e debilitante, endêmica em 78 países localizados em regiões tropicais e sub-tropicais do mundo. Destes 78 países endêmicos, 52 países têm populações que necessitam de quimioterapia preventiva (**figura 1**) (Engels *et al.* 2002; WHO 2015). Dados recentes (WHO 2014) estimam que 240 milhões de pessoas sejam acometidas por esta helmintose em todo mundo e outras 700 milhões de pessoas residam em áreas de risco de transmissão. O número total de DALYs (disability-adjusted life years) para esquistossomose é estimado em 1.532 milhões por ano, sendo deste valor 77% ocorrendo na África subsaariana (Gryssels *et al.* 2006).

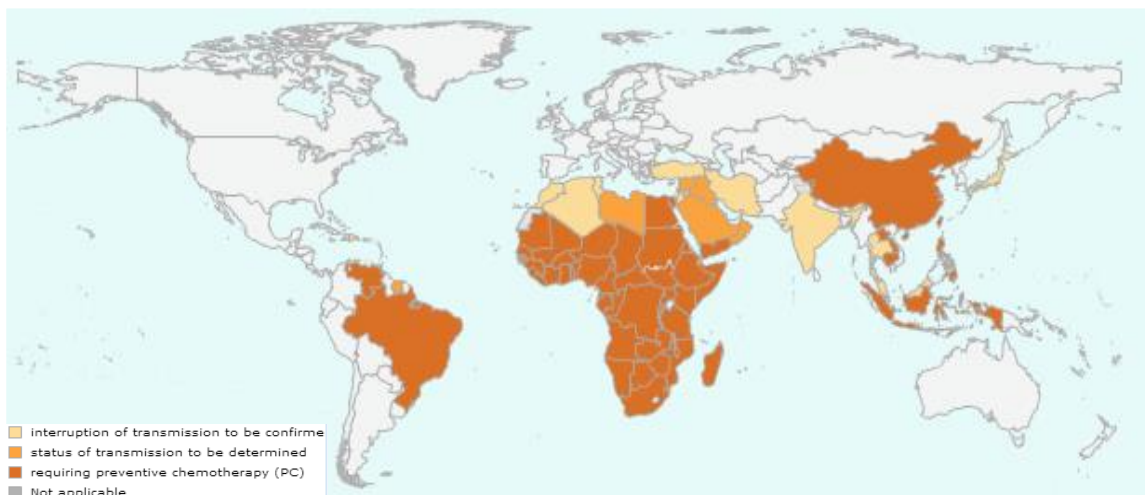


Figura 1. Distribuição geográfica dos países endêmicos para a esquistossomose no ano de 2013. 78 países são endêmicos, sendo 52 países (■) que requerem o tratamento preventivo (FONTE: WHO 2015).

No Brasil, esta doença foi detectada pela primeira vez por Pirajá da Silva em 1908 no estado da Bahia, e ainda hoje é considerada um grande problema de saúde pública, devido a grande extensão de áreas de transmissão (Amaral *et al.* 2006). Estimativas realizadas no final da década de 90 indicavam que no Brasil, a esquistossomose afetava cerca de 8 milhões de pessoas, residindo em 17 estados brasileiros, sendo que mais de um milhão de infectados foram detectados nos estados de Minas Gerais e Bahia (Katz & Peixoto 2000). O inquérito nacional de prevalência de esquistossomose e geo-helmintoses realizados até janeiro de 2014 mostrou uma redução

significativa no número de infectados no Brasil, sendo estimado 1,5 milhões de pessoas com esquistossomose (Katz 2014). Entretanto, é importante lembrar que para permitir a comparação com dados anteriores, o inquérito foi realizado com a técnica de Kato-Katz, que apresenta baixa eficácia para identificar pessoas com baixa carga parasitária (Grenfell *et al.* 2013).

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

Inicialmente os pacientes esquistossomóticos apresentam a forma aguda da doença, geralmente assintomática, principalmente aqueles residentes de áreas endêmicas (Novato-Silva *et al.* 1992; Andrade 2008). A grande maioria dos infectados evolui para a fase crônica leve, onde há deposição dos ovos no intestino e fígado em pequena quantidade, localizados nas ramificações terminais mais finas da veia porta, originando granulomas peri-ovulares isolados (Andrade & Prata 1963; Cheever *et al.* 2000; Andrade 2008). Apenas uma pequena parcela dos pacientes (entre 4 a 10 % dos infectados) pode evoluir para forma crônica grave da esquistossomose, denominada de hepatoesplênica, que é caracterizada pela intensa deposição de ovos na região periportal, provocando expansão fibrosa generalizada no espaço porta acompanhada de lesões destrutivas e obstrutivas do sistema da veia porta intra-hepático (Andrade 2008).

Na fase aguda pré-postural da esquistossomose, a resposta imunológica do hospedeiro infectado é principalmente direcionada aos antígenos secretados por esquistossômulos e vermes adultos, determinando a produção de citocinas pró-inflamatórias predominantemente de perfil Th1. Posteriormente, com o aparecimento dos ovos, novos antígenos são secretados induzindo a maturação de novas células dendríticas e alterando o perfil das citocinas para o tipo Th2, determinante na indução da reação celular responsável pela formação de granulomas periovulares e pela deposição de colágeno no tecido (Dunn *et al.* 1977; Grzych *et al.* 1991; Pearce *et al.* 1991; Pearce *et al.* 2004). Após 10-12 semanas de infecção, ocorre uma gradual regulação da função das células T CD4⁺ efetoras e, conseqüentemente da imunopatologia, levando a redução do tamanho do granuloma ao redor dos ovos depositados (Boros *et al.* 1975; Jankovic *et al.* 1998; Pearce & MacDonald 2002; Lundy & Lukacs 2013). A modulação da resposta imune em infecções por *Schistosoma*

mansoni garante a sobrevivência do hospedeiro, podendo ser alcançada através de diversos mecanismos imunoreguladores, um deles é a via IL-10 (Wynn *et al.* 1998; Falcão *et al.* 1998; Hoffmann *et al.* 2000; Pearce & MacDonald 2002; Hesse *et al.* 2004; Chuah *et al.* 2014).

A participação de elementos da resposta imune adquirida na formação e modulação do granuloma tem sido bem estudada; entretanto, o papel da resposta imune inata hepática ou intestinal neste processo ainda não foi completamente esclarecido. Entre os elementos da resposta imune inata que vem sendo bastante estudada no contexto das doenças infecciosas são as citocinas da família IL-1, devido ao seu papel pró-inflamatório. Dentro desta família podem-se enfatizar a citocina IL-33 que é considerada crucial para a indução da resposta Th2 associada infecções por nematódeos, doenças alérgicas, bem como em infecções bacterianas (Schimtz *et al.* 2005; Oboki *et al.* 2010; Sattler *et al.* 2013). Entretanto, a possível participação da via de ativação IL-33/ST2 na patologia da esquistossomose ainda não foi avaliada e tem sido o principal interesse do nosso grupo de pesquisa e o foco desta dissertação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Schistosoma*

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

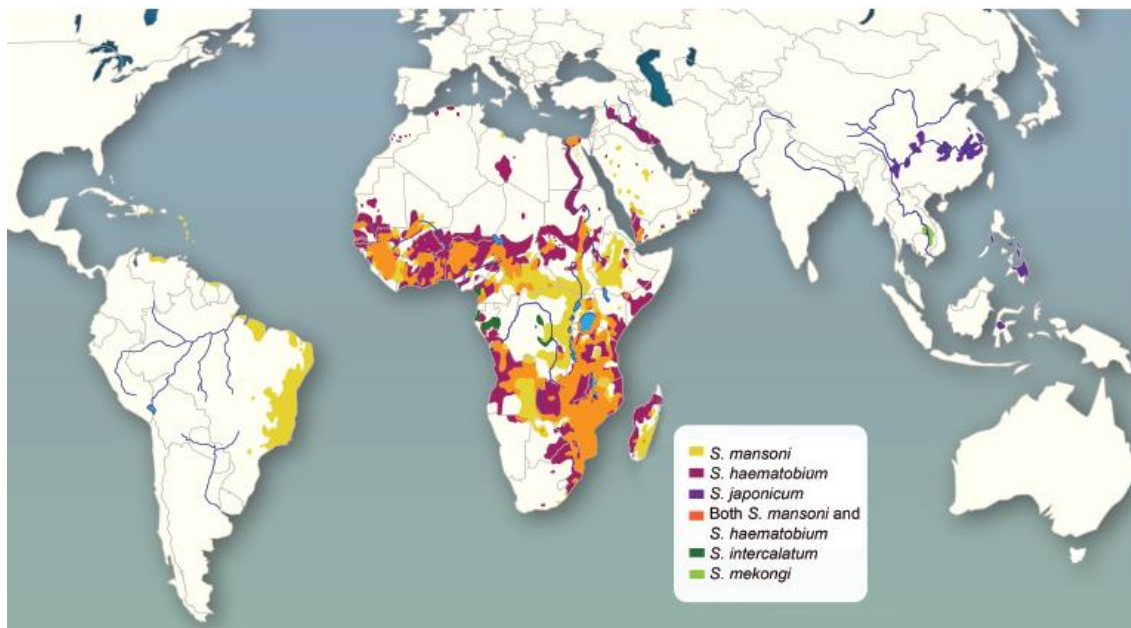


Figura 2. Distribuição mundial das espécies do gênero *Schistosoma*. *S. mansoni*: África, Oriente Médio, América do Sul, Índias Ocidentais. *S. japonicum*: China, Indonésia e Filipinas. *S. mekongi*: Sudeste da África e rio Mekongi. *S. haematobium*: África, Oriente Médio. *S. guineensis* (não representado no mapa) e *S. intercalatum*: Oeste da África, África Oriental. (FONTE: Weerakon *et al.* 2015).

2.2 *Schistosoma mansoni*

A única espécie do gênero de *Schistosoma* encontrado no Brasil é *Schistosoma mansoni*. Há indícios de que este parasito foi introduzido no país através do tráfico de escravos, estabelecendo-se por ter encontrado condições ambientais favoráveis e um hospedeiro intermediário adequado (Katz & Almeida 2003) e assim dissipou-se pelo fluxo migratório humano do litoral para o interior das cidades. A transmissão da esquistossomose ocorre em uma vasta área endêmica, desde o estado do Maranhã até o Espírito Santo e Minas Gerais (Coura & Amaral 2004). Como visto na **figura 3**, a prevalência estimada é menor de 15% para a grande maioria dos estados endêmicos, porém algumas áreas apresentam valores superiores a 15%. Os estados de Minas Gerais e Bahia representam 70% dos casos de esquistossomose (Drummond *et al.* 2006; Scholte *et al.* 2014), porém há relatos de foco de infecção em pontos isolados no Distrito Federal, Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, que evidenciam a expansão da esquistossomose. Um fato importante também são os casos de pacientes positivos que vieram de áreas endêmicas registrados em todo território nacional, principalmente em áreas consideradas de migração, como o estado de Rondônia (Coura & Amaral 2004).

Apesar dos grandes avanços no controle da esquistossomose mansoni e na melhora das condições de moradias e saneamento básico, esta é uma doença com transmissão ativa, não só em áreas de alta endemicidade, mas também em áreas anteriormente não-endêmicas (King & Dangerfield-Cha 2008). Dados mais recentes de Katz (2014), demonstram que o número de brasileiros portadores de esquistossomose reduziu de aproximadamente 8 milhões como visto no ano de 1997 (Katz & Peixoto 2000), para cerca de 1,5 milhões de portadores registrados atualmente. Estes dados foram aferidos pela técnica de Kato-Katz (Katz *et al.* 1972), que se baseia na contagem de ovos para estimar a intensidade da esquistossomose mansoni. Por ser uma técnica de baixo custo, fácil manipulação e quantitativa, esta foi padronizada pela Organização Mundial de Saúde (WHO 1993), como sendo a técnica padrão-ouro para detecção da esquistossomose. Entretanto, vale ressaltar que esta técnica apresenta baixa eficácia para identificar pessoas com baixa carga parasitária, devido a variação diária da oviposição das fêmeas e o pequeno número de ovos encontrados nas fezes, e pela pequena quantidade de amostra de fezes (41,7mg) utilizada para a realização desta técnica (Kongs *et al.* 2001; Grenfell *et al.* 2013). Um estudo recente realizado por Siqueira e colaboradores (2015), afirmam que para a técnica de Kato-Katz ser eficaz nestas áreas é

necessário à confecção de várias lâminas para serem analisadas para que o diagnóstico seja confiável, porém isto requer uma quantidade maior de amostras, o que muitas vezes dificulta o diagnóstico. Técnicas moleculares e imunológicas têm sido promissoras para o diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade, mas ainda demandam validação.

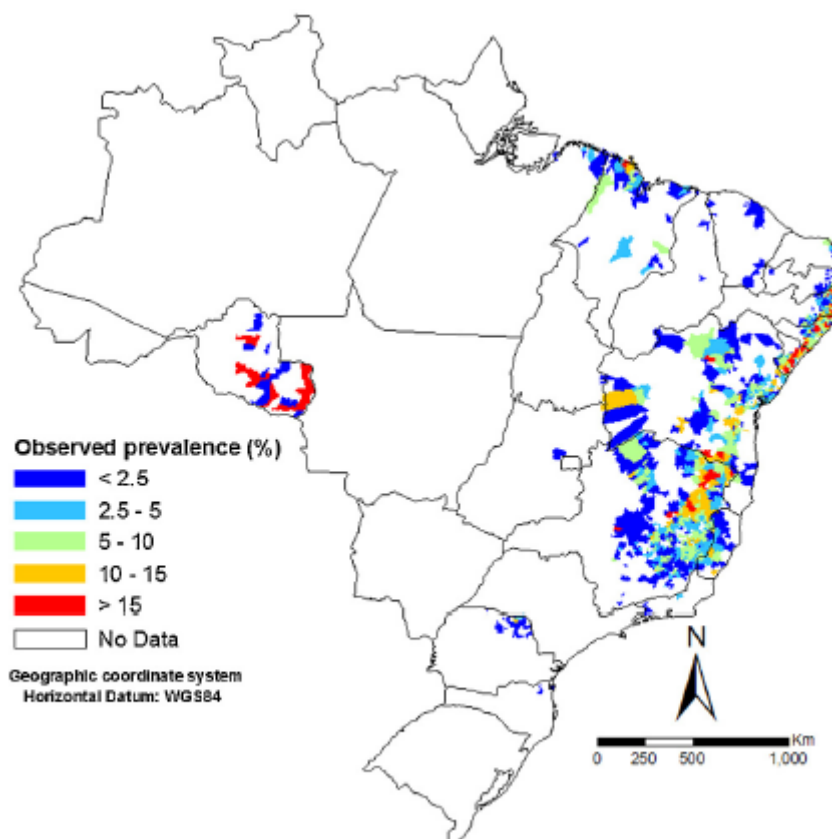


Figura 3. Prevalência da esquistossomose no Brasil. Estimativa realizada pelo Programa Nacional de Controle da Esquistossomose, dos anos 2005 a 2009. Destacado em vermelho as áreas de maior concentração de casos, representado principalmente pelos estados de Minas Gerias e Bahia (FONTE: Scholte *et al.* 2014).

2.2.2 Ciclo Evolutivo de *Schistosoma mansoni*

Schistosoma mansoni possui o ciclo heteroxênico, cujo desenvolvimento depende de um hospedeiro intermediário – moluscos do gênero *Biomphalaria* – onde ocorre a fase assexuada, e um hospedeiro definitivo, que incluem humanos e outros mamíferos como primatas, carnívoros, roedores, marsupiais, artiodátilos (Amorim 1953 *apud* Modena *et al.* 2008; Silva *et al.* 1992; D’Andrea *et al.* 2000, Gentile *et al.* 2000; Modena *et al.* 2008), nos quais ocorre o ciclo de vida sexuado do parasito. Alguns trabalhos como de Coelho *et al.* (1982) e Modena *et al.*(1993) mostraram a eficácia de

S.mansoni em infectar bovinos. Outro estudo realizado no município de Sumidouro no Rio de Janeiro comprovou que roedores do gênero *Nectomys* apresentam grande importância na transmissão da esquistossomose em algumas áreas, por serem altamente susceptíveis à infecção por *S. mansoni*. Assim, estes roedores podem ser considerados reservatórios silvestres dessa doença humana (Gentile *et al.* 2006).

O ciclo evolutivo de *S. mansoni* está representado esquematicamente na **figura 4**. Estudos do desenvolvimento do ciclo de *S. mansoni* foram inicialmente realizados por Pirajá da Silva (1908). Ao serem eliminados pelas fezes do hospedeiro definitivo, os ovos maduros do parasito podem entrar em contato com coleções hídricas, como rios e lagos, estimulando a eclosão de uma larva ciliada conhecida como miracídio, que nadam a procura do hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria*. No Brasil, três espécies de gastrópodos deste gênero; *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*, são encontradas naturalmente infectadas e podem funcionar como hospedeiros intermediários deste trematódeo, enquanto o homem tem sido a única espécie de hospedeiro definitivo que apresenta relevância epidemiológica no país (Paraense 2001; Gryseels *et al.* 2006).

Miracídios de *S. mansoni* penetram ativamente no tegumento de moluscos susceptíveis, perdem suas placas ciliadas e se transformam em esporocistos primários, que originam esporocistos secundários por poliembrionia, e posteriormente originam numerosas cercárias. Em moluscos altamente susceptíveis, cada esporocisto pode formar aproximadamente 100.000 cercárias com cauda bifurcada, que constituem a forma infectante ao hospedeiro definitivo (Souza *et al.* 2011; Gryseels 2012; Colley *et al.* 2014). As cercárias saem através da formação de vesículas no tegumento do molusco, que se rompem e as liberam. Este processo no hospedeiro invertebrado dura entre 4 a 6 semanas (Gryseels 2012). Ao romper a vesícula, as cercárias atingem a água nas horas mais quentes e luminosas do dia, principalmente de 11 às 17 horas, sendo que o fator luminosidade aparentemente é o mais importante na estimulação da liberação de cercárias. A sobrevivência das cercárias na água é limitada a pouco mais de dois dias. Ao ficarem livres na água, as cercárias nadam ativamente até serem atraídas por um hospedeiro definitivo. A partir do momento em que encontram o homem, as cercárias fixam-se, com auxílio de duas ventosas, e penetram ativamente entre os folículos pilosos com auxílio da movimentação e da ação das secreções histolíticas das glândulas de penetração (Stirewalt 1971). As cercárias também penetram através das mucosas. Caso sejam ingeridas com a água, aquelas que conseguirem chegar ao estômago são

destruídas, e as que penetram na mucosa bucal desenvolvem-se normalmente (Souza *et al.* 2011).

Após a penetração, as cercárias perdem a cauda bifurcada e transformam-se em esquistossômulos, que migram preferencialmente através da circulação sanguínea para os pulmões e daí até o sistema porta intra-hepático, onde transformam-se em vermes adultos, machos e fêmeas, que vivem em média 3 a 10 anos (Lenzi *et al.* 2008). A partir de 28 a 30 dias após a penetração, os vermes adultos acasalados migram até a veia mesentérica para postura dos ovos em capilares intestinais. Os primeiros ovos são inicialmente encontrados nas fezes após 40 dias da infecção, reiniciando o ciclo (Coelho *et al.* 1995; Siqueira- Batista, *et al.* 1998; Lenzi *et al.* 2008; Souza *et al.* 2011; Colley *et al.* 2014).

A quantidade de ovos produzidos diariamente pela fêmea de *S. mansoni* varia de acordo com a espécie do hospedeiro definitivo e da linhagem do parasito, porém, a maioria dos estudos indicam a produção de 150-400 ovos/fêmea/dia infecção (Lenzi *et al.* 2008) com média de 300 ovos por dia (Hams *et al.* 2013). Apenas 40% do total de ovos eliminados são capazes de atravessar o endotélio do vaso sanguíneo e a mucosa intestinal, atingem a luz intestinal, sendo eliminado pelas fezes. Os ovos que permanecem no hospedeiro definitivo ficam retidos na mucosa intestinal ou nos vasos, sendo carregados passivamente pelo fluxo sanguíneo e se acumulam principalmente no fígado. Os ovos retidos nos tecidos, tanto no intestino como no fígado, são alvos de uma intensa resposta celular que culminam com a formação do granuloma esquistossomótico (Warren *et al.* 1967; Alisson *et al.* 1974; Miller & Wilson 1978; Valadares *et al.* 1981, Wynn & Cheever 1995; Pearce & MacDonald 2002; Turner *et al.* 2011; Chuah *et al.* 2014).

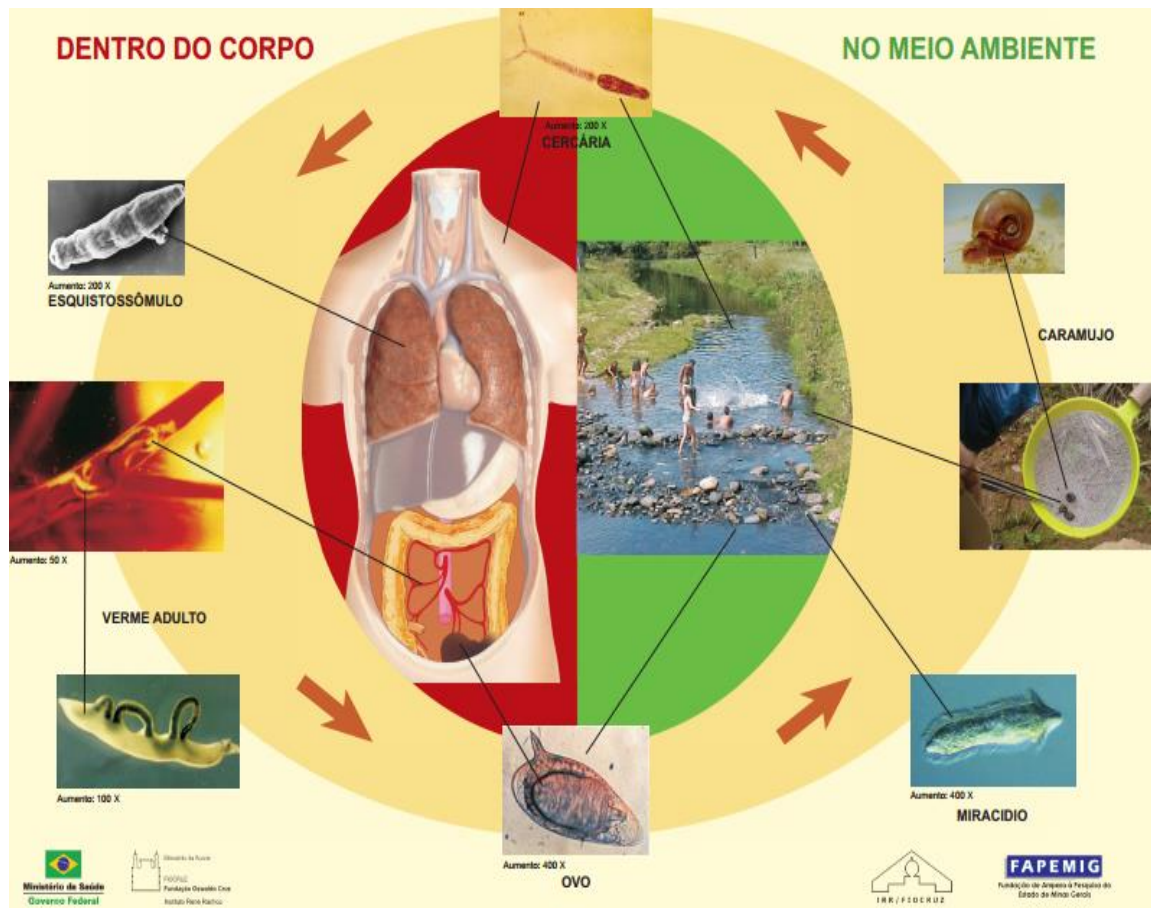


Figura 4. Ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*. Esquematisação dos passos e formas evolutivas do parasito, tanto no hospedeiro intermediário como no hospedeiro definitivo (FONTE: Schall *et al.* 2007).

2.2.3 Formas clínicas da Esquistossomose

A morbidade da esquistossomose está associada à resposta imunológica do hospedeiro, responsável pela formação de granuloma ao redor dos ovos do parasito depositados em tecidos. Na infecção humana por *S. mansoni*, apesar da gravidade destas lesões esquistossomóticas, os pacientes costumam ser assintomáticos ou oligossintomáticos, mas a evolução das fases graves da doença é observada em cerca de 4 a 10 % destes pacientes (Carvalho & Andrade 2005). A patologia maior é vista com acúmulo dos ovos no intestino e no fígado, sendo que a intensidade e duração da infecção são determinantes para severidade da fibrose obstrutiva que pode ser observada fase crônica (Pearce & MacDonald 2002; Gryssels *et al.* 2006; Burke *et al.* 2009).

A evolução da esquistossomose é clinicamente separada em fase aguda e fase crônica. A fase aguda é dividida em dois períodos evolutivos: o pré-patente (antes da oviposição) e pós-patente (após a oviposição) (Souza *et al.* 2011). Os distúrbios da fase aguda nem sempre são detectáveis, sendo verificadas variações individuais conforme a

quantidade de cercárias infectantes e a reatividade do hospedeiro (Milan & Keim 2007). Os primeiros sintomas evidentes ocorrem no período pré-patente, e é caracterizado por uma reação de hipersensibilidade induzida pela penetração da cercária, levando a erupções micropapulares eritematosas e discretamente edemaciada, conhecida como dermatite cercariana (Lambertucci *et al.* 2005; Gryssels *et al.* 2006; Caldas *et al.* 2008).

Posteriormente, durante a migração dos esquistossômulos e amadurecimentos dos vermes adultos, podem aparecer sintomas sistêmicos como um quadro febril, acompanhado de mal-estar com extrema prostração, calafrios, sudorese, fadiga, mialgia, dores de cabeça, náuseas, vômitos. Sintomas abdominais aparecem depois devido a migração e posicionamento dos vermes adultos (Gryssels *et al.* 2006). Neste período o paciente pode apresentar anorexia, tosse não produtiva, eventualmente com crise asmátiforme, diarreia com numerosas evacuações e eosinofilia com placas de infiltrados que são visíveis em radiografias pulmonares (Coura *et al.* 1970; Hiatt *et al.* 1979; Ross *et al.* 2002). Estes sintomas são comuns ocorrerem antes mesmo de aparecem ovos nas fezes, mas geralmente há um pico entre a 6^a e 8^a semanas após infecção (Pearce & MacDonald 2002).

Os sintomas da fase aguda são geralmente observados a partir de 3 a 6 semanas após a exposição ao parasito, e ocorrem principalmente em indivíduos que não residem em áreas endêmicas (Hiatt *et al.* 1979). Acredita-se que indivíduos que residem em áreas endêmicas sofrem sensibilização “in útero”, como consequência da infecção materna; assim ao se infectarem na infância, os indivíduos respondem ao parasito de uma forma diferente (mais modulada) em relação àqueles que não são de áreas endêmicas, os sintomas quando aparecem nestes indivíduos são menos severos (Novato-Silva *et al.* 1992; Andrade 2008).

Normalmente, a infecção evolui para fase crônica leve ou intestinal, na qual os ovos do parasito que foram depositados nos tecidos do hospedeiro secretam enzimas que provocam uma inflamação eosinofílica que culmina na formação de granulomas periovulares isolados, localizados principalmente nas ramificações terminais mais finas da veia porta, dando a impressão de estarem situados em pleno parênquima hepático. As quais vão progressivamente evoluindo para depósitos de fibrose (Andrade & Prata 1963; Raso *et al.* 1986; Cheever *et al.* 2000; Andrade 2008).

Os fatores que levam alguns pacientes a desenvolverem a forma grave da doença ainda não estão totalmente esclarecidos e o aprimoramento deste conhecimento é primordial para o desenvolvimento de métodos eficientes para o controle das formas

graves da esquistossomose. Segundo Abath *et al.* (2006), múltiplos fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento de formas graves. A carga parasitária e a exposição às re-infecções estão entre as principais causas da evolução para forma grave (Bina & Prata 2003; Carvalho & Andrade 2005; Andrade 2008), porém outros fatores são propostos como genéticos e imunológicos (Butterworth *et al.* 1985; Cheever *et al.* 1987; Dessein *et al.* 1999; Dunne & Pearce 1999).

Na fase crônica, é possível observar fortes sintomas na região intestinal, como por exemplo, dores abdominais intermitentes e desconforto, perda de apetite e diarreia com ou sem sangue. Estes sintomas são causados em resposta a migração dos ovos e ao granuloma formado ao redor dos ovos na mucosa intestinal levando a formação de pseudopoliposes, microulcerações e sangramento superficial (King 2001; Ross *et al.* 2002). A forma intestinal é observada em maior predileção entre as crianças e jovens adultos (Souza *et al.* 2011). Além da forma intestinal grave, alguns pacientes podem desenvolver a forma hepatoesplênica, que é a forma grave da esquistossomose (Andrade & Prata 1963) é caracterizada morfológicamente pela fibrose hepática periportal, conhecida e descrita como *pipestem* por Symmers (1904). A fibrose de Symmers está associada a lesões vasculares e hipertensão do sistema porta hepático, devido a congestão e obstrução de ramos intra-hepáticos e da parede da veia porta, pela deposição dos ovos neste espaço levando ao desenvolvimento dos granulomas, com grande quantidade de colágeno ao redor dos ovos, que dificultam a perfusão sanguínea do órgão (Andrade & Cheever 1971; Lambertucci 1993; Silva *et al.* 2006). O desenvolvimento fibrótico pode demorar de 5 a 15 anos, dependendo do paciente e dos fatores imunológicos relacionados ao mesmo, como consequência destas alterações vasculares hepáticas ocorre a esplenomegalia, circulação colateral devido à formação de anastomoses que tentam diminuir o fluxo sanguíneo, desviando-o de áreas de elevada pressão (Lacerda *et al.* 2002; Gryssels *et al.* 2006; Burke *et al.* 2009), também pode ocorrer varizes esôfageanas, gerando hemorragias, percebida pela hematêmese e melena, sendo a principal causa óbitos em humanos (Khier *et al.* 1999). Alguns pacientes em fase crônica podem também apresentar distúrbios vasculares pulmonares, caracterizado por dispneia de esforço, palpitações, dor torácica constrictiva, tosse seca e fadiga extrema (Lambertucci *et al.* 2005). Segundo estudos de necropsia realizados Coura (1979), há uma prevalência de 20% a 30% de indivíduos infectados com esquistossomose com comprometimento pulmonar, mesmo sem relatarem queixas

clínicas. Os pacientes podem apresentar além dessas manifestações, acentuada perda de peso, desnutrição, disfunções cognitivas e anemia em consequência das lesões intestinais decorrentes da eliminação dos ovos (Melo & Coelho 2002; Van Der Der Werf *et al.* 2003; Abath *et al.* 2006).

2.2.4 Resposta imune induzida pela infecção de *Schistosoma mansoni*

Para o estudo da resposta imune induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni*, camundongos são frequentemente utilizados como modelos experimentais, pois estes animais desenvolvem muitas das características patofisiológicas das infecções em humanos, além de serem de fácil manutenção em laboratório. Apesar destes modelos contribuírem para o estudo e entendimento da imunopatologia da esquistossomose humana, principalmente em relação aos mecanismos associados com a formação dos granulomas e o desenvolvimento da fibrose, é necessário cuidado ao interpretar os resultados destes modelos, pois muitos aspectos da infecção experimental não são similares à situação clínica em áreas endêmicas (Cheever *et al.* 2000; Fallon 2000; Abath *et al.* 2006).

Como demonstrado na **figura 5**, a migração dos esquistossômulos e maturação dos vermes adultos (período pré-patente) de *S. mansoni* em camundongos induz uma resposta imune de perfil Th1, que atinge maior ativação entre a 3ª e 5ª semana após a exposição à cercária (Grzych *et al.* 1991; Pearce *et al.* 1991). A resposta Th1 é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ), interleucinas 2 (IL-2), IL-1, IL-12, IL-6, e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (Pearce & MacDonald 2002; De Jesus *et al.* 2002; Wynn *et al.* 2004; Wilson *et al.* 2007). Estimulação da resposta Th1 também tem sido relatada em pacientes com fase crônica sintomática, sendo detectado aumento principalmente das citocinas TNF α , IL-1 e IL-6 (WHO 2009; Pearce & MacDonald 2002).

Com o início da ovipostura, entre a 4ª e a 5ª semana da infecção, ocorre uma mudança no perfil das citocinas circulantes e a resposta imune torna-se predominantemente Th2 (Grzych *et al.* 1991; Pearce *et al.* 1991) (**figura 5**). A resposta Th2 é induzida por antígenos secretados pelo ovo do parasito e o seu desenvolvimento é acompanhado pela diminuição da resposta Th1, que são direcionadas aos antígenos específicos dos vermes (Pearce *et al.* 1991). Por volta da 8ª semana de infecção, a resposta Th2 torna-se bem estabelecida, com o aumento da produção local das

interleucinas 4 (IL-4) e IL-5 (Pearce *et al.* 1991; Pearce & MacDonald 2002; Wynn *et al.* 2004; Wilson *et al.* 2007), que atuam na estimulação da produção de IgE (imunoglobulina E) e de eosinófilos circulantes (Mosmann 1992). Além destas citocinas há um aumento na produção de IL-10 e IL-13 (Pearce *et al.* 1991; Pearce & MacDonald 2002; Bartley *et al.* 2006).

A produção de IL-4 é determinante na estimulação da produção de outras citocinas da resposta Th2, como IL-5 e IL-13, na definição da infiltração celular, na organização do granuloma e no desenvolvimento de fibrose (Yamashita & Boros 1992; Cheever *et al.* 1994; Kaviratne *et al.* 2004). IL-4, IL-5 e IL-13 estimulam a multiplicação dos fibroblastos e a sua diferenciação em miofibroblastos que levam a produção dos componentes da matriz extracelular (ECM) essenciais para a formação de fibrose e da remodelação hepática pelas células que compõem o granuloma (Tiggelman *et al.* 1995; Burke *et al.* 2009). Os granulomas são estruturas organizadas formadas por células migrantes, especialmente macrófagos, eosinófilos, linfócitos T-CD4+, que juntamente com células dos órgãos afetados, alteram a produção e deposição de uma matriz extracelular heterogênea, que resulta na formação de uma estrutura esférica compacta que se organiza ao redor dos ovos do parasito (Boros & Warren 1970; Lenzi *et al.* 2008). A formação do granuloma envolve interações dinâmicas e intrincadas entre célula-célula e célula-matriz, que sofrem profundas modificações no decorrer da infecção. Inicialmente, na fase pré-granulomatosa, as células recrutadas da circulação se arranjam desordenadamente próximo aos ovos, formando agregados celulares. Com os estímulos locais, os macrófagos presentes no granuloma se diferenciam tornando-se alongados, muitas vezes fusiformes e dispostos de forma radial concêntrica em torno do ovo, ficam justapostos uns aos outros e favorecem o encontro entre eles a partir de formações interdigitais entre membranas. São encontradas frequentemente células gigantes multinucleadas, originadas da fundição de um macrófago com outro (Pereira & Boglilo 2000). Estudos posteriores demonstraram que na presença de citocinas do perfil Th2 os macrófagos ativados não produzem óxido nítrico, mas expressam a enzima arginase 1, que converte L-arginina em prolina, utilizada na produção de colágeno, matriz necessária para reparação tecidual e desenvolvimento de fibrose hepática (Pearce & MacDonald 2002; Gordon 2003; Anthony *et al.* 2007). Com a evolução da reação celular forma-se o granuloma maduro ou granuloma exudativo-produtivo, caracterizado por uma grande riqueza celular, compreendendo células migrantes e locais (fibroblastos e miofibroblastos) dispostas organizadamente em 3 camadas distintas: central (com

predomínio de macrófagos) a camada medial (com fibras arranjasdas concentricamente) e a camada periférica (com riqueza celular e fibras reticulares frouxamente dispostas) (Weinstock & Boros 1983; Lenzi *et al.* 1998; Lenzi *et al.* 2008 b).

Após 10-12 semanas de infecção, ocorre uma gradual regulação da função das células T CD4⁺ e da imunopatologia, levando a redução do tamanho do granuloma ao redor dos ovos depositados (Boros *et al.* 1975; Jankovic *et al.* 1998; Pearce & MacDonald 2002; Lundy & Lukacs 2013). A modulação do granuloma caracteriza a fase crônica da esquistossomose e, geralmente tem sido acompanhada por uma redução da produção de citocinas do tipo 2 e do tipo 1 (Araújo *et al.* 1996; Montenegro *et al.* 1999) (**figura 5**). Este processo de modulação da resposta granulomatosa na fase crônica é de grande importância, e tem sido associado com o prognóstico benigno da doença, pois garante a sobrevivência do hospedeiro, podendo ser alcançada através de diversos mecanismos, um deles é através da via IL-10 (Pearce & MacDonald 2002; Chuah *et al.* 2014). Algumas células como CD4⁺CD25⁺, Tregs e células B são fontes de IL-10. Esta citocina apresenta importante função regulatória da formação granulofibrótica (Hesse *et al.* 2004; Wilson *et al.* 2007; Baumgart *et al.* 2006; Van Der Vlugt *et al.* 2012). Durante o período inicial da resposta granulomatosa, IL-10 através da regulação da expressão IL-12/IL-12R atua modulando e/ou suprimindo a produção de IFN- γ , uma citocina de perfil Th1 (Wynn *et al.* 1998; Todt *et al.* 2000; Hess *et al.* 2004; Wilson *et al.* 2007). Posteriormente, IL-10 e TGF- β induzem células regulatórias (Treg) que regulam o balanço da resposta Th1/Th2 (Wilson *et al.* 2007; Wynn *et al.* 2004; Pearce & MacDonald 2002). Assim, IL-10 também é essencial para evitar excessivas respostas Th2 e consequentemente a patologia grave da fase crônica (Hoffmann *et al.* 2000).

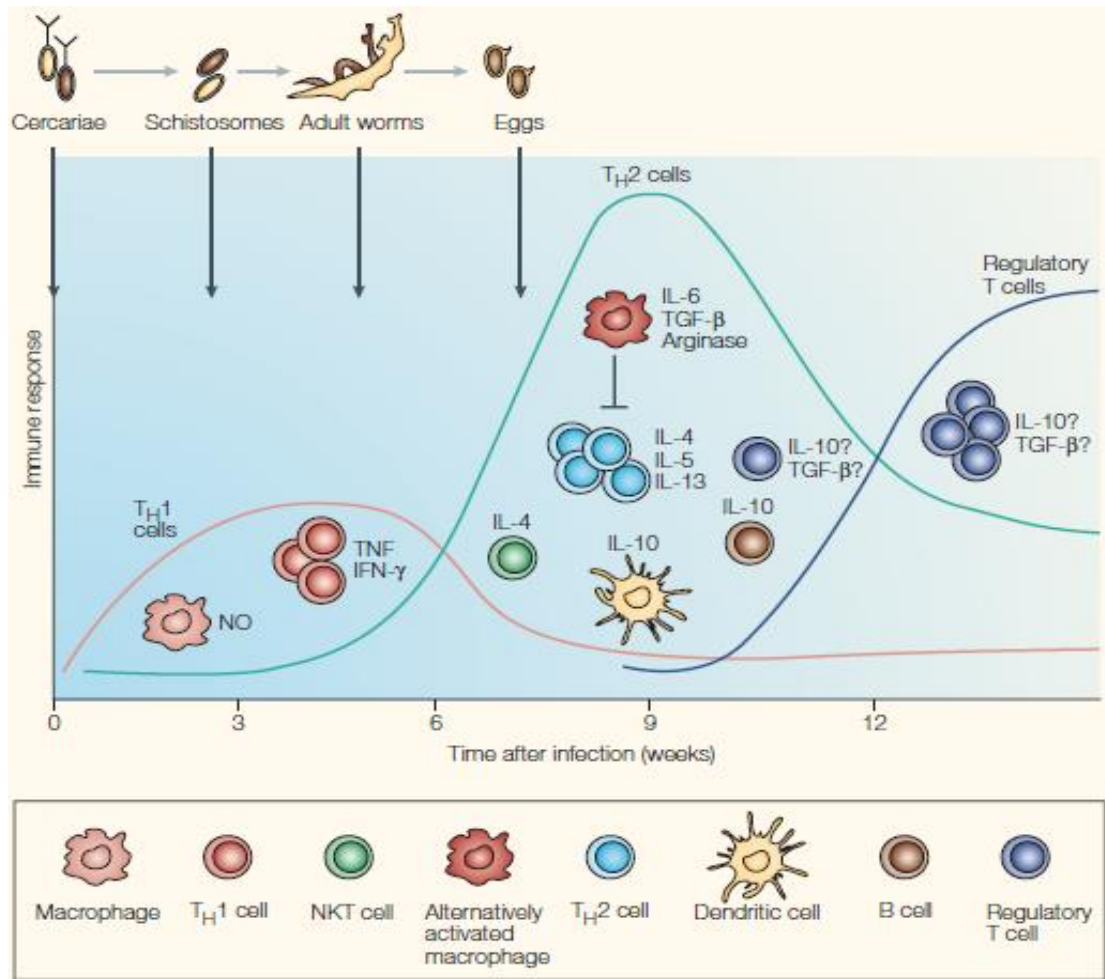


Figura 5. Resposta imune a *Schistosoma mansoni*. Esquemática da produção de citocinas de diferentes células conforme a liberação de antígenos do esquistossômulo, vermes adultos e ovos, caracterizando desta forma a fase aguda, crônica e momento final de modulação da resposta imune. (FONTE: Dunne & Cooke 2005).

Conforme discutido anteriormente, a morbidade da esquistossomose humana é diretamente relacionada ao granuloma induzido pela deposição dos ovos do parasito nos tecidos do hospedeiro, sendo assim fatores como carga parasitária, tempo de exposição ao parasito e/ou frequência de reinfecções, estado nutricional e co-morbidades do hospedeiro interferem na evolução da patologia (De Jesus *et al.* 2002; Abath *et al.* 2006; Hiatt *et al.* 1980). Entretanto, como a formação do granuloma é um processo imuno-mediado, fatores que afetam sua indução e/ou modulação são determinantes neste processo. Também é importante considerar que a formação do granuloma constitui um importante mecanismo de defesa do hospedeiro, pois a reação celular permite a contenção da lesão tecidual causada pela secreção de enzimas e toxinas pelo ovo do parasito, além de modular a intensidade da resposta pró-inflamatórias do tipo Th1

inicial, que pode ser extremamente lesiva ao hospedeiro (Pearce & Macdonald 2002; Hoffmann *et al.* 2002). A formação do granuloma também ajuda a preservar a integridade da parede intestinal e prevenir uma subsequente invasão bacteriana durante a eliminação dos ovos (Fallon *et al.* 2000). Por outro lado, a resposta inflamatória formada ao redor dos ovos disseminados do parasito é fator determinante no desenvolvimento da patologia durante a fase crônica da esquistossomose, já que uma resposta Th2 intensa e prolongada pode contribuir para o desenvolvimento da fibrose hepática (Cheever *et al.* 2000). Assim torna-se evidente a necessidade de estudar os mecanismos locais que iniciam a resposta imune e contribuem para diferenciação da resposta Th2 e sua modulação.

2.2.5 Interleucina 33 e o desenvolvimento da resposta imune intestinal

Como visto anteriormente, os ovos de *Schistosoma mansoni*, podem ficar retidos principalmente no intestino e fígado liberando antígenos que irão ativar a resposta imune responsável pela formação do granuloma. A participação de elementos da resposta imune adquirida na formação e modulação do granuloma tem sido bem estabelecida; entretanto, o papel da resposta imune inata hepática ou intestinal neste processo não foi esclarecido.

O sistema imune inato do intestino é composto por três linhas de defesa, a camada de muco, epitélio e a lâmina própria, a qual é constituída por diferentes tipos de células de defesa. Quando estas barreiras são danificadas, o sistema imunológico é ativado (García-Miguel *et al.* 2013). O sistema gastrointestinal é coberto uma camada de muco que protege o epitélio contra antígenos presentes no lúmen e promove a lubrificação para auxiliar o avanço do bolo digestivo. As proteínas que constituem o muco são denominadas mucinas (MUC), que podem apresentar diferentes isoformas nas diferentes porções do trato gastrointestinal, as mais abundantes são MUC2, MUC3, MUC6, entretanto, outras mucinas podem ser encontradas também como as MUC1, MUC3, MUC4 e MUC12 (Gendler & Spicer 1995; Deplancke & Gaskin 2001; McGuckin *et al.* 2011; García-Miguel *et al.* 2013). Estas proteínas são expressas primeiramente pelos enterócitos, mas são sintetizadas e secretadas também pelas células caliciformes. As células caliciformes apresentam grânulos de muco e se diferenciam a partir do momento que entram em contato com bactérias, e outros estímulos infecciosos (Gendler & Spicer 1995; Deplancke & Gaskin 2001; García-Miguel *et al.* 2013).

Outros constituintes do muco intestinal secretados pelas células caliciformes são as proteínas TFF-3 (trefoil peptide-3), a RELM- β (resistin-like molecule- β) e Fcgbp (protein-binding Fc- γ). TFF-3 protege o epitélio, reparando os danos, através da ativação da migração das células intestinais e bloqueando a apoptose (García-Miguel *et al.* 2013). RELM- β , induz a secreção de MUC2 que aprimora as células locais a expulsarem bactérias e parasitos, como por exemplo, no caso do nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis* (Hogan *et al.* 2006; Nair *et al.* 2008; Hung *et al.* 2013; Oeser *et al.* 2015). Através de ligações dissulfeto, Fcgbp liga-se a MUC2 e TFF-3 e permite que a camada de muco fique mais viscosa e aderente (Knight *et al.* 2008). Durante o processo inflamatório Fcgbp se liga a porção Fc das moléculas de IgG, este complexo então fixa na camada de muco, aprimorando a opsonização de bactérias (Albert *et al.* 2010).

O epitélio intestinal é composto por enterócitos que permitem a absorção de nutrientes e secretam proteínas antimicrobiais, pelas células caliciformes produtoras de muco como descrito anteriormente e pelas células enteroendócrinas que produzem hormônios como serotonina (Müller *et al.* 2005; García-Miguel *et al.* 2013). As células M, localizadas nas placas de Payer também participam da resposta imune intestinal, elas apresentam antígenos microbianos para as células dendríticas e macrófagos (García-Miguel *et al.* 2013).

A terceira linha de defesa do sistema gastrointestinal é a lâmina própria, nesta camada estão contidas as células do sistema imune como os macrófagos, células dendríticas, células “*natural killer*”, neutrófilos, linfócitos, células polimorfonucleares, mastócitos. Estas células reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) ou moléculas associadas a danos teciduais (DAMPs) através da expressão de receptores celulares de reconhecimento de padrões moleculares, como os receptores Toll-like (TLRs) e lectinas (García-Miguel *et al.* 2013). A partir do reconhecimento dos antígenos é orquestrada uma reação com produção de citocinas e recrutamento de mais células de defesa para o sítio de lesão, que visam à eliminação destes patógenos.

Entre as muitas citocinas importantes na resposta imunológica intestinal, ultimamente vem-se estudando as citocinas da família IL-1, que apresentam grande importância devido ao seu papel pró-inflamatório capaz de influenciar diferentes tipos de células. Estas citocinas tem um papel chave na resposta inicial contra a invasão de um patógeno (Humphreys *et al.* 2008). Na família IL-1 foram identificadas as citocinas IL-1F11, IL-1F6/8/9, IL-1F7 e IL-1F10, conhecidas também como IL-33, IL-36, IL-37

e IL-38 respectivamente, sendo que IL-33 é a melhor caracterizada quanto a sua função e efeitos biológicos (Pastorelli *et al.* 2013).

IL-33 está distribuída no citoplasma e núcleo de células endoteliais (intestinais e respiratórias), macrófagos, células dendríticas, células do músculo liso, adipócitos e fibroblastos (Müller *et al.* 2005; Pastorelli *et al.* 2010). Pode ser classificada como uma citocina “alarmin”, ou seja, ela é liberada no espaço extracelular durante os danos celulares ou lesão tecidual e age enviando sinais de alerta para outras células e tecidos adjacentes (Liew *et al.* 2010). Para exercer suas funções biológicas IL-33 deve se ligar ao seu receptor, o “IL-1 receptor-like 1” (IL1RL1) também conhecido como ST2 (Schmitz *et al.* 2005; Pastorelli *et al.* 2011). Existem dois variantes deste receptor com funções biológicas opostas; o ST2L é um receptor expresso na membrana plasmática de vários tipos celulares, que ao se ligar a IL-33 desencadeia o processo de ativação e síntese de mediadores celulares, e o ST2s (solúvel), que quando se liga a IL-33 diminui a disponibilidade da citocina para se ligar ao receptor ST2L e orquestrar a produção de vários mediadores pro-inflamatórios (Fagundes *et al.* 2007; Pastorelli *et al.* 2013). Como mostra a **figura 6** na presença de IL-33, ST2L parece com seu co-receptor IL-1RAcP, permitindo a interação do domínio TIR com MyD88 que pode levar a ativação de duas vias de ativação independentes; uma dependente de cálcio e que resulta na ativação do fator de transcrição nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), e conseqüentemente, na produção de quimiocinas (CXCL2, CCL2, CCL3) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-3, IL-6, TNF), degranulação de mastócitos, produção de prostaglandina D₂ (PGD₂) e leucotrienos B₄ (LTB₄). A outra via é dependente da ativação de proteínas Map quinases (MAPK) que estimula a síntese das quimiocinas CCL5, CCL17 e CCL24 e de citocinas do tipo-2, como IL-5 e IL-13 (Liew *et al.* 2010).

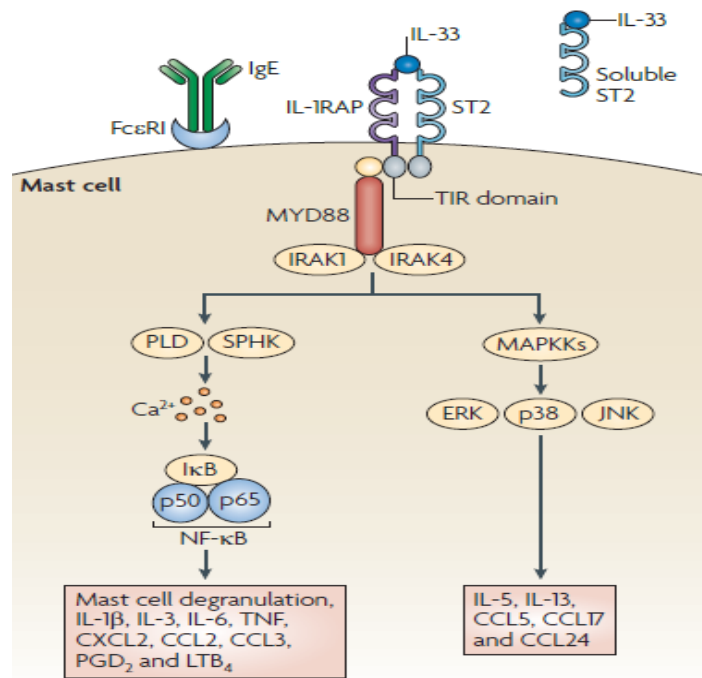


Figura 6. Ativação da via IL-33/ST2. A citocina IL-33 é ativada quando há sua ligação no seu receptor ST2 pareado ao receptor acessório IL-1RAP que recrutarão o complexo MYD88. Este complexo ativa pelo menos duas vias de ativação celular independentes, um dependente de cálcio e outra da ativação das proteínas MAPKs. As duas vias de ativação celular resultam na indução a expressão de genes que levam a síntese de citocinas e quimiocinas desencadeando uma resposta imune (FONTE: Liew *et al.* 2010).

Três bioformas diferentes de IL-33 foram identificadas e caracterizadas funcionalmente; IL-33 de 30kDa é liberada por diferentes tipos de células, como os enterócitos, fibroblastos e macrófagos e interage com as células T da lâmina própria, estimulando a produção de IL-4, IL-5 e IL-13. A produção local de IL-13 estimula a diferenciação de células caliciformes intestinais e a produção de muco (hiperplasia das células caliciformes), aumenta a expressão de IgE pelas células B, estimula a contração dos músculos lisos, aumentando as chances de expulsão do patógeno. Produção de IL-5 ativa eosinófilos e células B, enquanto que IL-4 induz a polarização da resposta Th2 (Nunes *et al.* 2014; Akiho *et al.* 2002). A bioforma de IL-33 de 18-22 kDa é a mais frequente e potente, cuja ativação depende da clivagem por elastase e catepsina G (Lefrançais *et al.* 2012). IL-33 (18-22kDa) recruta e ativa neutrófilos, que secretam moléculas antimicrobianas, espécies reativas de oxigênio, citocinas e quimiocinas inflamatórias, que recrutam células dendríticas e macrófagos para dentro da mucosa intestinal (Hayashi *et al.* 2003). Durante a apoptose celular, IL-33 intracelular é clivado por caspases 3 e 7, gerando a bioforma IL-33 com 20-22kDa, uma proteína menos ativa, porém é de fundamental importância, pois a inativação de IL-33 durante o processo de

apoptose evita a estimulação do sistema imunológico desnecessariamente após um processo fisiológico programado (Nunes *et al.* 2014; Cayrol & Girard 2009; Luthi *et al.* 2009).

Assim, as formas bioativas de IL-33 podem amplificar a resposta imune inata na mucosa intestinal, promovendo o controle de bactérias no intestino por ativar e recrutar neutrófilos e células caliciformes, ativar a produção das citocinas IL-6, IL-1 β e TNF- α que estimula a expressão de receptores do tipo Toll-like (TLRs) que reconhecem LPS (Pastorelli *et al.* 2013). Os lipopolissacarídeos (LPS) são endotoxinas presentes na parede celular de bactérias gram-negativas que são reconhecidos pelos receptores TLR (Murphy 2014). Portanto, animais deficientes na ativação de IL-33 podem ser mais susceptíveis a infecções bacterianas. O processo denominado translocação é a passagem de bactérias e outros micro-organismos ou suas respectivas endotoxinas através da mucosa e lâmina própria do sistema digestório para outros órgãos, podendo levar ao quadro de infecção generalizada, a sepse. Para que este processo de translocação das bactérias ocorra é necessária à queda da imunidade do hospedeiro, alteração da microbiota e quebra das barreiras defensivas da mucosa intestinal (Wiest & Rath 2003; Galeev *et al.* 2009; Ypsilantis *et al.* 2010). A importância da via IL-33/ST2 no controle bacteriano foi confirmado em camundongos que experimentalmente apresentavam sepse e foram tratados com IL-33. Nos animais que receberam IL-33 houve redução da taxa de mortalidade devido ao aumento de fluxo de neutrófilos na cavidade peritoneal, muito eficiente para remoção da infecção bacteriana (Sattler *et al.* 2013).

A produção de IL-33 também é considerada crucial para a indução da resposta Th2 associada a infecções por nematódeos e doenças alérgicas, por induzir a produção precoce de IL-5 e IL-13 por células do sistema inato de defesa, como ILCs2, mastócitos, basófilos e eosinófilos, e, posteriormente, potencializar a produção destas citocinas por células Th2 (Schimtz *et al.* 2005; Oboki *et al.* 2010; Sattler *et al.* 2013). Este processo de indução da resposta Th2 através da via IL-33/ST2 é de grande importância para o desenvolvimento de uma resposta imune adequada contra bactérias e parasitos, bem como para remodelação do tecido lesionado, muitas vezes em consequências destas infecções. IL-33 tem habilidade de promover a proliferação epitelial e a produção de muco, fatores envolvidos na reconstituição e reparação epitelial, levando a cicatrização de feridas e proteção (Lopetuso *et al.* 2012).

As citocinas do perfil Th-2, como IL-4, IL-5 e IL-13 são essenciais para a formação do granuloma esquistossomótico e o desenvolvimento da fibrose. A produção

de IL-13 desempenha um papel relevante para o desenvolvimento de fibrose, pois estimula os fibroblastos e macrófagos a produzirem colágeno por meio da indução da expressão do fator de transformação de crescimento beta – TGF- β (Liu *et al.* 2012). Apesar da participação de IL-33 na fibrose esquistossomótica não ter sido demonstrada, sua importância na fibrose hepática experimentalmente induzida por inoculação de tetracloreto de carbono (CCL4) foi demonstrada por Amatucci e colaboradores (2007). Os autores mostraram que a inoculação da proteína de fusão ST2-Fc resultou em aumento de secreção de citocinas Th2 e aumento da fibrose hepática. Posteriormente, Mchedlidze *et al.* (2013) identificaram um mecanismo de fibrinogênese mediado por IL-33, onde camundongos tratados com tioacetamida (TAA) ou CCL4 tiveram acúmulo de células linfóides inatas no fígado, que são potentes fontes de IL-13. A produção local de IL-13 promove a ativação de células hepáticas estreladas (HSCs) e, por conseguinte, fibrose. Da mesma forma, Hammerich & Tacke (2014) afirmam que IL-33 está relacionada com as células Th2 e células linfóides inatas por meio de produção de IL-13, que promove respostas fibróticas no fígado. As propriedades pró-fibróticas de IL-33 também já foi descrita na pele e pulmões (Rankin *et al.* 2010; Yanaba *et al.* 2011). Li *et al.* (2014) em modelo de fibrose pulmonar induzida por bleomicina em camundongos também verificaram que IL-33 induz a produção de IL-13 tanto por macrófagos ativados (M2) como por células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2s), bem como induz aumento da produção de TGF- β 1 por macrófago. A produção aumentada de IL-13 e TGF- β 1 ocorre nos camundongos selvagens mas não em camundongos deficientes na produção do receptor ST2, confirmando a importância de IL-33 nesta via de ativação.

Atualmente, a associação de IL-33 com as infecções por nematódeos vem sendo mais bem estudada. Durante a infecção por *Strongyloides venezuelensis* foi verificado aumento de IL-33 nas células epiteliais alveolares, resultando em ativação de ILCs2 e produção de IL-5 e IL-13 no pulmão (Yasuda *et al.* 2012). Neste modelo experimental, IL-33 é responsável pela indução da resposta Th2 e o recrutamento de eosinófilos no pulmão (Yasuda *et al.* 2012). IL-33 é necessária para a indução da resposta imune protetora contra infecções do nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis*, tanto na resposta primária como na secundária. Camundongos IL-33^{-/-} falharam na expulsão destes vermes, principalmente devido ao recrutamento inadequado de eosinófilos e da produção insuficiente de IL-13, necessária para diferenciação de células caliciformes (Hung *et al.* 2013). De maneira semelhante, IL-33 também foi necessária para indução da resposta Th2 e proteção em outros modelos de infecção experimental

com nematódeos, como em *Trichuris muris* (Humphreys *et al.* 2008), *Trichinella spiralis* (Scalfone *et al.* 2013), *Heligmosomoides polygyrus bakeri* (Hepworth *et al.* 2012), *Litomosoides sigmodontis* (Ajendra *et al.* 2014).

Em camundongos experimentalmente infectados com *S. mansoni*, tem sido demonstrado que a resposta imune predominantemente Th1 induzida durante a migração do parasito é modulada com o início da postura dos ovos e indução da resposta Th2. Este processo é necessário para formação do granuloma e remodelação tecidual, mas também pode afetar a translocação de bactérias da microbiota intestinal, permitindo o desenvolvimento de sepse (Araújo *et al.* 1977; Elias *et al.* 2005). Sendo, IL-33 uma das importantes fontes para o controle da infecção bacteriana, a falta da sua expressão poderia estar relacionada a quadros de sepse, relatado em algumas infecções experimentais de camundongos.

Apesar do grande conhecimento da atividade pro-inflamatória de IL-33, induzindo a produção de citocinas de perfil Th2 e promovendo a resposta Th2 (Pastorelli *et al.* 2013), e das suas funções em infecções bacterianas e em infecções parasitárias, ainda pouco se sabe sobre a ação desta citocina nas alterações intestinais produzidas por *Schistosoma mansoni*, o que torna-se de relevante importância a realização deste estudo.

3. JUSTIFICATIVA

A morbidade da esquistossomose tem sido associada com a carga parasitária, tempo de exposição e frequência de reinfeções, presença de co-morbidades e com a capacidade do hospedeiro de induzir e modular a resposta imunológica induzida pela liberação dos antígenos dos ovos que ficaram retidos nos tecidos, principalmente fígado e intestino, sendo que grande maioria dos pacientes com esquistossomose *mansoni* evolui para a forma crônica assintomática.

As lesões intestinais provocadas pela liberação dos ovos de *S. mansoni* através da mucosa intestinal são os principais responsáveis pelos quadros de diarreia, desnutrição e hemorragias intestinais relatadas na esquistossomose. Outro aspecto importante a ser considerado é que alterações da resposta imune local e/ou quebra de barreiras intestinais devido a processo lesivos, podem levar ao processo de translocação de bactérias que compõem a flora intestinal, resultando em quadros como a sepse (Wiest & Rath 2003; Galeev *et al.* 2009; Ypsilantis *et al.* 2010). Por outro lado, a formação do granuloma intestinal e a remodelação tecidual estimulada pela indução local da resposta Th-2 podem participar da manutenção da barreira intestinal durante a esquistossomose mansoni e afetar a morbidade da doença.

IL-33, citocinas da família IL-1, participa da resposta imune inata em mucosas, tendo importante papel no controle de bactérias no intestino. A secreção de IL-33 estimula a resposta Th2 na infecção por nematódeos intestinais, a infiltração de granulócitos, a diferenciação de células caliciformes no epitélio intestinal e a secreção de muco, e contribui com a remodelação e cicatrização do tecido lesionado (Pastorelli *et al.* 2013; Sattler *et al.* 2013). Dados preliminares obtidos em nosso laboratório mostraram que a infecção experimental por *S. mansoni* em camundongos geneticamente deficientes na produção de ST2, o receptor de IL-33, não altera a carga parasitária, mas os granulomas hepáticos formados ao redor dos ovos do parasito são desorganizados e sem a modulação clássica observada na fase crônica da esquistossomose. Dessa forma, o presente estudo pretende avaliar a participação da ativação da via IL-33/ST2 nas alterações intestinais induzidas pela eliminação dos ovos de *S. mansoni* e sua relação com a morbidade da esquistossomose experimental.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Neste trabalho pretende-se analisar comparativamente a infecção por *S. mansoni* em camundongos Balb/c não deficientes (WT) e Balb/c geneticamente deficientes na expressão do receptor de IL-33, denominado ST2, para verificar a participação da ativação desta via IL-33/ST2 na lesão intestinal produzida pelo parasito.

4.2 Objetivos específicos

- Analisar comparativamente a curva de sobrevivência de camundongos Balb/c não deficientes (WT) e camundongos Balb/c geneticamente deficientes na expressão do receptor de IL-33 (ST2^{-/-}) por até 14 semanas da infecção com *Schistosoma mansoni*;
- Quantificar o número de vermes adultos recuperados da circulação sanguínea, o número de ovos retidos no intestino delgado e intestino grosso e eliminados nas fezes em camundongos WT e ST2^{-/-} infectados por *S. mansoni*, na 8ª semana e 14ª semana de infecção, correspondentes a fase aguda e fase crônica da esquistossomose, respectivamente;
- Quantificar a produção de citocinas (TGF-β, IL-4, IL-5, IL-13, IL-17 e IFN-γ) em amostras de intestino delgado e grosso de ambas as linhagens de camundongos e seus respectivos controles, na 8ª semana e 14ª semana de infecção por *S. mansoni*;
- Analisar as alterações histopatológicas intestinais induzidas pela infecção por *S. mansoni* em camundongos WT e ST2^{-/-}, na fase aguda e na fase crônica da infecção;
- Avaliar as alterações intestinais associadas à morbidade da esquistossomose, como sangramento intestinal e alteração da barreira intestinal, em camundongos WT e ST2^{-/-} infectados por *Schistosoma mansoni* na fase aguda e crônica da infecção;

- Investigar a partir da 8^a semana pós infecção possíveis quadros de desnutrição e anemia em camundongos WT e ST2^{-/-} experimentalmente com *Schistosoma mansoni*.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais experimentais

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados camundongos com 6 a 8 semanas de vida, fêmeas das linhagens Balb/c não deficientes (linhagem selvagem) fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG e camundongos Balb/c geneticamente deficientes na produção de ST2, receptor da citocina IL-33, que foi originalmente produzido por Schmitz *et al.* (2005), e gentilmente cedidos pelo Dr. João Santana da Silva da USP de Ribeirão Preto. Todos os animais utilizados para realização desse trabalho foram mantidos em racks ventiladas apropriadas e alimentados com ração granulada para camundongos (Nuvilab®, fabricado pela Nuvital) e água potável *ad libitum*. Os experimentos que serão aqui descritos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Animal – UFMG sob protocolo N°159/2012.

5.2 *Schistosoma mansoni* e a infecção experimental

A cepa LE de *Schistosoma mansoni* vem sendo mantida por 40 anos no laboratório do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre a Esquistossomose - GIDE. Esta cepa foi isolada de um paciente (Luís Evangelista de Belo Horizonte – MG) (Valadares *et al.* 1981) e tem sido mantida através de sucessivas infecções em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e caramujos *Biomphalaria glabrata*, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968). Para infecção dos camundongos Balb/c (WT) e (ST2^{-/-}) foram utilizadas cercárias obtidas de *B. glabrata* infectados e expostos por 4h à iluminação artificial em água desclorada. As cercárias obtidas foram analisadas quanto a sua viabilidade, posteriormente concentradas e contadas, com o auxílio de uma lupa, sendo inoculadas, por via subcutânea, 25 ou 50 cercárias por animal (Pellegrino & Macedo 1995). Os animais foram acompanhados até 14 semanas para as avaliações propostas.

5.3 Delineamento experimental

As linhagens de camundongos utilizadas para a realização deste trabalho foram Balb/c WT e os camundongos geneticamente deficientes na produção do receptor da citocina IL-33 (ST2^{-/-}). Para os experimentos de quantificação da carga parasitária (recuperação de vermes adultos, ovos encontrados nas fezes e ovos retidos no intestino grosso e delgado), análise histopatológica e curva de mortalidade, animais de cada linhagem foram infectados experimentalmente com 25 cercárias e acompanhados por até 14 semanas de infecção (**figura 7**). Para cada experimento, amostras de intestino delgado e grosso de 3-4 animais de cada grupo experimental foram processadas exclusivamente para análise histopatológica, pois a técnica de perfusão ou digestão danifica os tecidos.

Com intenção de intensificar a patologia desenvolvida na infecção de *S.mansoni*, um segundo grupo de camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} foram infectados com 50 cercárias, e desta forma avaliou-se os parâmetros da resposta imunológica e da morbidade, como monitoramento do peso, parâmetros hematológicos e nutricionais, esses animais também foram acompanhados por até 14 semanas de infecção (**figura 8**). Em um experimento a parte, camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} foram infectados com 50 cercárias/animal e utilizados para avaliar possível translocação de bactérias intestinais para circulação e outros tecidos do hospedeiro (**figura 9**). Em cada experimento, um grupo de 6-8 animais Balb/c WT e outro ST2^{-/-} não infectados foram mantidos como controle.

Os camundongos foram semanalmente pesados e acompanhados quanto ao desenvolvimento da infecção. Após 8 e 14 semanas de infecção, fase aguda e crônica respectivamente, um grupo 6-10 camundongos de cada grupo experimental foi anestesiado com Ketamina/Xilazina (88 mg/Kg de Dopalen – Sespo Indústria e comércio Ltda, Jacareí - SP - Br + 16 mg/Kg de Kensol – Laboratórios köing S.A. – Avellaneda - Argentina), eutanaziado por deslocamento cervical e necropsiado para realização dos ensaios propostos, como mostra a **figura 7 e figura 8**. Todos os ensaios foram repetidos pelo menos duas vezes para confirmação dos dados.

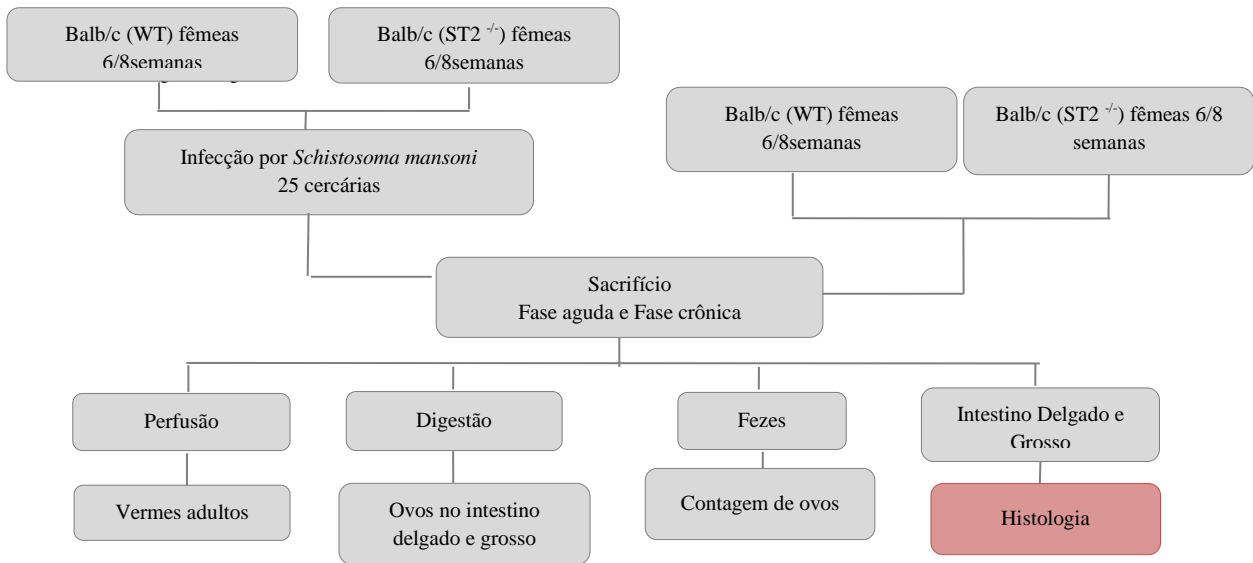


Figura 7. Organograma experimental 1. Delineamento experimental das técnicas realizadas com os camundongos Balb/c e ST2^{-/-} infectados com 25 cercárias de *Schistosoma mansoni*. A técnica de histologia não foi realizada com o mesmo grupo de animais perfundidos.

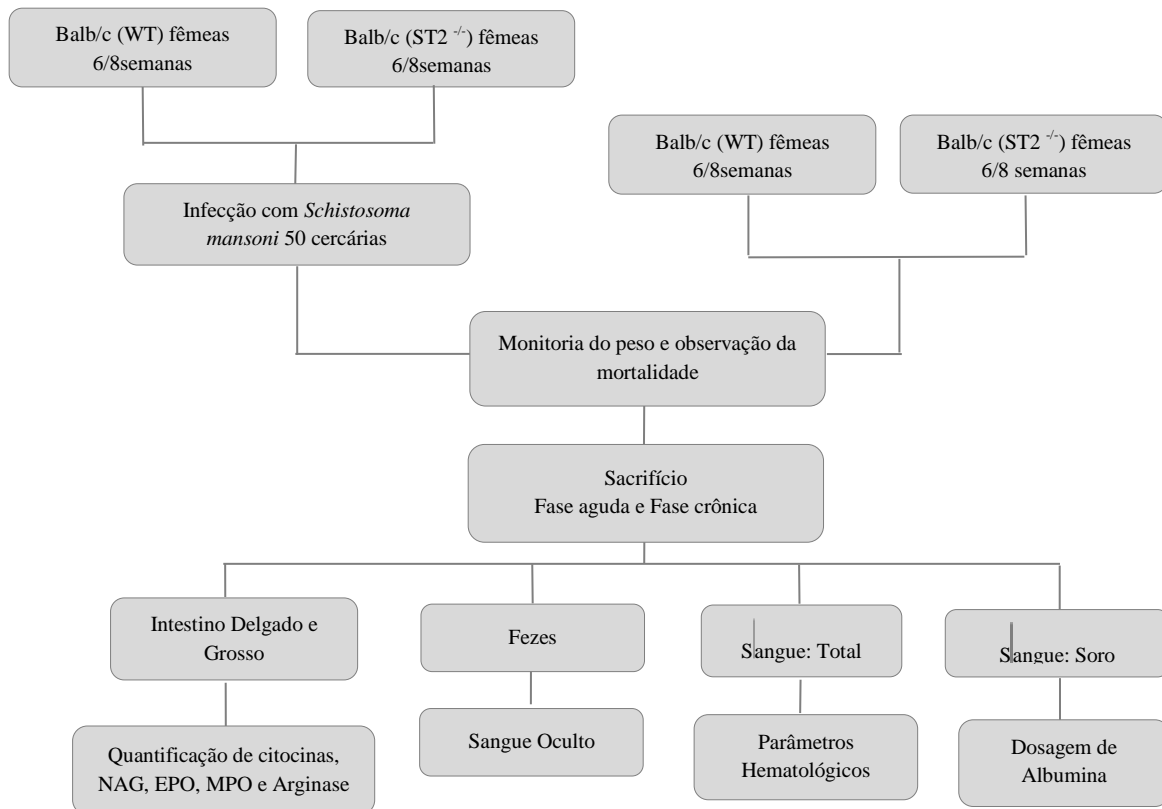


Figura 8. Organograma experimental 2. Delineamento experimental das técnicas realizadas com os camundongos Balb/c e ST2^{-/-} infectados com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni*.

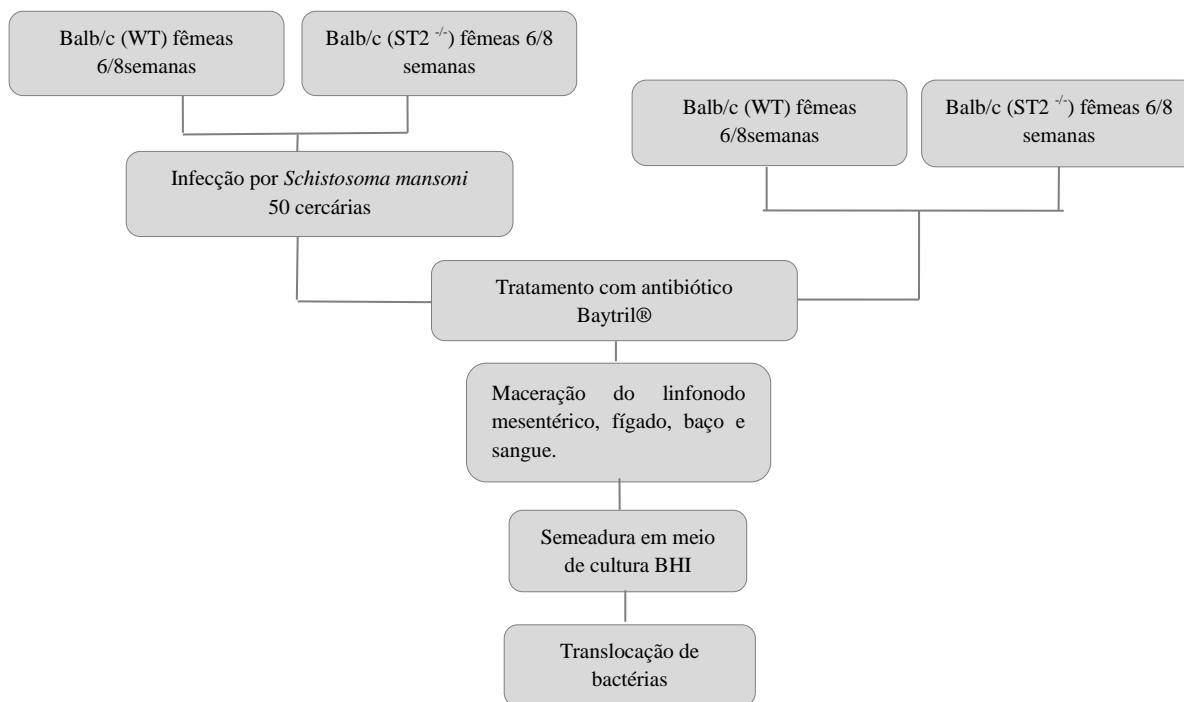


Figura 9. Organograma experimental 3. Delineamento experimental da técnica de translocação de bactérias realizadas com os camundongos Balb/c e ST2^{-/-} infectados com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni*.

O intestino delgado e grosso dos animais perfundidos, foi dividido em três partes iguais, como mostra a **figura 10**, a primeira parte foi destinada ao ensaio de quantificar a atividade da enzima N-acetilglicosamidase (NAG) e dosagem de arginase, a segunda parte para os ensaios de determinação da atividade de peroxidase do eosinófilo (EPO), atividade de mieloperoxidase (MPO), e quantificação das citocinas, e a terceira parte foi utilizada no processo de digestão para contagem dos ovos retidos nos órgãos. No grupo dos animais não perfundidos, utilizamos a última parte do intestino delgado e a primeira parte do intestino grosso para análise histopatológica, como foi mostrado em vermelho na **figura 10**.

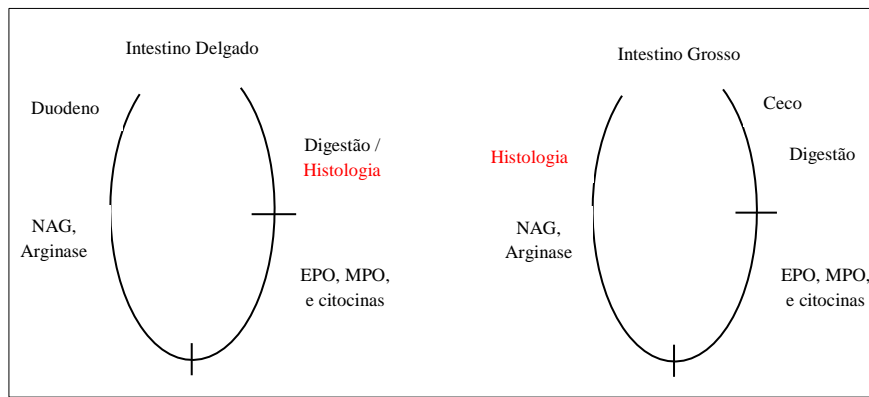


Figura 10. Esquema da divisão do intestino delgado e grosso. Divisão do intestino delgado e grosso para a realização dos experimentos de quantificação a enzima N-acetilglicosamidase (NAG) e dosagem de arginase, determinação da atividade de peroxidase do eosinófilo (EPO) e atividade de mieloperoxidase (MPO), quantificação das citocinas, digestão (contagem dos ovos retidos nos órgãos) em animais perfundidos e para análise histopatológica (histologia) em animais não perfundidos.

5.4 Avaliação da infecção

5.4.1 Quantificação dos ovos de *Schistosoma mansoni* nas fezes

Os animais foram colocados em caixas individuais na noite anterior a eutanásia (8 e 14 semanas após a infecção por *S. mansoni*). No dia seguinte pela manhã, as fezes foram recolhidas, pesadas, homogêneas com solução salina e mantidas em volume definido de solução salina contendo 10% de formol. Para estimar a quantidade de ovos, fez-se a contagem com duas alíquotas de 100 µl da suspensão de fezes colocadas em lâminas de vidro e todos os campos foram analisados ao microscópio óptico. Todos os ovos presentes nas alíquotas foram contados e extrapolados para o número total de ovos na amostra. O número de ovos foi expresso por grama de fezes.

5.4.2 Recuperação dos vermes adultos do sistema porta hepático

Os vermes adultos presentes no sistema porta hepáticos dos camundongos infectados dos diferentes grupos experimentais foram recuperados e contados após perfusão do sistema circulatório, conforme descrito por Pellegrino & Siqueira (1956). Para isto, a cavidade abdominal dos animais eutanaziados foi exposta e no final do reto uma ligadura foi feita com linha cirúrgica, em seguida, a veia porta foi seccionada na região em que se seguem seus aferentes mesentéricos. Uma agulha acoplada a uma bomba de perfusão (Automatic Pippeting Brewer Machine, modelo 60453, B.D) foi introduzida na aorta torácica para a inoculação de solução salina a 0,85% contendo 80 unidades/L de heparina. O líquido contendo os vermes adultos extravasa pela veia porta rompida de cada animal, e o conteúdo foi recolhido em béquer individual. Esperou-se 30 minutos até os vermes decantarem. O sobrenadante foi descartado e sedimento foi

submetido a sucessivas lavagens (três vezes ou até que o sobrenadante se apresentasse completamente límpido) em solução salina. O material recuperado de cada animal foi analisado em uma lupa para a contagem dos vermes adultos, sendo estes diferenciados entre machos e fêmeas.

5.4.3 *Quantificação dos ovos de Schistosoma mansoni nos tecidos*

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

5.5 *Avaliações da resposta imunológica*

5.5.1 *Quantificação das citocinas*

Para estimar a produção de citocinas nos intestinos, 100 mg do intestino delgado e intestino grosso de cada camundongo Balb/c WT e ST2^{-/-}, infectados e não infectados, foram processados em um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) na presença de 1mL de Tampão de PBS contendo 0,5 % Tween 20; 0,5% de albumina bovina (BSA); 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsufonila; 0,1mM de cloreto benzetônico; 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina. O homogenato resultante foi centrifugado por 10 min a 3000 g a 4°C e o sobrenadante foi recolhido, aliquotado e imediatamente congelado a - 20°C para dosagem de citocinas. O precipitado foi processado para a determinação da atividade de EPO e MPO, conforme será detalhado a seguir.

A quantificação de citocinas no homogenato de intestino delgado e grosso foi realizada através da técnica de ELISA Sanduíche, utilizando kits comercialmente

disponíveis para quantificar IL-4, IL-5, IL-13, IL-17, IFN- γ , TGF- β de camundongos (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN), seguindo as instruções do fabricante.

Inicialmente sensibilizou-se uma placa de 96 poços “Half Area” (High Bind) (Greiner Bio-one) com 25 μ l/poço de PBS contendo concentração adequada do anticorpo de captura, anti-citocina de interesse. Esta solução permaneceu em contato com a placa *overnight* e, após este período, a placa foi lavada 3 vezes com PBS contendo 0,05% Tween 20. Logo em seguida, adicionou-se 200 μ l/poço de PBS contendo 1% de albumina de soro bovino- (BSA - Sigma) e incubou-se por 2h em temperatura ambiente. Após lavagem da placa, 100 μ l/ poço de PBS contendo a citocina recombinante de interesse em concentrações conhecidas ou as amostras de sobrenadante do homogenato de tecido, diluídas 1:2 em PBS contendo 0,1 % BSA foram adicionados à placa que permaneceu incubada durante 24 horas. Após novo ciclo de lavagem, adicionou-se à placa contendo PBS o anticorpo de detecção conjugado à biotina na concentração definida pelo fabricante e a placa foi incubada por 2 h em temperatura ambiente. Posteriormente, após a lavagem, foi adicionada à placa, 100 μ l/ poço de PBS/BSA 0,1% contendo Streptoavidina conjugada à peroxidase (diluído 1: 2000). Após 30 min, a placa foi lavada e a reação revelada pela adição de tampão citrato contendo o substrato (4mM OPD, H₂O₂ em 0,05 M de tampão citrato, pH 5). A reação foi interrompida com H₂SO₄ 4N. O produto da oxidação do OPD foi então detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) no comprimento de onda 492nm. Para inferir a quantidade de citocinas presente na amostra, o resultado da leitura de absorbância das amostras foi interpolado à curva padrão gerada pela diluição seriada de quantidades conhecidas de citocinas. Sendo a sensibilidade dos testes de IL-4 e IL-17 15,62 pg/ml, de IL-5e IFN- γ 31,25 pg/ml, da citocina IL-13 62,5 pg/ml e para o teste de TGF- β a sensibilidade é de 7,5 pg/ ml.

5.5.2 Infiltração celular no intestino

As amostras de intestino delgado e intestino grosso, coletadas de camundongos WT e ST2^{-/-} infectados com 8 e 14 semanas de infecção com *S. mansoni* e seus controles foram processadas e utilizadas para avaliação histopatológica e para estimar a infiltração/atividade de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos indiretamente através de atividade enzimática conforme detalhado a seguir.

5.5.2.1 Determinação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG)

A atividade da enzima N-acetilglicosaminidase é uma estimativa indireta do recrutamento de macrófagos para um dado órgão (Green *et al.* 1980), sendo assim é utilizada para estimar a infiltração de macrófagos em amostras de tecidos, onde a reatividade cruzada com enzimas de neutrófilos é mínima. Este ensaio foi inicialmente descrito por Barcelos *et al.*(2005) e seguimos as orientações do autor. Para isto, 50 mg de intestino delgado ou grosso foram pesados e processados em um homogeneizador de tecidos em 950µl de tampão de extração (NaCl 0,1 M, Na₃PO₄ 0,02 M e Na₂EDTA 0,015M pH 4,7). O material foi centrifugado a 3000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi então descartado e eventuais eritrócitos foram lisados pela adição de solução hipotônica 750 µl de NaCl 0,2% e após 30 segundos, a osmolaridade foi restabelecida pela adição de 750 µl de NaCl 1,6% + glicose 5%. As amostras foram mais uma vez centrifugadas (3000 x g a 4°C por 10 min) e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensão em 1,0 ml de solução de Triton x-100 em NaCl 0,9%. A suspensão resultante foi centrifugada a 4° C por 10 min 300 x g e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático.

Em uma placa de 96 poços (Plate Flat Bottom SARSTEDT, Inc. USA), adicionou-se um volume de 100 µl em duplicata. Acrescentou-se o substrato (p-nitrofenil-N acetil-β- glicosamina) diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 4,5) na concentração de 0,767 g/ml e a placa foi incubada a 37° C por 10 minutos. O produto final foi gerado pela adição de 100 µl de tampão glicina (Glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M e NaOH 0,8 M pH 10,6). A absorbância foi quantificada em leitor de ELISA (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) em comprimento de onda igual a 400 nm.

5.5.2.2 Dosagem da Atividade de Arginase

Macrófagos alternativamente ativados expressam arginase-1(ARG1) e a atividade desta enzima está relacionada à proliferação de células e a síntese de colágeno (Baron & Wynn 2011). Para a dosagem desta enzima, 50 mg de intestino grosso e delgado foram pesados e processados como descrito anteriormente para a técnica de quantificação de N-acetilglicosamidase. Foram adicionados 50µl das amostras em uma

placa de transferência e em seguida acrescentou-se 50µl de MnCl₂ (10mM) e 50µl de Tris-HCl (50mM e pH 7,5) em cada poço e a placa foi aquecida a 55°C por 10 minutos. Com uma alíquota de 25µl da amostra obtida na etapa anterior foram adicionados 25µl de solução 0,5 M L-Arginina e a mistura foi incubada por 1 h a 37°C. A reação foi interrompida após adição de 200µl da mistura ácida contendo H₂SO₄, H₃PO₄, e H₂O (1:3:7). Em seguida acrescentou-se 13µl de α-isonitrosopropiophenonea (IPSF) 9% seguido de aquecimento a 95°C por 45 minutos e incubação no escuro por 10 minutos. Decorridos os 10 minutos, realizou-se a leitura de absorvância medida no comprimento de onda de 540 nm usando leitor de microplacas Spectra Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), para estimar a formação de ureia. A concentração de ureia nas amostras foi obtida através da comparação da absorvância da curva padrão construída com amostras de concentração conhecida de uréia (diluição seriada a partir de 1mg/ml) diluídas nas mesmas condições do ensaio.

5.5.2.3 Determinação da Atividade de Peroxidase de Eosinófilos (EPO)

O ensaio da atividade de peroxidase de eosinófilos é uma forma indireta de medir a eosinofilia tecidual, conforme originalmente descrito por Strah *et al.* (1985) e detalhado em Silveira *et al.* (2002). Inicialmente foram pesados 100 mg do intestino delgado ou intestino grosso e processados em um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), com a solução de extração de citocinas (0,5 % Tween 20; 0,5% BSA-Sigma; 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsufonila, 0,1mM de cloreto benzetônico, 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina). O sobrenadante foi armazenado para dosagem de citocinas como detalhado anteriormente, e o *pellet* utilizado para quantificação de EPO e MPO. Eventuais eritrócitos presentes no *pellet* foram lisados pela adição de 1,5 ml de salina 0,2% seguida de 1,5ml de salina 1,6% contendo 5% de glicose. As amostras foram homogeneizadas e o homogenato dividido em 2 (uma parte para EPO e outra para o ensaio de MPO).

As amostras destinadas a quantificação de EPO foram centrifugadas a 3000x g a 4° C e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi re-suspenso em 950 µl de PBS contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB - Sigma). As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas a 3000 x g a 4°C por 10 min. Em seguida o sobrenadante foi utilizado para o ensaio enzimático, para isto, 75 µl de cada amostra ou somente diluente (branco) serão

adicionados a placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) juntamente com 75 µl da solução do substrato (tampão tris-HCL pH 8,0 contendo 1,5 mM o-fenilenodiamina-OPD e 6,6 mM de H₂O₂). Após o desenvolvimento de cor a reação será interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 4N. A absorbância será lida a 492 nm em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland).

5.5.2.4 Quantificação da Mieloperoxidase (MPO)

O ensaio de quantificação de mieloperoxidase (MPO) tem o objetivo de medir de forma indireta a infiltração e/ou ativação de neutrófilos no tecido, conforme descrito pela primeira vez por Bailey (1988) e detalhado por Barcelos *et al.* (2005). O tecido foi processado como descrito anteriormente no ensaio de EPO. As amostras destinadas a este ensaio foram centrifugadas a 3000x g a 4°C por 10 min o sobrenadante foi desprezado. Uma ressuspensão do *pellet* foi feita com 200 µl de tampão fosfato (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA, pH 4,7). A solução foi homogeneizada e centrifugada a 3000x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado foi homogeneizado novamente em tampão (0,05 M NaPO₄ pH 5,4 acrescido de 0,5 % HTAB), seguido de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido, assim como para o ensaio de EPO. Em seguida, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000x g e a 4°C e o sobrenadante utilizado para realização do método colorimétrico. Para o método colorimétrico 25 µL da amostra serão acrescentados a placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) contendo 25 µL de substrato (3,3'- 5,5' – tetramethylbenzine – TMB diluído em dimetilsulfóxido – DMSO na concentração final de 1,6 mM). Em seguida, foi feita a incubação a 37 °C por 5 min. Decorridos os 5 minutos, 100µl da solução contendo H₂O₂ 0,5 mM diluído em tampão fosfato (0,05 M de Na₃PO₄, pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB) foram adicionados e incubados a 37 °C por 5 min. O interrupção da reação foi dada pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 1M e quantificada através da absorbância em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) em comprimento de onda 450nm.

5.6 Monitoramento do peso

Os grupos experimentais Balb/c WT e ST2^{-/-} infectados e não infectados tiveram seu peso aferido em balança eletrônica (BioPrecisa Eletronic Balance FA2104N) semanalmente, para posterior comparação com os dados nutricionais e de mortalidade entre os grupos.

5.7 Avaliação patológica

5.7.1 Curva de Mortalidade

Para a realização da curva de mortalidade os grupos de camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} infectados com *S.mansoni* foram observados semanalmente durante 14 semanas, e os eventuais casos de óbitos foram anotados.

5.7.2 Avaliação do sangue oculto nas fezes

Uma amostra das fezes coletadas de camundongos Balb/c e ST2^{-/-} para a contagem dos ovos foi separada e imediatamente utilizada para realização do teste de sangue oculto. Inicialmente as fezes foram diluídas com uma gota de salina em uma placa de Petri, posteriormente transferidas para o cartão de teste onde o teste foi realizado conforme a descrição do fabricante (kit Hexagon OBScreen - Invitro). O resultado foi dado através da coloração obtida nos cartões, quando apresentaram a coloração azul escuro foi dado positivo para o encontro de sangue oculto nas fezes.

5.7.3 Análise histopatológica

Para análises histopatológicas, amostras de intestino delgado e grosso foram removida e lavada em solução salina 0,85%, pH 7,2 a 37°C em seguida fixadas em formalina tamponada (tampão fosfato contendo 10% de solução de formalina). Vinte e quatro horas após a fixação, as amostras foram lavadas por 3 h em água corrente e colocadas em álcool 70%. Em seguida, todo o material passou por uma desidratação progressiva em séries crescentes de álcool (70° GL a absoluto), clarificado em xilol e embebido em parafina. O tecido emblocado foi utilizado para realização de cortes de 4µm de espessura, que foram corados com hematoxilina-eosina (HE) (Junqueira *et al.* 1979; Montes 1996) para observação do infiltrado inflamatório e lesões provocadas

pela infecção. As lâminas coradas foram analisadas ao microscópio óptico para caracterização do infiltrado inflamatório e da composição dos granulomas formados ao redor de ovos depositados nestes tecidos.

5.8 Tratamento com antibiótico

Os grupos de animais infectados Balb/c WT e ST2^{-/-}, foram divididos em dois grupos experimentais, os tratados e os não tratados. Cada animal do grupo tratado recebeu, a partir da 9ª semana de infecção, 100 µL de enrofloxacin via intraperitoneal (Baytril[®] solução 5% injetável - Bayer), três vezes por semana. As enrofloxacin são derivadas do ácido quinoloncarboxílico e atuam na inibição da girase, enzima fundamental na replicação do DNA bacteriano, que ao ser inativada provoca transtornos funcionais, resultando na destruição da bactéria (Scheer 1987). A mortalidade foi acompanhada diariamente e ao iniciar a 14ª semana de infecção, os animais sobreviventes de cada grupo experimental foram submetidos ao ensaio de avaliação de translocação de bactérias.

5.9 Avaliação de translocação de bactérias

Para confirmar uma possível infecção secundária por bactérias nos camundongos infectados por *S. mansoni*, realizamos o ensaio de translocação de bactérias, no período de 8 e 14 semanas de infecção. Os camundongos tratados e não tratados com Baytril[®] foram anestesiados e eutanasiados como descrito anteriormente, em seguida submetidos à antissepsia com álcool iodado (iodopovidona) por todo corpo do animal e a necropsia foi realizada em capela de fluxo laminar (BioSeg 12 equipamentos de segurança) em condições estéreis. A região peritoneal de cada animal foi aberta longitudinalmente, a veia cava foi exposta e uma amostra de 0,5 mL de sangue foi imediatamente coletada e transferida para um tubo tipo eppendorff contendo 10 µL de heparina (5.000UI/0,25mL). Após a coleta do sangue, foram recolhidos e pesados aproximadamente 70 mg de baço, fígado (lobo menor), e o linfonodo mesentérico inteiro. Os órgãos foram macerados com auxílio de bastões de vidro estéril e homogeneizados em tubos de 5 mL com 0,5 PBS estéril. Em seguida, 0,5 mL de todas as amostras teciduais e de sangue, foram transferidas para tubos contendo 2 mL do meio BHI (Infusão de cérebro e coração, Difco, São Paulo, SP, Brasil) e posteriormente incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, uma primeira leitura das culturas foi realizada em 24 horas, caso não fosse observado crescimento bacteriano as amostras

ficaram incubadas por mais 24 horas a 37°C. Quando observado turbidez nos tubos contendo meio BHI, as amostras foram semeadas em placas de Petri com meios de cultivo específicos para cada grupo de micro-organismos específicos: bactérias gram-positivos (Agar sangue e Agar chocolate, ambos BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia), bactérias gram-negativos (Agar MacConkey, BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francia), os micro-organismos anaeróbios foram definidos pela turbidez no meio BHI e o não crescimento bacteriano nos meios citados acima. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C, e as leituras foram ser realizadas em 24, 48 e 72 horas. Os resultados foram apresentados quanto à presença ou ausência de bactérias nas amostras.

5.10 Obtenção do soro

O sangue recolhido de cada animal experimental permaneceu em temperatura ambiente até coagular e posteriormente foi mantido a 4 °C, por cerca de 12 h, para retração do coágulo. Após a formação e retração do coágulo, o sangue foi centrifugado (1500 xg a 4 °C por 10 minutos) e o soro retirado, aliqotado e mantido a – 20°C. Com o soro coletado dos animais nos dias de eutanásia foram utilizados para a avaliação de albumina utilizando um kit comercialmente disponível.

5.11 Avaliação de Albumina

Para a dosagem de albumina, utilizamos o kit comercial Albumina (Labtest®). Acrescentamos 2µL de amostras de soro dos animais não infectados e infectados Balb/c WT e ST2^{-/-} em uma placa de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA). Para a curva padrão utilizamos 6 poços com uma diluição seriada (2 µL PBS1x + 2µL Reagente 1- padrão). Em seguida, adicionamos o reagente 2 em toda a placa. A placa foi vedada com fita adesiva e acondicionada em local escuro por 10 minutos. Decorridos os 10 minutos, realizou-se a leitura de absorbância medida no comprimento de onda de 630 nm usando o leitor de microplacas Spectra Max (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), para estimar a presença de albumina nas amostras de soro.

5.12 Hemograma

Com o intuito de avaliar os parâmetros hematológicos, coletamos amostras de sangue total dos animais Balb/c WT e ST2^{-/-} infectados e não infectados, durante a 8ª, 9ª

e 10^a semana de infecção por *S.mansoni*. Essas amostras foram acondicionadas em tubos de 0,5 mL de EDTA K2 (Vacuplast) e posteriormente realizamos a leitura das amostras na máquina hematológica ABC-Vet Animal Blood Counter no laboratório de Biomarcadores no Centro de Pesquisa René Rachou: Fiocruz Minas. Os parâmetros obtidos pela leitura foram: contagem de células brancas, número absoluto de linfócitos, monócitos e granulócitos, contagem de células vermelhas, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, contagem de plaquetas e volume plaquetário médio.

5.13 Análises estatísticas

Todos os dados obtidos foram analisados pelo Software Graphpad QuickCalcs para verificação das amostras outlier com valor de α 0,05. Com auxílio do Software Graphpad Prism versão 5, as análises estatísticas foram realizadas. Inicialmente os dados foram submetidos a um Teste de Normalidade (teste de Kolmogorov-Sirnov). Os dados paramétricos foram apresentados como média \pm erro padrão, sendo que a comparação entre os grupos foi realizada pelo Teste T Student, quando comparado apenas dois grupos, ou análise de variância (ANOVA), seguidos pelo Teste de Newman-Keuls Multiple Comparison Test para múltiplas comparações. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao Teste Kruskal-Walls para dois grupos ou foram submetidos ao Teste de Dunn's para múltiplas comparações. O intervalo de confiança foi fixado em 95% e as diferenças foram consideradas significativas para $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Avaliações parasitológicas em camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} infectados por *S.mansoni*

Com a inoculação de 25 cercárias de *S. mansoni*, foi possível estimar a carga parasitária dos camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-}, através da quantificação de vermes adultos recuperados pela técnica de perfusão sanguínea, pela contagem de ovos eliminados nas fezes e daqueles que ficaram retidos nos tecidos.

Na 8^a semana de infecção (fase aguda), foram recuperados em média $3,78 \pm 0,55$ vermes nos camundongos Balb/c e $6,08 \pm 1,30$ em camundongos ST2^{-/-} (**gráfico 1A**). Já na fase crônica, na 14^a semana após a infecção, foi recuperado em média $5,59 \pm 0,99$ vermes adultos em camundongos Balb/c e $6,41 \pm 0,68$ nos camundongos ST2^{-/-}, não sendo verificada diferença significativa na recuperação de vermes entre os grupos experimentais tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção (**gráfico 1B**). Também não verificamos diferença no número de fêmeas ou de machos recuperados de ambos os grupos experimentais (**gráfico 1A e 1B**).

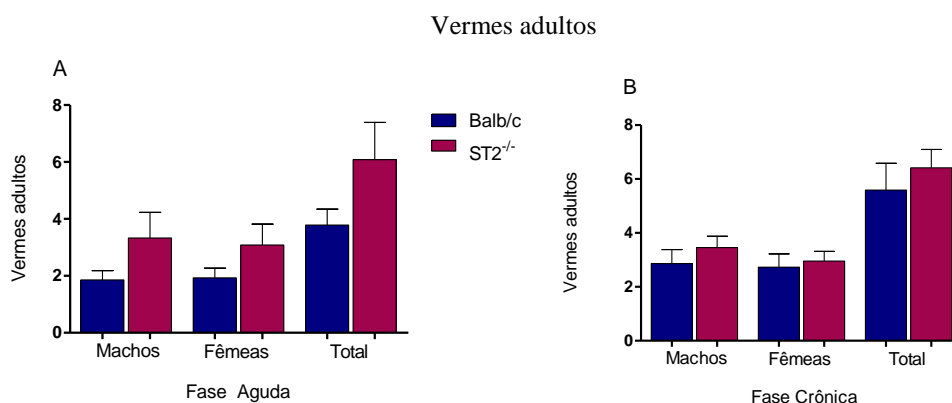


Gráfico 1. Número de vermes (machos, fêmeas e total) recuperados pela técnica de perfusão, na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S.mansoni* em camundongos Balb/c WT e (ST2^{-/-}). O número total de vermes foi estimado a partir da infecção subcutânea com 25 cercárias/camundongos, após perfusão sanguínea realizada (A) fase aguda (8 semanas) e (B) fase crônica (14 semanas). Os valores representam a média \pm EPM de vermes recuperados de camundongos infectados Balb/c (fase aguda, n=14; fase crônica, n=22) e (ST2^{-/-}) (fase aguda, n=12; fase crônica, n=24), referentes a 3 experimentos independentes. Análise ANOVA test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

Em relação à eliminação de ovos nas fezes, nos camundongos Balb/c WT foram quantificados em média $578,2 \pm 129,4$ ovos/g de fezes e nos camundongos $ST2^{-/-}$ em média $1541 \pm 223,9$ ovos/g de fezes durante a fase aguda. Na fase crônica, foram recuperados em média $885,1 \pm 178,6$ ovos/g de fezes nos camundongos Balb/c e $785,9 \pm 100,5$ ovos/g de fezes nos camundongos $ST2^{-/-}$. Durante a fase aguda, houve um aumento significativo de ovos eliminados nas fezes dos animais $ST2^{-/-}$ em relação aos Balb/c WT, o que não é visto durante a fase crônica da infecção (**gráfico 2**).

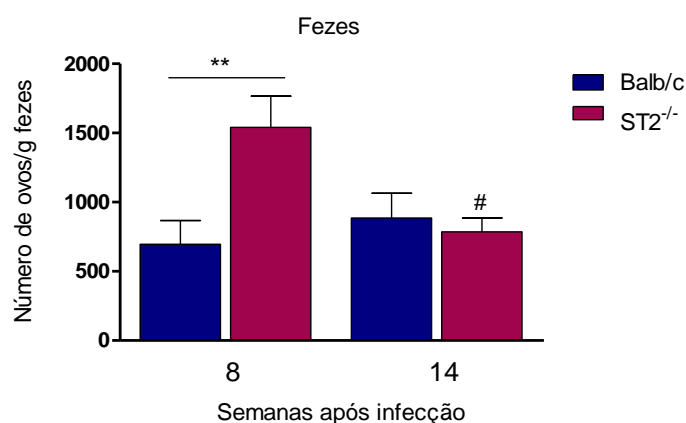


Gráfico 2. Número de ovos presentes nas fezes de camundongos Balb/c e $ST2^{-/-}$, em 8 e 14 semanas após a infecção por *S. mansoni*, fase aguda e fase crônica respectivamente. O número total de ovos eliminados por grama de fezes foi estimado a partir da infecção subcutânea com 25 cercárias/camundongos, após contagem ao microscópio óptico, em fase aguda (8 semanas) e fase crônica (14 semanas). Os valores representam a média \pm EPM de ovos do parasito eliminados por gramas de fezes de camundongos Balb/c (fase aguda, n=25; fase crônica, n=25) e $ST2^{-/-}$ (fase aguda, n=26; fase crônica, n=25), referentes a 3 experimentos independentes. # representa $p < 0,05$ na comparação entre o número de ovos quantificados na fase aguda (8 semanas) e fase crônica (14 semanas) da infecção *S. mansoni* em camundongos com o mesmo genótipo e ** representa $p < 0,001$ para comparação entre camundongos de diferentes genótipos. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

No decorrer da infecção por *S. mansoni* ocorre aumento progressivo do número de ovos acumulados no intestino em ambos os grupos experimentais (**gráfico 3**). Durante a fase aguda da esquistossomose experimental, não foi observada diferença significativa no número de ovos retidos no intestino, delgado ou grosso, dos animais $ST2^{-/-}$ comparado com WT. Entretanto, na fase crônica da esquistossomose houve um maior número de ovos acumulados no intestino delgado e grosso dos animais $ST2^{-/-}$ que em WT, sendo que no intestino delgado a diferença no número de ovos entre os grupos experimentais foi estatística.

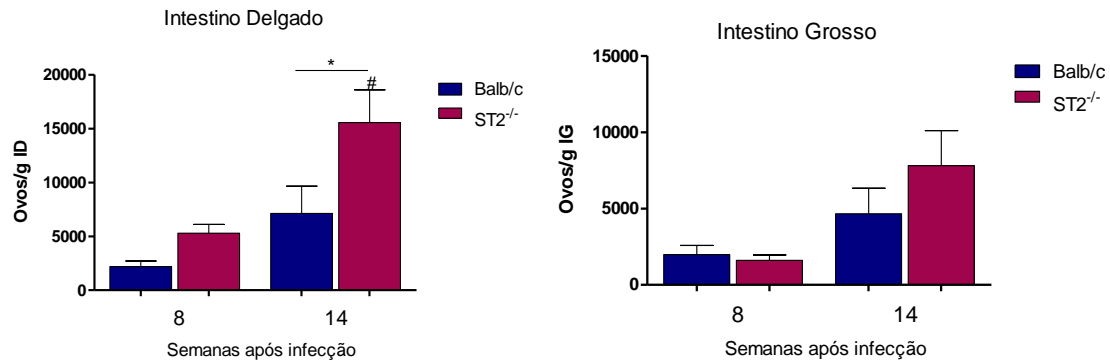


Gráfico 3. Número de ovos retidos no intestino delgado e intestino grosso na fase aguda e crônica da infecção por *S. mansoni* em camundongos Balb/c e ST2^{-/-}. Os valores representam a média ± EPM de ovos de *S. mansoni* quantificados após digestão completa com KOH 5% do intestino delgado e grosso de camundongos infectados com 25 cercárias. Balb/c (fase aguda, n= 5 fase crônica, n=5) e ST2^{-/-} (fase aguda, n= 4 e fase crônica, n=5). # representa p <0,05 na comparação entre o número de ovos quantificados entre a fase aguda (8 semanas) e fase crônica(14 semanas) da infecção *S. mansoni* em camundongos com o mesmo genótipo. * representa p<0,05 para comparação entre camundongos de diferentes genótipos. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

6.2 Perfil da resposta imunológica induzida pela infecção por *S.mansoni* em camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-}

6.2.1 Quantificação de leucócitos no sangue periférico

O número total de leucócitos foi estimado em amostras de sangue coletada no decorrer da infecção por *S. mansoni* em camundongos WT e ST2^{-/-} com auxílio do equipamento ABC-Vet Animal Blood Counter. Verificamos em camundongos WT um aumento significativo do número de leucócitos no sangue após 9 semanas de infecção, que posteriormente retornou aos valores normais. Já nos animais ST2^{-/-} foi observado um aumento progressivo do número de leucócitos da 8^a até a 10^a semana (**gráfico 4**). Quando o número de leucócitos circulantes estimado em camundongos WT foi comparado com o ST2^{-/-}, foi possível constatar que o aumento de células observada em camundongos WT com 9 semanas de infecção foi estatisticamente diferente do observado em ST2^{-/-} (**gráfico 4**).

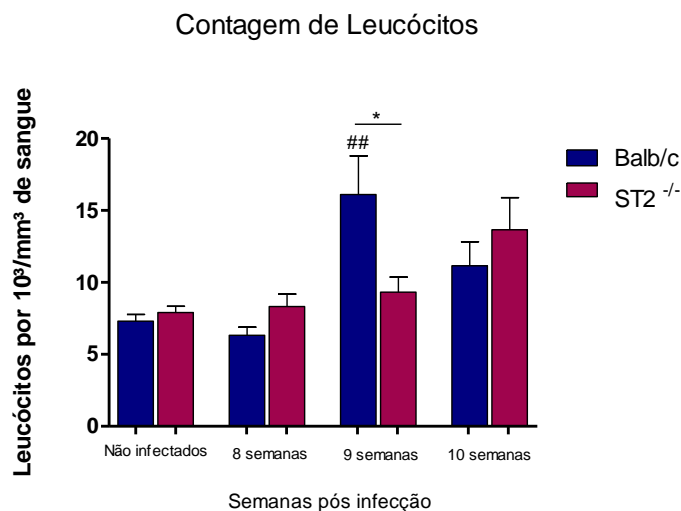


Gráfico 4. Contagem de células sanguíneas em amostras de sangue total dos animais Balb/c WT e ST2^{-/-} de 8 e 9 semanas após infecção com *S.mansoni*. Os valores representam a média ± EPM de leucócitos encontrados no sangue de camundongos Balb/c WT (8 semanas, n=10; 9 semanas, n=13; 10 semanas, n=16) e ST2^{-/-} (8 semanas, n=10; 9 semanas, n=12; 10 semanas, n=11) infectados por via subcutânea com 50 cercárias/animal e submetidos a coleta de sangue na 8^a, 9^a e 10^a semana de infecção. Resultados obtidos pela máquina hematológica ABC-Vet Animal Blood Counter. ## representa p < 0,01 em comparação aos animais do mesmo genótipo. * representa p<0,05 para comparação entre camundongos de diferentes genótipos. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

6.2.2 Produção de citocinas no intestino delgado e grosso

Os níveis das citocinas foram quantificados a partir do homogenato de intestino delgado e intestino grosso, na fase aguda e crônica da infecção. No homogenato de intestino delgado dos animais infectados não foram detectadas diferenças significativas na concentração das citocinas avaliadas entre camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} no período examinado.

No homogenato de intestino grosso, a concentração das citocinas pró-inflamatórias IL-17 e INF- γ (perfil Th1) estão representadas no **gráfico 5**. Observamos em ambas as linhagens um aumento da concentração de citocina IL-17 da fase aguda para fase crônica, no intestino grosso (**gráfico 5A**). Comparando os dois grupos, observamos que o homogenato de intestino grosso de animais Balb/c WT apresentaram valores superiores de IL-17 que em ST2^{-/-} após 8 semanas de infecção. Para demonstrar a indução da resposta Th1, quantificamos os níveis da citocina INF- γ . Da mesma forma, para esta citocina observamos um aumento dos níveis da fase aguda para a fase crônica para os animais Balb/c WT e ST2^{-/-} no intestino grosso, porém a concentração desta

citocina não foi estatisticamente diferente entre Balb/c WT e ST2^{-/-} em cada período da infecção (**gráfico 5B**).

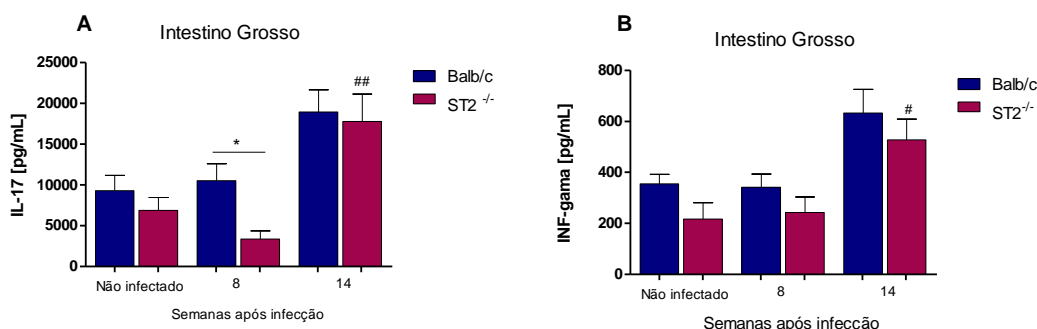


Gráfico 5. Concentração de citocinas pró-inflamatória IL-17 e IFN- γ no homogenato de intestino grosso em animais Balb/c WT e ST2^{-/-} durante a infecção por *S.mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de IL-17 (A) e IFN- γ (B) estimada pela técnica de ELISA no homogenato de intestino delgado e grosso de camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} infectados subcutaneamente com 50 cercárias/animal e necropsiados após 8 semanas de infecção (fase aguda) e 14 semanas (fase crônica). Para o intestino grosso: Balb/c n=4/8 animais; ST2^{-/-} n=5/8 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente). ## representa p < 0,01 e # representa p < 0,05 em comparação aos animais do mesmo genótipo. * representa p < 0,05 para comparação entre camundongos de diferentes genótipos. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

A concentração das citocinas que caracterizam a resposta Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, e que são essenciais para formação do granuloma também foi quantificada no homogenato de intestino grosso dos camundongos experimentais (**gráfico 6**). Nossos dados mostram que a infecção por *S. mansoni* resultou em aumento da concentração de IL-4, IL-5 e IL-13 no intestino grosso dos animais Balb/c WT. Entretanto, nos camundongos ST2^{-/-} a concentração destas citocinas não aumentou significativamente no decorrer da infecção, sendo verificado que durante a fase aguda da esquistossomose a concentração de IL-4 e IL-5 no homogenato intestinal de camundongos ST2^{-/-} foi estatisticamente menor que em camundongos WT (**gráfico 6A e 6B**). Apesar da menor concentração de IL-13 no homogenato intestinal de camundongos ST2^{-/-} em comparação com Balb/c WT, os valores foram significativamente menores somente na fase crônica da infecção (**gráfico 6C**).

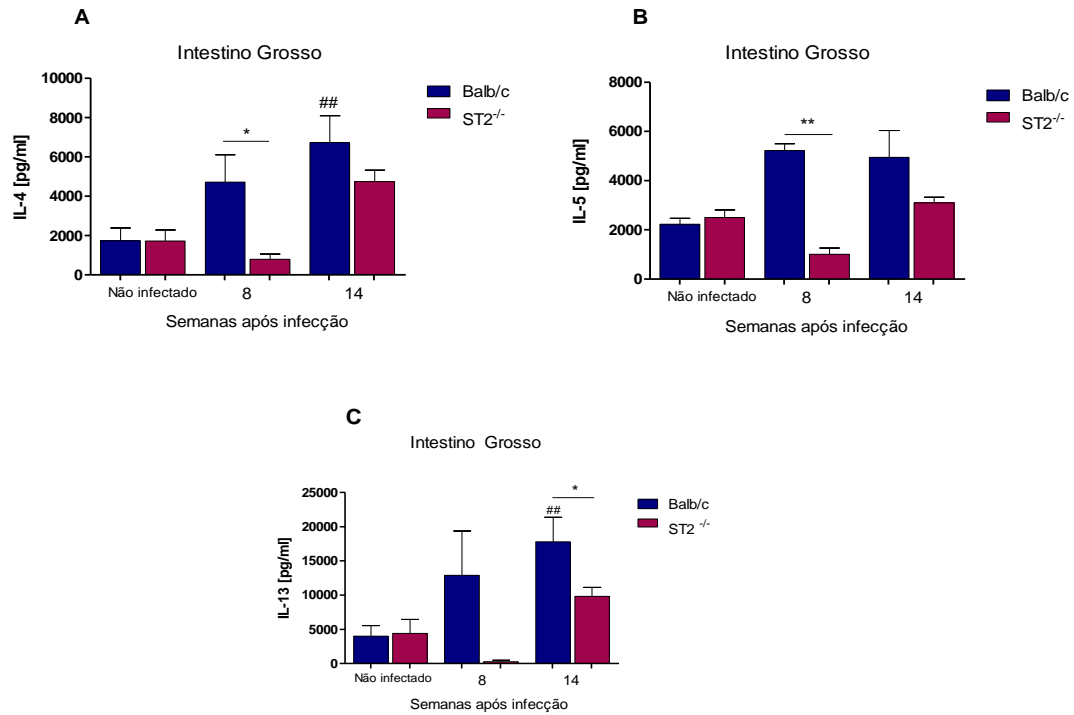


Gráfico 6. Concentração de citocinas de perfil Th2 no homogenato de intestino grosso em animais Balb/c WT e ST2^{-/-} durante a infecção por *S.mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da concentração de IL-4 (A), IL-5 (B) e IL-13 (C) estimada pela técnica de ELISA no homogenato de intestino delgado e grosso de camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} infectados subcutaneamente com 50 cercárias/animal e necropsiados na fase aguda infecção (8 semanas) e fase crônica (14 semanas). Balb/c n=4/8 animais; ST2^{-/-} n=5/8 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente).). ## representa p < 0,01 em comparação aos animais do mesmo genótipo.* representa p < 0,05 e ** p<0,01em comparação aos animais Balb/c (WT) e ST2^{-/-}. Análise no decorrer da infecção ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test, entre os grupos Test Student T.

Em relação à citocina pró-fibrótica TGF-β, foi verificado uma tendência de aumento da sua concentração no intestino grosso para ambas as linhagens, porém sem diferença estatística (**gráfico 7**).

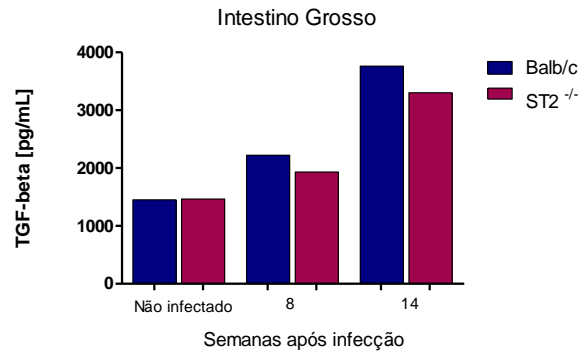


Gráfico 7. Concentração de citocina de perfil modulatório no homogenato de intestino grosso em animais Balb/c WT e ST2^{-/-} durante a infecção por *S.mansoni*. Os valores representam a mediana da concentração de TGF- β estimada pela técnica de ELISA no homogenato de intestino grosso de camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} infectados subcutaneamente com 50 cercárias/animal e necropsiados na fase aguda infecção (8 semanas) e fase crônica (14 semanas). Balb/c n=4/8 animais; ST2^{-/-} n=5/8 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente). Análise Kruskal-Wallis test- post test Dunns.

6.3 Avaliação histopatológica

Ao alcançar 14 semanas de infecção, realizamos a análise histopatológica e esta demonstrou que os animais não deficientes (Balb/c) apresentaram uma coalescência maior de granulomas, com pouca celularidade e com uma deposição concentricamente organizada de fibras e matriz extracelular bem desenvolvida ao redor dos ovos de *S.mansoni* (**Figura 10A**). Em contraste, nos animais ST2^{-/-} os granulomas intestinais apresentaram um formato desorganizado, com áreas de intensa infiltração celular aparentando maiores dimensões, menor deposição de matriz extracelular, e ainda, observou-se um aspecto mais exsudativo do que fibrótico, sugerindo ausência do processo de imunomodulação da reação. Além disso, nos animais ST2^{-/-} foram verificadas áreas de grande destruição da arquitetura tecidual (**Figura 10B**).

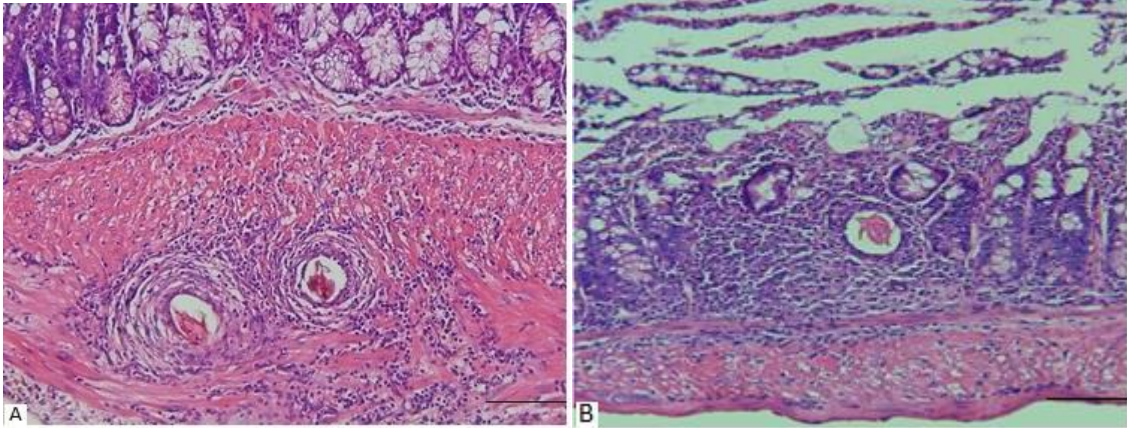


Figura 10. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido intestinal de camundongos durante fase crônica (14 semanas) da infecção por *S. mansoni*, coradas com Hematoxilina-Eosina. Todos os cortes foram fotografados em aumento de 20x. A e B animais Balb/c (WT) e ST2^{-/-} infectados respectivamente.

6.4 Infiltrado celular no tecido intestino delgado e grosso

Para estimar indiretamente a ativação/infiltração de eosinófilos no intestino delgado e grosso dos animais experimentais, realizamos a quantificação da atividade de peroxidase de eosinófilo (EPO) no homogenato destes tecidos. Os dados demonstraram que a infecção por *S. mansoni* induz aumento da atividade de EPO no intestino do hospedeiro, especialmente na fase aguda da infecção. No intestino delgado, o aumento da atividade de EPO foi de mais de 5 vezes o nível basal. Em camundongos ST2^{-/-}, a infecção por *S. mansoni* também induziu aumento da atividade de EPO no intestino do hospedeiro, mas os níveis foram estatisticamente menores que em WT, especialmente na fase aguda da infecção (**gráfico 8A e 8B**).

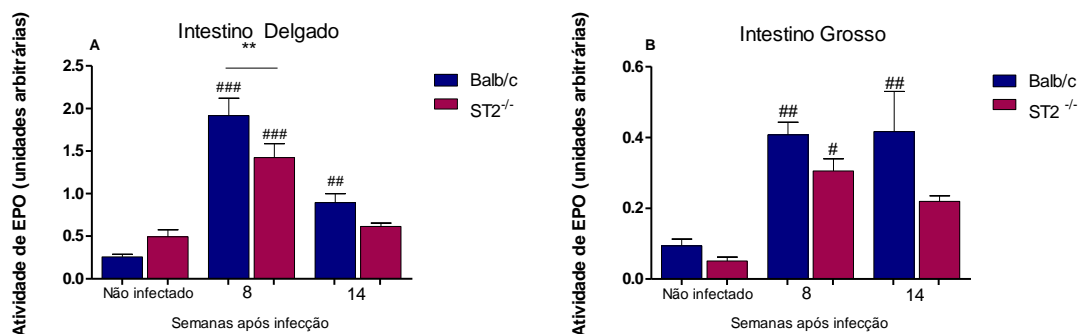


Gráfico 8. Atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO) no intestino delgado (A) e grosso (B) de camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} durante a fase aguda e fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM de absorbância obtidos com 100 mg de intestino delgado e grosso de camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} não infectados, após 8 (fase aguda) e 14 (fase crônica) semanas da infecção com 50 cercárias/animal de *S. mansoni*. Para o intestino delgado: Balb/c n=9/15 animais; ST2^{-/-} n=10/10 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente). Para o intestino grosso: Balb/c n=9/13 animais; ST2^{-/-} n=10/11 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente). # representa p<0,05 e ## representa p < 0,01 e ### representa p < 0,001 em comparação aos animais do mesmo genótipo. ** representa p<0,01 para comparação entre camundongos de diferentes genótipos. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

A quantidade relativa de neutrófilos também foi estimada no intestino delgado (**gráfico 9A**) e grosso (**gráfico 9B**) dos animais Balb/c WT e ST2^{-/-} no decorrer da infecção experimental. Quando analisamos o intestino delgado, verificamos que a infecção por *S. mansoni* induz aumento da atividade de mieloperoxidase durante a fase aguda e esta atividade se mantém elevada na fase crônica; entretanto, a atividade de MPO no intestino delgado de camundongos ST2^{-/-} foi estatisticamente menor que em WT na fase aguda da esquistossomose (**gráfico 9A**). No intestino grosso, observamos que para os camundongos WT também houve um aumento durante a fase aguda e este é progressivo na fase crônica; porém nos camundongos ST2^{-/-} este aumento foi estatisticamente menor do que em WT na fase aguda da infecção (**gráfico 9B**).

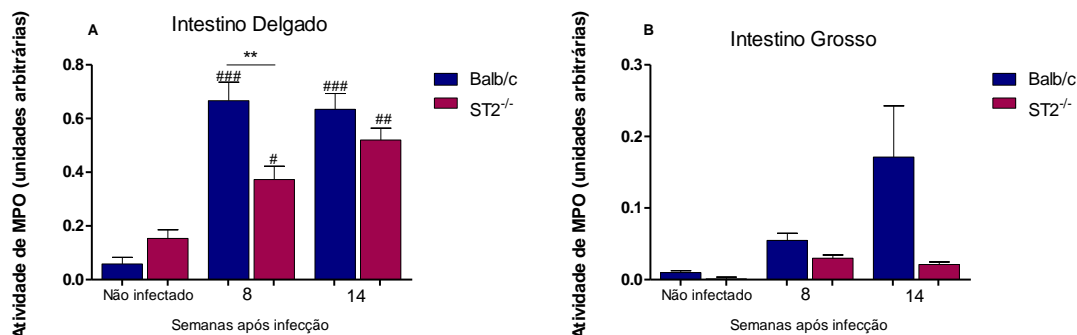


Gráfico 9. Atividade de mieloperoxidase (MPO) no intestino delgado (A) e grosso (B) de camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} durante a fase aguda e fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM de absorbância obtidos com 100 mg de intestino delgado e grosso de camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} não infectados, após 8 (fase aguda) e 14 (fase crônica) semanas da infecção com 50 cercárias/animal de *S. mansoni*. Para o intestino delgado: Balb/c n=10/14 animais; ST2^{-/-} n=10/11 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente). Para o intestino grosso: Balb/c n=9/14 animais; ST2^{-/-} n=10/10 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente). # representa p<0,05 e ## representa p < 0,01 e ### representa p < 0,001 em comparação aos animais do mesmo genótipo. ** representa p<0,01 para comparação entre camundongos de diferentes genótipos. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

Apesar de ter sido observado um pequeno aumento na atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) durante a fase crônica da esquistossomose, não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos experimentais para a quantificação da enzima N-acetilglicosaminidase (NAG) no intestino delgado e grosso durante a fase crônica da infecção por *S.mansoni* (gráfico 10A e 10B).

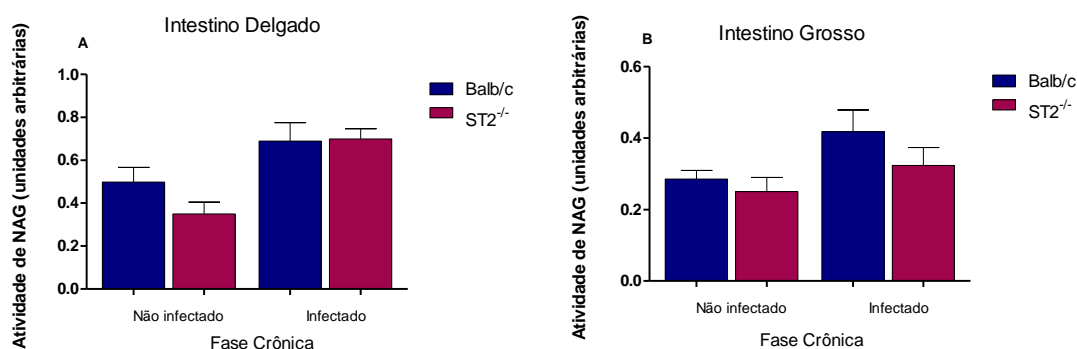


Gráfico 10. Atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) no intestino delgado (A) e grosso (B) de camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} durante fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM de absorbância obtidos com 50 mg de intestino delgado e grosso de camundongos Balb/c (WT) e ST2^{-/-} não infectados, após 14 (fase crônica) semanas da infecção com 50 cercárias/animal de *S. mansoni*. Para o intestino delgado e grosso: Balb/c n=16 animais; ST2^{-/-} n=12 animais. Análise ANOVA-post test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

Para caracterizar o perfil de ativação dos macrófagos durante a infecção por *S.mansoni* no intestino delgado e grosso, foi estimada a atividade de arginase 1 e a

produção de óxido nítrico. Os níveis de óxido nítrico encontrados no intestino delgado e grosso dos animais experimentalmente infectados estavam abaixo do detectável pelo teste. Verificamos que houve um aumento dos níveis de arginase-1 para os camundongos WT e ST2^{-/-} no intestino delgado como no grosso durante a fase crônica, porém este aumento não foi significativo (**gráfico 11A e 11B**).

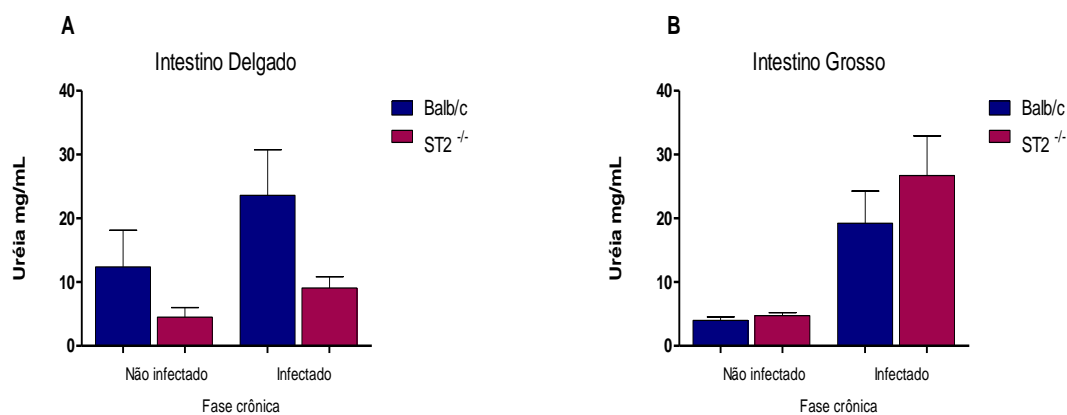


Gráfico 11. Quantificação da atividade de arginase no homogenato de intestino delgado (A) e grosso (B) dos animais Balb/c e ST2^{-/-} durante a infecção crônica por *S.mansoni*. Os valores representam a média ± EPM obtida com 16 animais Balb/c WT e 12 animais ST2^{-/-} infectados por via subcutânea com 50 cercárias/animal e necropsiados após 14 semanas da infecção. Análise ANOVA-post test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

6.6 Curva de mortalidade dos animais infectados por *S. mansoni*

A partir da primeira semana pós-infecção com 25 cercárias/camundongo de *S. mansoni*, todos os animais foram acompanhados até a 14^a semana de infecção (fase crônica), para análise comparativa da gravidade da patologia induzida pela esquistossomose nos camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} (**gráfico 12**). Não foi verificada mortalidade de animais não infectados tanto WT como ST2^{-/-}. Em camundongos WT a taxa de sobrevivência foi de 85,35 % e os óbitos ocorreram a partir da 12^a semana de infecção, enquanto que animais ST2^{-/-} infectados por *S.mansoni* obtiveram uma taxa de sobrevivência de 43,35 % e os óbitos ocorreram a partir da 10^a semana de infecção, valor significativamente menor em comparação aos animais Balb/c.

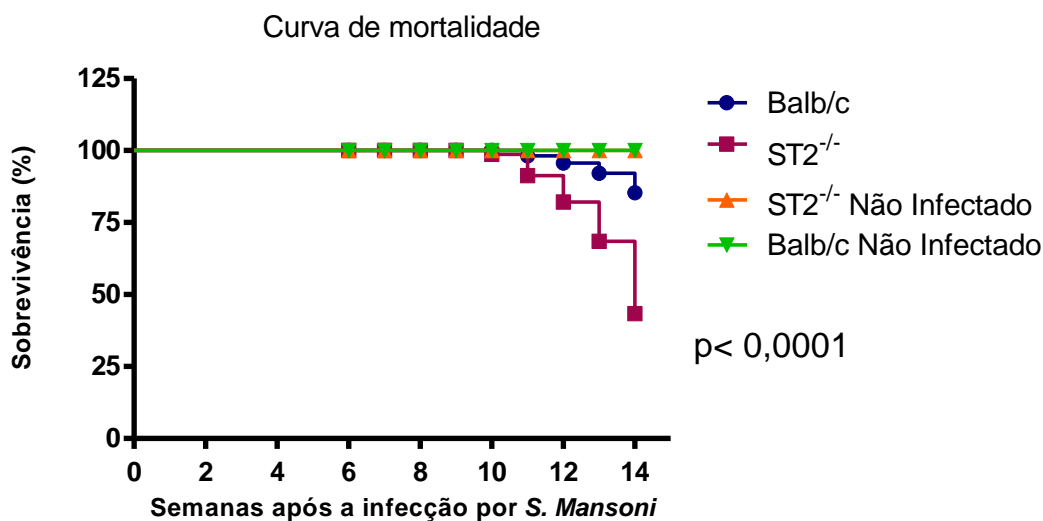


Gráfico 12. Curva de mortalidade induzida pela infecção por *S. mansoni* em camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-}. Foram acompanhados camundongos Balb/c e ST2^{-/-} infectados com 25 cercárias/animal durante 14 semanas de infecção (Balb/c n= 26 animais; ST2^{-/-} n=29 animais). Análise comparação por Kaplan-Meier, post-test Longrank.

6.7 Avaliação da translocação de bactérias

Na tentativa de verificar a ocorrência de translocação de bactérias do intestino de animais Balb/c WT e ST2^{-/-} infectados por *S. mansoni* para outros órgãos e/ou sangue, semeamos amostras de baço, fígado, linfonodo mesentérico e sangue em meios de cultura apropriados, como descritos anteriormente. Em paralelo, parte dos animais Balb/c WT e ST2^{-/-} infectados foi tratado com antibiótico Baytril[®] e a mortalidade foi acompanhada no decorrer da infecção.

Na **tabela 1** observamos o número total de amostras dos quatro grupos (Balb/c e ST2^{-/-} não tratados e Balb/c e ST2^{-/-} tratados com antibiótico) que foram semeadas no meio de cultura BHI. Surpreendentemente das 176 amostras de Balb/c WT e 204 amostras de ST2^{-/-} analisadas, nenhuma delas apresentou crescimento bacteriano durante a fase crônica, onde é visto o início da mortalidade. O teste foi ilustrado na figura 11, onde pode ser verificada ausência de turbidez do meio de cultura BHI, confirmando o não crescimento de bactérias nestas amostras.

Tabela 1. Avaliação do crescimento bacteriano pela translocação de bactérias do intestino de animais Balb/c (WT) e ST2^{-/-} infectados com *S.mansoni* não tratados e tratados com antibiótico.

	Total de amostras Balb/c (WT) Não tratados	Total de amostras ST2 ^{-/-} Não tratados	Total de amostras Balb/c (WT) Tratados	Total de amostras ST2 ^{-/-} Tratados
Linfonodos mesentéricos	29	35	15	16
Sangue	29	35	15	16
Baço	29	35	15	16
Fígado	29	35	15	16
Total de amostras	116	140	60	64
Amostras positivas para crescimento bacteriano	0	0	0	0

Número total de amostras semeadas no meio de cultura BHI (Infusão de cérebro e coração) durante a fase crônica da infecção de animais Balb/c (WT) e ST2^{-/-} infectados e não tratados e tratados com antibiótico Baytril®. E número total de amostras positivas para o crescimento de bactérias após um período de 24 horas. Os valores para os animais não tratados são referentes a quatro experimentos distintos e dos animais tratados são referentes a dois experimentos distintos.

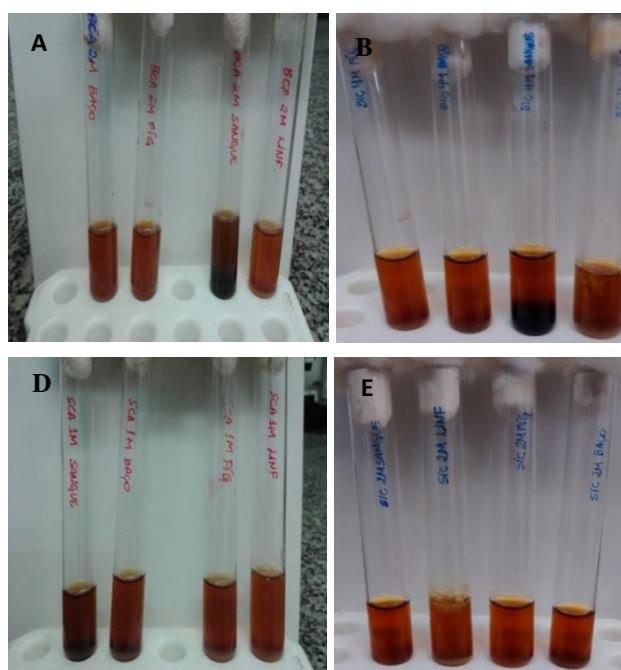


Figura 11. Avaliação da translocação de bactérias. Amostras de baço, fígado, linfonodo mesentérico e sangue, semeadas em meio de cultura BHI (Infusão de cérebro e coração) (A-E). Ausência de turbidez nos animais Balb/c WT (A) e ST2^{-/-} (D) não infectados. Nos camundongos Balb/c (WT) (B) e ST2^{-/-} (E) infectados com 50 cercárias/animal *S.mansoni*.

Além de não ter sido observado crescimento de bactérias em cultura (**tabela1**) em nenhuma das amostras semeadas, não houve diferença da mortalidade (**gráfico 13A**) entre os animais infectados Balb/c WT e ST2^{-/-} que não receberam tratamento com antibiótico, entretanto, ao receberem este tratamento as diferenças foram significativas entre os grupos WT e ST2^{-/-} infectados (**gráfico 13B**), mostrando que os animais ST2^{-/-} apresentam uma taxa de sobrevivência ainda menor do que os WT mesmo sendo tratados com antibiótico. Estes dados sugerem que não houve translocação bacteriana e esta não é a causa da mortalidade destes animais.

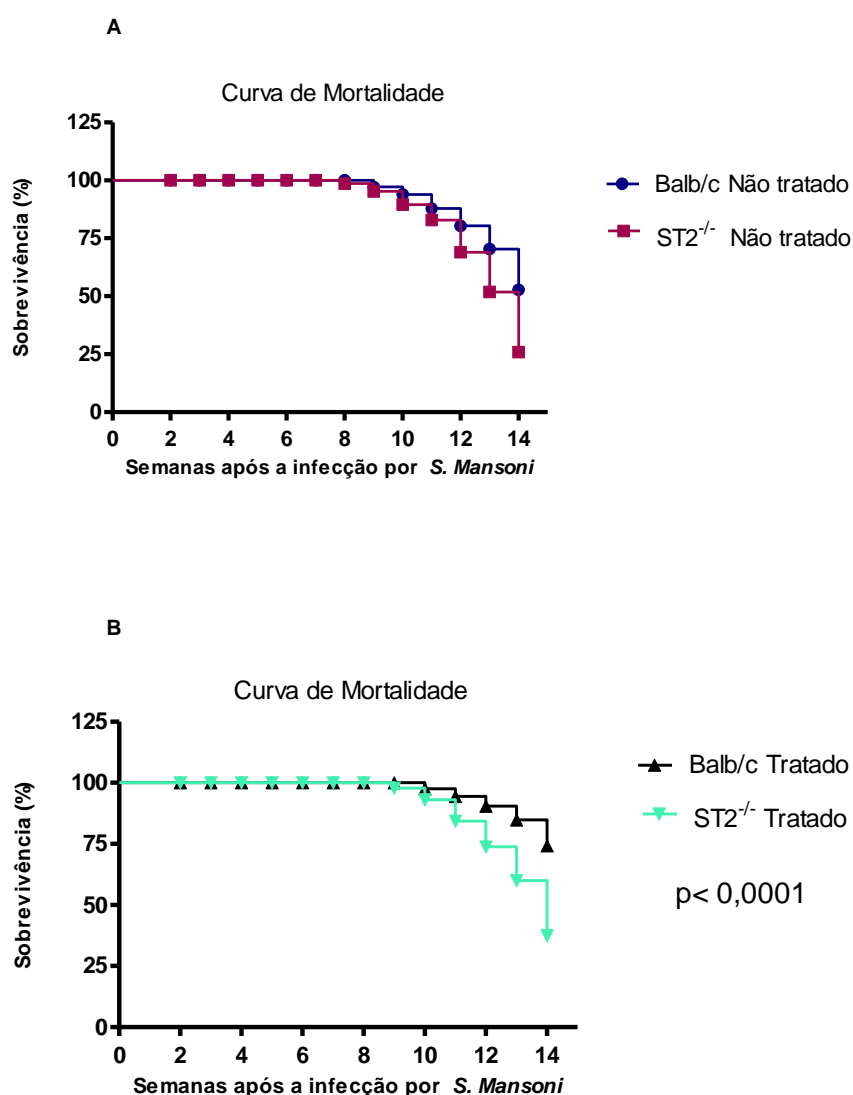


Gráfico 13. Curva de mortalidade induzida pela infecção por *S. mansoni* em camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} não tratados (A) e tratados (B) com antibiótico Baytril®. Foram acompanhados camundongos Balb/c e ST2^{-/-} infectados com 50 cercárias/animal durante 14 semanas de infecção (Balb/c não tratado n= 12 animais; Balb/c tratado n= 8 animais e ST2^{-/-} não tratado n= 10 animais; ST2^{-/-} tratado n=8animais). Análise comparação por Kaplan-Meier, post-test Longrank.

6.8 Parâmetros Nutricionais

6.8.1 Quantificação dos níveis séricos de albumina

A albumina é a mais abundante proteína plasmática, perfazendo 50% das proteínas totais do soro. Os valores desta proteína são considerados, portanto, um importante marcador de desnutrição (Santos *et al.* 2004).

Em ambos os grupos experimentais, Balb/c WT e ST2^{-/-} foi verificado uma redução da concentração sérica de albumina nos animais infectados com *S.mansoni* (gráfico 14). Entretanto, nos animais ST2^{-/-} a redução da concentração de albumina sérica foi progressiva no decorrer da infecção, sendo que na fase crônica esta diferença foi significativa com relação aos animais do grupo controle.

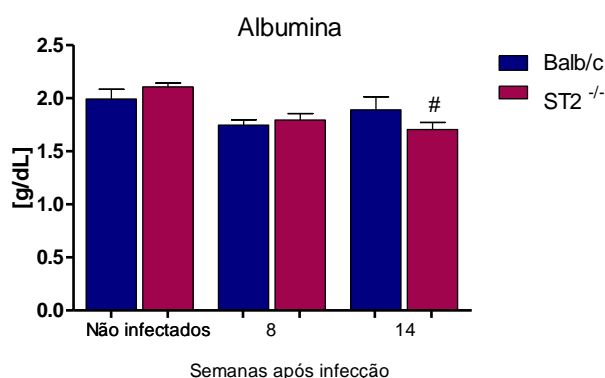


Gráfico 14. Quantificação dos níveis séricos de albumina em amostras de soro dos animais Balb/c WT e ST2^{-/-} de 8 e 14 semanas após infecção com *S.mansoni*. Os valores representam a média ± EPM dos níveis séricos de albumina de camundongos Balb/c WT (fase aguda, n=10; fase crônica, n=8) e ST2^{-/-} (fase aguda, n=11; fase crônica, n=9) infectados por via subcutânea com 50 cercárias/animal e necropsiados após 8 e 14 semanas da infecção. Dados referentes a dois experimentos distintos. Análise ANOVA-post test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

6.9 Parâmetros Hematológicos

6.9.1 Células sanguíneas

Para verificar o desenvolvimento de anemia nos animais infectados foi realizado exame de sangue entre a 8ª e 10ª semana de infecção em camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-}. Os parâmetros hematológicos mostram que a infecção por *S. mansoni* induziu uma redução progressiva no número de hemácias (gráfico 15A) e, conseqüentemente, nos valores de hematócrito (gráfico 15B) e na concentração de hemoglobina (gráfico 15C) até a 9ª semana de infecção, quando os valores foram estatisticamente menores que em animais não infectados do mesmo grupo experimental. Posteriormente, nota-se uma pequena melhora nos parâmetros de anemia, tanto em Balb/c WT como em ST2^{-/-}.

Entretanto, não foram detectadas diferenças significativas na contagem de hemácias, hematócrito ou concentração hemoglobina entre camundongos WT e $ST2^{-/-}$, no decorrer da infecção experimental.

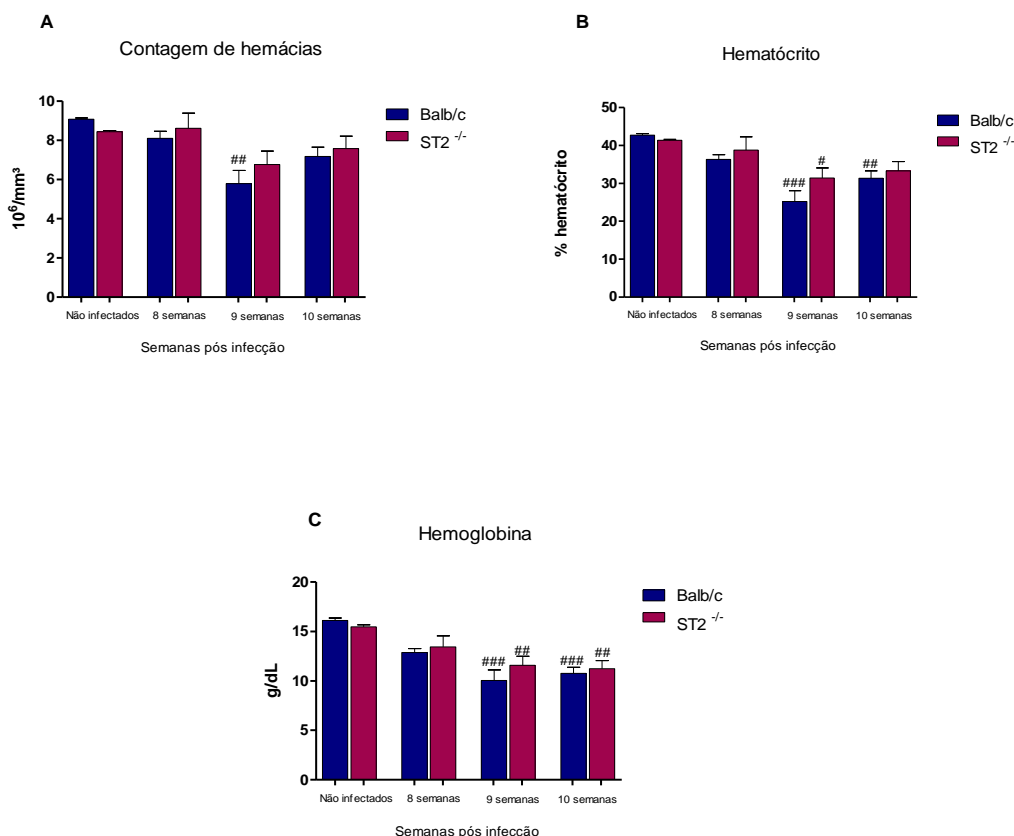


Gráfico 15. Avaliação de células vermelhas em amostras de sangue total dos animais Balb/c WT e $ST2^{-/-}$ de 8, 9 e 10 semanas após infecção com *S.mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM para contagem de hemácias (A), hematócrito (B), hemoglobina (C) encontradas no sangue de camundongos Balb/c WT (8 semanas, n=10; 9 semanas, n=13; 10 semanas, n=16) e $ST2^{-/-}$ (8 semanas, n=10; 9 semanas, n=12; 10 semanas, n=11) infectados por via subcutânea com 50 cercárias/animal e submetidos a coleta de sangue na 8^a, 9^a e 10^a semana de infecção. Resultados obtidos pela máquina hematológica ABC-Vet Animal Blood Counter. **##** representa $p < 0,01$ e **###** $p < 0,001$ em comparação aos animais do mesmo genótipo. Análise ANOVA-post test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

6.9.2 Plaquetas

A avaliação do número de plaquetas na circulação sanguínea dos camundongos WT mostra que não houve diferença estatística deste parâmetro no decorrer da infecção, porém nos camundongos $ST2^{-/-}$ foi observada uma redução significativa na quantidade de plaquetas após 8 semana de infecção em comparação aos $ST2^{-/-}$ não infectado. Esta redução também foi significativa em comparação com os valores encontrados nos camundongos Balb/c WT com o mesmo período de infecção (**gráfico 16**).

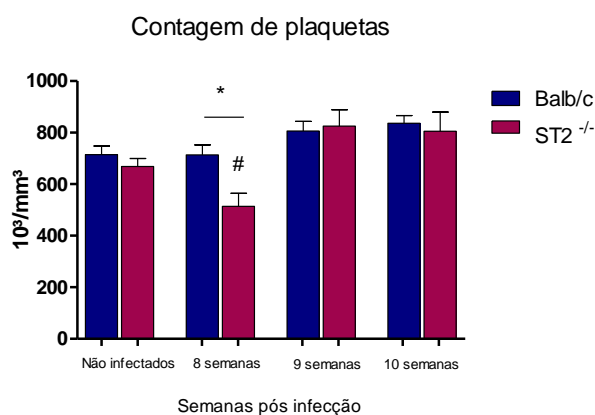


Gráfico 16. Avaliação plaquetária em amostras de sangue total dos animais Balb/c WT e ST2^{-/-} de 8, 9 e 10 semanas após infecção com *S.mansoni*. Os valores representam a média ± EPM para contagem de plaquetas encontradas no sangue de camundongos Balb/c WT (8 semanas, n=10; 9 semanas, n=13; 10 semanas, n= 16) e ST2^{-/-} (8 semanas, n=10; 9 semanas, n=12; 10 semanas, n=11) infectados por via subcutânea com 50 cercárias/animal e submetidos a coleta de sangue na 8^a, 9^a e 10^a semana de infecção. Resultados obtidos pela máquina hematológica ABC-Vet Animal Blood Counter. Análise ANOVA-post test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

6.9.4 Sangue oculto

Com os animais Balb/c e ST2^{-/-} infectados com *Schistosoma mansoni*, e seus controles avaliamos a presença de sangue oculto nas fezes. Na fase aguda esquistossomose experimental (8 semanas de infecção), 80% das amostras de fezes dos camundongos ST2^{-/-} apresentaram sangue oculto, enquanto os animais Balb/c WT apenas 60% das amostras de fezes revelaram sangue oculto (**gráfico 17 e figura 12**). Na fase crônica (14 semanas), foi possível observar que os camundongos deficientes no receptor de ST2^{-/-}, apresentaram mais sangue nas fezes, mostrando um total de 100% das amostras positivas, o contrário foi observado nos camundongos Balb/c em que as porcentagens foram menores nesta fase comparadas a fase aguda, tendo 50% das amostras positivas (**gráfico 17 e figura 12**).

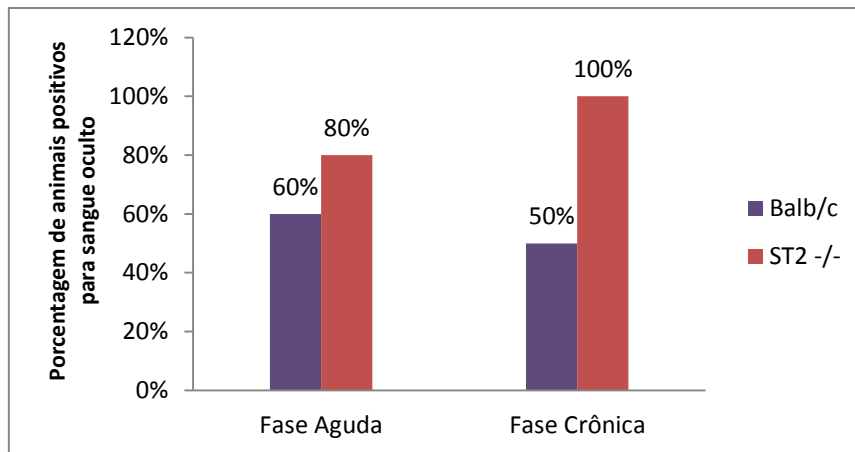


Gráfico 17. Avaliação de sangue oculto nas fezes. Com as fezes dos animais Balb/c e ST2^{-/-} infectados com 25 cercárias/animal, avaliou-se a presença de sangue oculto, com o kit *Hexagon-OBScreen*. Para fase (8 semanas) e fase crônica (14 semanas) utilizou-se n=10 de amostras para cada grupo experimental.

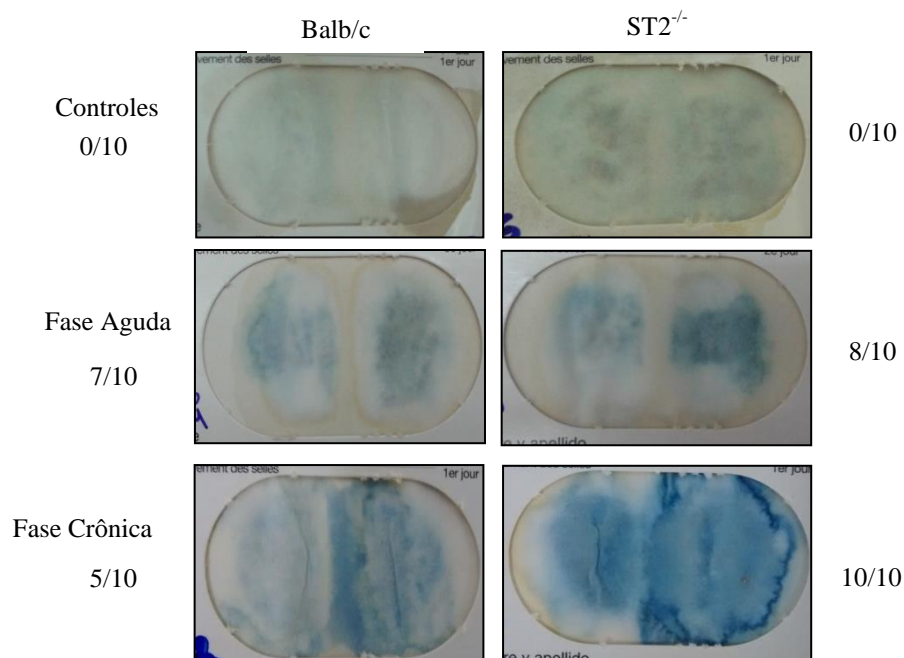


Figura 12. Sangue oculto nas fezes. Cartões teste do kit Hexagon-OBScreen, demonstrando a maior positividade das amostras de camundongos ST2^{-/-} na fase crônica da infecção por *Schistosoma mansoni*.

6.10 Monitoramento do peso

A partir da primeira semana pós-infecção com 50 cercárias/camundongo de *S. mansoni*, todos os animais foram pesados semanalmente até a fase crônica para análise comparativa da gravidade da patologia induzida pela esquistossomose nos camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} (**gráfico 18**). Camundongos Balb/c WT apresentam aumento progressivo de peso no decorrer da infecção, sendo que a média de peso dos animais passou de 22,45 na 3^a semana, para 23,64 na 5^a semana e 24,23 na 8^a semana de

infecção (**gráfico 18A**). O acompanhamento individual do peso dos animais revela que a média de peso do grupo aumenta porque a grande maioria dos animais ganha peso mesmo durante a infecção (**gráfico 18C**). Ao contrário do observado nos animais Balb/c WT, camundongos $ST2^{-/-}$ não apresentam um ganho significativo de peso no decorrer da infecção por *S. mansoni* (**gráfico 18B**). Conforme observado no **gráfico 18D**, a média de peso dos camundongos $ST2^{-/-}$ não aumenta no decorrer da infecção devido a perda brusca de peso de alguns animais do grupo que acabam vindo a óbito.

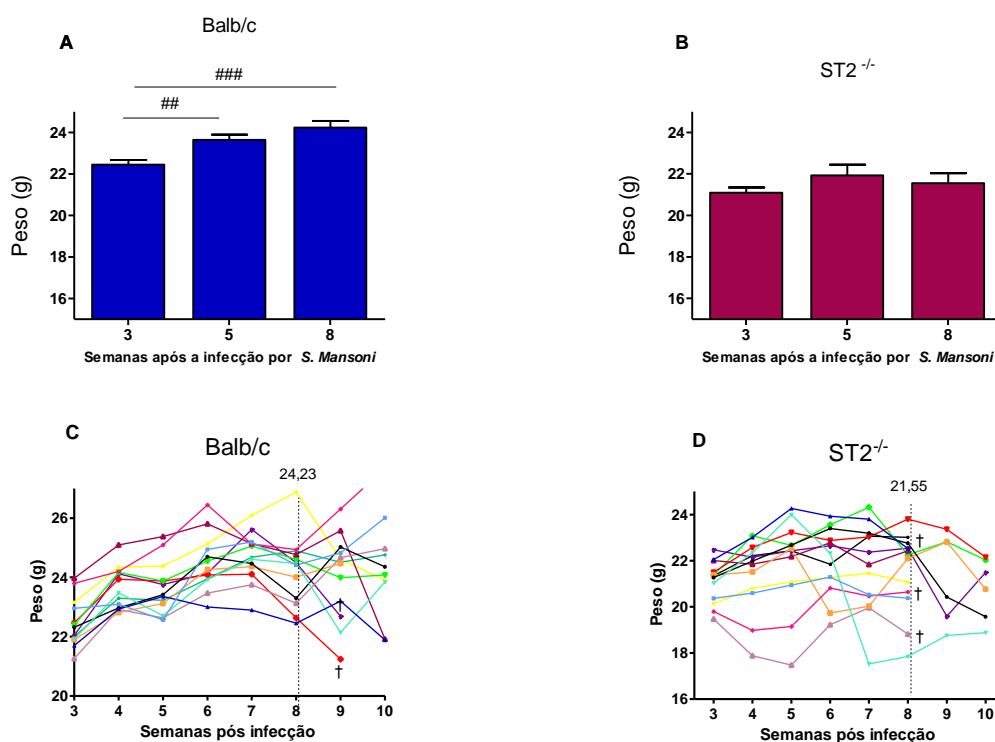


Gráfico 18. Análise comparativa entre o peso corporal dos animais Balb/c WT (A e C) e $ST2^{-/-}$ (B e D) a partir da terceira semana de infecção por *S.mansoni*. Em A e B os valores representam o peso corporal (g) de camundongos Balb/c WT e $ST2^{-/-}$ infectados, respectivamente, durante a 3ª, 5ª e 8ª semana após infecção. Em C e D os valores representam o peso corporal de cada camundongo Balb/c (WT) e $ST2^{-/-}$ em gramas (g) (representado por linhas individuais) correspondente a semana após a infecção com *S.mansoni*. A linha tracejada demonstra a média de peso para os animais durante a 8ª semana. † representa morte após decaimento de peso em cada animal.

7. DISCUSSÃO

Considerada uma citocina da resposta imune inata, IL-33 é crucial para a indução da resposta Th2 associada a infecções por nematódeos e doenças alérgicas, ativando a produção precoce de IL-5 e IL-13 por células do sistema inato de defesa. Além disso, esta citocina promove o controle de bactérias na mucosa intestinal, a proliferação de células epiteliais e estimula a produção de muco, ajudando na remodelação do tecido lesionado em decorrência destas parasitoses (Pastorelli *et al.* 2013; Lopetuso *et al.* 2012). Entretanto, esta via IL-33/ST2 ainda não está bem esclarecida em casos de lesões intestinais causadas por *S.mansoni*. O presente trabalho avaliou o efeito da ativação da via IL33/ST2 nas alterações intestinais induzidas pela infecção experimental por *S. mansoni*, através da análise comparativa da infecção em camundongos selvagens e geneticamente deficientes no receptor de IL-33, ST2. Nossos dados demonstram que a ausência de ativação do receptor ST2 não afetou o número de vermes recuperados nos camundongos infectados, mas sim a patologia da infecção.

Embora nossos dados mostrem que a recuperação de vermes tenha sido semelhante entre os grupos, constatamos que durante a fase aguda da infecção, período em que é iniciada a postura dos ovos, os animais ST2^{-/-} eliminaram mais ovos pelas fezes comparado aos animais Balb/c WT, além de apresentarem maior retenção de ovos no intestino delgado e grosso. Poucos trabalhos avaliam o efeito da via IL-33/ST2 na carga parasitária de infecções por helmintos, não tendo sido relatado trabalhos com trematódeos parasitos. Scalfone *et al.* (2013) demonstrou que em infecções experimentais com *Trichinella spiralis*, o número de larvas recuperadas da musculatura esquelética de animais ST2^{-/-} foi superior comparado aos animais selvagens, este aumento foi associado a diminuição da resposta de citocinas Th2 pelos linfonodos cervicais. Da mesma forma, Ajendra *et al.* (2014) mostrou que ausência do receptor ST2, levou ao aumento da carga parasitária de microfilárias em camundongos infectados com o nematódeo *Litomosoides sigmodontis*.

As funções da citocina IL-33 foram inicialmente descritas por Schmitz *et al.* (2005). Esta citocina é amplamente expressa em vários tipos de células, incluindo fibroblastos, células endoteliais, adipócitos, células epiteliais dos brônquios e intestino (Cayrol & Girard 2009; Lamkanfi & Dixit 2009) e está associada à indução da resposta Th2 devido à liberação precoce de IL-4, IL-5 e IL-13; além disso, a produção de IL-33

contribui para a polarização de macrófagos alternativamente ativados, regulação de células dendríticas e tem efeito direto sob as células T (Rank *et al.* 2009; Hazlett *et al.* 2010). Na esquistossomose, cerca de 40% dos ovos produzidos pelo parasito fica retido nos tecidos do hospedeiro, principalmente no fígado e intestino, e são responsáveis pela indução da resposta Th2, tipo de resposta imunológica responsável pela formação do granuloma esquistossomótico (Chiamonte *et al.* 1999; Fallon *et al.* 2000; Pearce & MacDonald 2002; Wynn *et al.* 2004; Gryssels *et al.* 2006; Souza *et al.* 2011). A reação celular que se forma ao redor do ovo do parasito tem importante papel na morbidade associada à fase crônica da esquistossomose (Ross *et al.* 2002; Andrade 2005; Chuah *et al.* 2014). Assim sendo, o processo da resposta Th2, bem como, a formação do granuloma esquistossomótico intestinal pode ser alterado pela ausência da ativação da via IL-33/ST2, levando as alterações na morbidade, de maneira independente da carga parasitária. Por conseguinte, avaliamos a participação da ativação da via IL-33/ST2 na indução da resposta imune intestinal.

Muitos aspectos analisados em nosso estudo mostraram que o intestino delgado e o intestino grosso apresentaram diferenças na resposta imune induzida pelo parasito. A literatura relata uma grande densidade das células imunes residentes no intestino delgado, o que não é surpreendente devido a sua função de absorção de nutrientes, porém a composição e atuação destas células no intestino grosso é menos conhecida (Bowcutt *et al.* 2014). As diferenças aqui relatadas na concentração de citocinas ou infiltração celular nas amostras de intestino grosso e de intestino delgado dos animais infectados podem se justificar por diferenças inerentes a estes tecidos, mas também podem refletir um maior espalhamento dos ovos no intestino delgado, dificultando a real avaliação da resposta neste tecido.

Um dos primeiros aspectos da resposta imune local comparativamente avaliado nos animais infectados foi à produção de citocinas no decorrer da infecção. Os dados mostraram que camundongos ST2^{-/-} apresentam uma resposta do tipo Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) e da citocina pró-inflamatória IL-17 menores, em relação aos animais Balb/c WT no intestino grosso durante a fase aguda. A importância da ativação da via IL-33/ST2 para a indução da resposta Th2 foi anteriormente descrita em vários modelos de infecção por nematódeos. Ajendra *et al.* (2014) observaram que em camundongos infectados com *Litomosoides sigmodontis* o aumento da concentração de IL-33 é acompanhada por aumento da produção de IL-4 e IL-5 e que camundongos deficientes no receptor ST2 apresentaram níveis reduzidos de IL-4 e IL-5 durante a infecção pelo

nematódeo. Esta redução das citocinas de perfil Th2 nos animais ST2^{-/-} facilitou a sobrevivência das microfilárias, agravando a infecção (Ajendra *et al.* 2014). No modelo de infecção pelo nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis*, Hung *et al.* (2013) demonstraram que a produção de IL-33 é necessária para proteção dos camundongos infectados, sendo relatado que camundongos IL-33^{-/-} infectados tiveram recrutamento inadequado de eosinófilos e produção insuficiente de IL-13, que foi insuficiente para estimulação de alterações intestinais necessárias na expulsão dos vermes. A administração de rIL-33 em camundongos susceptíveis a infecção por *Trichuris muris*, previne a polarização da resposta Th1 e induz produção precoce de IL-4, IL-9 e IL-13 e consequente polarização para a resposta Th2, capaz de controlar a infecção pelo nematódeo (Humphreys *et al.* 2008).

Nossos dados também corroboram os resultados de Townsend *et al.* (2000) em que mostraram que a inoculação intravenosa de ovos de *S. mansoni* em camundongos ST2^{-/-} resultou em formação de granuloma pulmonar com reduzida produção de IL-4 e IL-5, mas não de IFN- γ . Além disso, os autores verificaram que os granulomas pulmonares em resposta aos ovos de *S. mansoni* inoculados em camundongos ST2^{-/-} não apresentaram intensa infiltração de eosinófilos normalmente encontrado em WT.

O receptor transmembrana (ST2L) é expresso em células como mastócitos (Moritz *et al.* 1998), basófilos (Pecaric-Petkovic *et al.* 2009), eosinófilos (Cherry *et al.* 2008), células linfoides inatas tipo 2 (ILC2) ou nuócitos (Neil *et al.* 2010; Mjosberg *et al.* 2011), células dendríticas (Turnquist *et al.* 2009) e células Th2 (Lohning *et al.* 1998), que são ativadas após a associação com a citocina IL-33. O fato do receptor ST2 ser expresso em linfócitos Th2 e não em linfócitos Th1, Th17 e células T regulatórias sugere que IL-33 também atua na amplificação da resposta mediada por células Th2 (Chang *et al.* 2001; Schmitz *et al.* 2005; Nakae *et al.* 2007; Komai-Koma *et al.* 2007). A resposta imune desencadeada por IL-33, é ausente em camundongos deficientes em MyD88, consistente com o papel essencial desta molécula para formação do complexo de ativação do receptor ST2. Isto condiz com estudos prévios que mostram que a indução de IL-33 é dependente de MyD88 para a produção de IL-5 e IL-13 a partir de mastócitos, basófilos e células T (Ho *et al.* 2007; Kroeger *et al.* 2009; Kurowska-Stolarska *et al.* 2008). Estes dados suportam e justificam a redução de citocinas do perfil Th2 observadas no granuloma intestinal em camundongos ST2^{-/-} infectados. Os dados também estão de acordo com as diferenças no perfil de citocinas observadas no granuloma hepático de ST2^{-/-} durante a fase aguda da *S. mansoni*, previamente relatadas

por nosso grupo de pesquisa (Rocha 2015). A menor ativação da resposta local e consequentemente da diferenciação de células Th2 por antígenos secretados pelos ovos do parasito retidos nos tecidos também pode ter contribuído para a redução de leucócitos circulantes observadas nos camundongos ST2^{-/-} com 9 semanas de infecção. Esta redução pode ser consequência da migração destas células para o sítio da infecção, corroborando com este argumento Nausch e colaboradores (2015), evidenciaram pela primeira vez que a proporção das células ILC2 no sangue total de humanos infectados com *S.haematobium* declinou durante a infecção pelo trematódeo, o que pode ser causado, da mesma maneira pelo recrutamento e acumulação destas células no sítio da infecção iniciando desta forma a resposta imune local, levando assim a diminuição destas células no sangue periférico.

Durante a fase aguda da infecção por *S.mansoni*, os eosinófilos são células predominantes no infiltrado celular do granuloma que envolve os ovos do parasita (Scott *et al.* 1989; Chiaramonte *et al.* 1999; Fallon *et al.* 2000; Reiman *et al.* 2006). Nossos dados demonstraram que os camundongos WT apresentaram um aumento significativo na infiltração de eosinófilos (EPO), especialmente no intestino delgado, durante a fase aguda da infecção, isto sugere que estas células foram inicialmente recrutadas para o sítio da infecção para ajudar a formar os granulomas. Posteriormente o processo inflamatório entrou em fase de modulação, onde foi possível observar a redução do número de eosinófilos comparado à fase aguda, nos tecidos infectados. Camundongos ST2^{-/-} infectados mostraram menor atividade de EPO que em WT, especialmente durante a fase aguda da esquistossomose, sugerindo menor ativação e/ou recrutamento de eosinófilos. A redução da eosinofilia tecidual em camundongos ST2^{-/-} era esperada devido aos menores níveis da citocina Th2, especialmente IL-5 encontradas nestes camundongos durante a infecção. Além disto, IL-33, assim como IL-5, pode participar da ativação de eosinófilos, atuando na adesão, liberação de mediadores pró-inflamatórios (ânion superóxido e IL-8), produção de citocinas e quimiocinas, desgranulação celular e tempo de sobrevivência dos eosinófilos (Cherry *et al.* 2008; Pecaric-Petkovic *et al.* 2009; Matsuba-Kitamura *et al.* 2010; Stolarski *et al.* 2010). Dados semelhantes aos nossos, foram ilustrados por Yasuda e colaboradores (2013) em camundongos deficientes na produção de IL-33, que apresentaram redução da produção precoce de IL-5 e IL-13, e da infiltração de eosinófilos e diferenciação de células caliciformes nos pulmões após a migração de larvas de *S. venezuelensis*,

mostrando que IL-33 desempenha um papel crucial para a indução da eosinofilia e hiperplasia das células caliciformes nos pulmões.

Além da menor resposta Th2, a atividade de IL-17 também foi diminuída no granuloma intestinal formado nos camundongos deficientes para o receptor de ST2 infectados por *S. mansoni*. Liew *et al.* (2010), mostraram que em modelos de artrite induzidos por colágeno em camundongos ST2^{-/-} também houve diminuição na produção de citocinas pro-inflamatórias incluindo IL-17, TNF e INF- γ . Recentemente, Vocca e colaboradores (2015) descreveram a participação da via IL-33/ST2 na indução da resposta Th2/IL-31 e Th17 em pacientes com doenças alérgicas pulmonares. Esta via pode estar envolvida no progresso dos quadros de asma, influenciando a produção de IL-31 através de células Th17. Os autores observaram que no plasma de pacientes com rinite e aqueles que apresentavam rinite e asma, os níveis de IL-33, IL-31 e IL-17 estavam elevados e foram associados com a gravidade da resposta alérgica.

A produção de IL-17 está amplamente relacionada com o recrutamento de neutrófilos. Ao analisar a quantidade relativa de neutrófilos recrutados no intestino delgado e grosso durante a infecção, foi verificado que na fase aguda da esquistossomose os camundongos ST2^{-/-} apresentaram uma redução significativa da atividade MPO em comparação aos camundongos WT. Alves-Filho e colaboradores (2010) demonstraram que a citocina IL-33 bloqueia GRK2 (G protein-coupled receptor kinase-2), uma proteína quinase que inibe a ativação do receptor de quimiocinas CXCR2, responsável pelo recrutamento de neutrófilos para o sítio da infecção. Os neutrófilos são dificilmente encontrados no intestino, embora haja um grande recrutamento destas células durante a resposta às infecções ou injúrias ao tecido, o que é uma característica de doenças que acometem o sistema gastrointestinal (Bowcutt *et al.* 2014). Quando recrutados e ativados os neutrófilos secretam moléculas antimicrobianas, espécies reativas de oxigênio, quimiocinas e citocinas inflamatórias que recrutam células dendríticas e macrófagos para dentro da mucosa intestinal (Hayashi *et al.* 2003). Neutrófilos são vistos inicialmente durante a resposta imune inata e contribuem para inflamação através da produção de citocinas IL-17 e IL-23 e podem atuar como apresentadores de antígenos, promovendo a diferenciação de células Th1 para Th17 (Abdallah & Denkers 2012; Mei *et al.* 2012). Dessa maneira, podemos justificar os menores valores de MPO encontrados em nosso trabalho para os camundongos ST2^{-/-}, à ausência da ativação da citocina IL-33, dificultou o recrutamento de neutrófilos e conseqüentemente a produção de citocina IL-17.

Em casos de infecções os neutrófilos podem contribuir para danos no tecido do hospedeiro, através da produção de proteases ou mediadores citotóxicos como espécies reativas de oxigênio (Cascao *et al.* 2010). Neutralizando a ação da citocina IL-17 em camundongos C57BL/6 infectados com *S. japonicum*, observou-se que estes camundongos apresentaram menor morbidade, devido à baixa expressão de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como IL-6, IL-1 β , CXCL1 e CXCL2, além da redução do número de neutrófilos infiltrados (Zhang *et al.* 2012). Por outro lado, a dificuldade de recrutar neutrófilo pode afetar o controle de bactérias da microbiota intestinal, favorecendo a translocação bacteriana no intestino já lesionado pela eliminação dos ovos de *S. mansoni*, contribuindo assim para quadros de co-infecção e podendo levar o paciente a quadro de sepse (Lima *et al.* 2015), este fato poderia justificar a mortalidade elevada observada em camundongos ST2^{-/-} infectados. A importância da translocação de bactérias através da mucosa intestinal lesionada para a morbidade da esquistossomose humana foi estabelecida pela identificação de bactérias gram-negativas, principalmente *E.coli* em 95,7 % dos 51 pacientes submetidos à cirurgia devido à hipertensão portal causada pela esquistossomose (Ferraz *et al.* 2005). Lima e colaboradores (2012) também foram capazes de confirmar translocação bacteriana em camundongos Swiss experimentalmente infectados com *S.mansoni*. Recentemente este mesmo grupo de pesquisa (Lima *et al.* 2015), realizaram um novo estudo com camundongos esplenectomizados e/ou infectados com *S. mansoni* e mais uma vez constataram que 60% dos animais infectados apresentaram contaminação bacteriana no sangue por *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Nossos dados mostram claramente que camundongos Balb/c infectados, tanto WT como ST2^{-/-} não apresentaram translocação bacteriana, pois a cultura de sangue e de órgãos (linfonodos mesentéricos, fígado e baço) foram todas negativas, incluindo para os animais que receberam o antibiótico Baytril®, o que mostrou que realmente a causa da mortalidade, não estava sendo causada por infecções bacterianas.

Apesar da redução da resposta Th2 e da infiltração de granulócitos no granuloma intestinal durante a fase aguda da esquistossomose, a análise histopatológica revelou que nos animais ST2^{-/-} os granulomas de fase crônica apresentaram um aspecto maior devido ao grande infiltrado celular que foi recrutado, além de desorganizado devido à falta de uma matriz extracelular bem desenvolvida. Também foi verificado que grande parte das células era mononuclear, possivelmente macrófagos e linfócitos. Apesar da atividade de NAG não ter sido estatisticamente diferente entre os

camundongos WT e ST2^{-/-}, a atividade de arginase (Arg1), que caracteriza macrófagos alternativamente ativados (ou M2) foi menor em camundongos ST2^{-/-}. Os macrófagos são células hematopoiéticas especializadas que estão distribuídas por diferentes tecidos e órgãos, onde eles desenvolvem um papel importante na homeostase, remodelação de tecido e na defesa contra patógenos (Kurowska-Stolarska *et al.* 2009). Dependendo do tipo de citocinas no micro-ambiente em que os macrófagos se encontram, eles podem ser diferencialmente ativados em M1 (ou classicamente ativado) e M2 (alternativamente ativados (Strauss-Ayali *et al.* 2007). Os macrófagos M1 são ativados através de citocinas do tipo 1 e pelos antígenos microbianos, fazendo com que estes macrófagos estejam associados a quadros inflamatórios desencadeados pela resposta imune tipo 1, além disso estes tornam-se potentes células efectoras contra patógenos intra-celulares (Kurowska-Stolarska *et al.* 2009). Os macrófagos M2 são mais complexos e podem ser divididos em três grupos: M2a estes são induzidos por IL-4, IL-13 ou IL-21; M2b são induzidos por imuno complexos e agonistas dos receptores da citocina IL-1 ou TLRs; e os M2c são induzidos por IL-10, TGF- β ou glucocorticóides (Gordon 2003; Benoit *et al.* 2008). Macrófagos alternativamente ativados (M2) modulam a resposta inflamatória do tipo 1, entretanto, promovem e regulam a resposta imune do tipo 2, angiogênese e reparação tecidual (Gordon 2003).

A citocina IL-33 parece ser um potencial ativador de macrófagos alternativamente ativados durante a resposta imune inata e adaptativa. Este dado foi relatado no trabalho de Kurowska-Stolarska e colaboradores (2009), que demonstraram que IL-33 amplifica fortemente a expressão de arginase I e Ym1 como também a produção das quimiocinas CCL24 e CCL17 que recrutaram eosinófilos, mastócitos e células T no modelo murino de inflamação respiratória, resultando em intensificação da doença devido ao excesso da resposta Th2.

A deficiência da indução da resposta Th2 e da diferenciação de macrófagos M2 em camundongos ST2^{-/-} também pode ter contribuído para a desorganização da matriz extracelular dos granulomas intestinais da fase crônica. No modelo experimental de fibrose pulmonar (Li *et al.* 2014), foi verificado que IL-33/ST2 participa da ativação dos macrófagos alternativamente ativados (M2) e aumentam a produção de IL-13 e TGF- β 1, sendo que estas citocinas induzem a proliferação e diferenciação fibroblastos e a síntese de colágeno, contribuindo para remodelação tecial e para a produção da fibrose.

A esquistossomose pode acarretar morbidades sistêmicas nos indivíduos infectados, como anemia, desnutrição, dificuldade de crescimento em crianças, resultando na deficiência no metabolismo de ferro, aptidão física e funções cognitivas (Friedman *et al.* 2005a; Colley *et al.* 2014). A anemia é o sintoma mais frequentemente associado à esquistossomose tanto nos quadros de esquistossomose intestinal como nos quadros graves de hepatoesplenomegalia, sendo mais intensa em portadores de infecções mais graves (King & Dangerfield-Cha 2007). Durante muitos anos vem sendo discutido os possíveis mecanismos responsáveis pela anemia reportada em hospedeiros infectados por parasitos do gênero *Schistosoma*, entre eles, deficiência de ferro por perda de sangue extracorpórea, por exemplo, eliminação de sangue gastrointestinal e nas fezes, pelo sequestro esplênico, hemólise auto-imune e a anemia desenvolvida pela inflamação (Friedman *et al.* 2005b). Nossos resultados confirmam que a infecção por *S.mansoni* resultou em anemia nos camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-}, mas sem diferença significativa entre estes grupos. Este foi um resultado surpreendente e merece ser melhor estudado já que camundongos ST2^{-/-} apresentaram maior frequência de sangue nas fezes, tiveram redução significativa da concentração sérica de albumina e apresentaram maior perda de peso.

Segundo Friedman e outros autores (2005b) a presença e/ou perda de sangue nas fezes contribui para casos de anemia somente em infecções de *S.mansoni* e *S.japonicum* de alta intensidade. Um estudo recente de Schunk *et al.* (2015) comparando a eficácia de algumas técnicas para diagnóstico da esquistossomose, verifica que a confirmação de sangue oculto nas fezes pela técnica de Hemocult[®] em conjunto com positividade do PCR ou Kato-Katz é um diagnóstico mais preciso da doença. Caso semelhante de sangue oculto nas fezes por infecções de helmintos foi descrito por Kanzaria e colaboradores (2005), demonstrando que pacientes infectados por *S.japonicum* apresentaram 3,5 vezes mais sangue nas fezes do que os outros pacientes que estavam infectados com *Trichuris trichiuria*. Posteriormente, Bustinduy *et al.* (2013) avaliando pacientes esquistossomóticos no distrito de Buliisa na Uganda, constataram que 90% das crianças com quadros graves da doença foram positivas para sangue oculto nas fezes.

As análises histopatológicas e a detecção de sangue oculto nas fezes dos animais avaliados em nossos experimentos comprovaram que a infecção por *S.mansoni* danifica a mucosa intestinal, e que esta lesão foi mais intensa em animais ST2^{-/-}. As alterações da resposta imune induzida pela deposição de ovos do parasito nos animais

deficientes resultaram em formação de granulomas intestinais desorganizados com grande celularidade e pouca deposição de matriz extracelular que não desenvolve aspecto de modulação na fase crônica da esquistossomose. Esta reação celular parece não ser tão eficiente na remodelação da mucosa intestinal lesada pela deposição e eliminação dos ovos do parasito, podendo justificar maior sangramento intestinal observada nos camundongos ST2^{-/-} infectados. Outro fator que pode ter influenciado no sangramento exacerbado dos camundongos ST2^{-/-} infectados é a redução significativa da contagem de plaquetas detectada após a 9ª semanas de infecção, que não foi detectada nos camundongos Balb/c WT durante a infecção por *S. mansoni*.

Os vermes adultos de *S. mansoni* vivem em íntimo contato com o endotélio vascular e, apesar da considerável biomassa, não estimulam um processo de coagulação (Lenzi *et al.* 1988). Este parasito evita a coagulação sanguínea, pois no tegumento de machos adultos é encontrada calicreína, uma precursora de bradiquinina, um vasodilatador (Carvalho *et al.* 1998), bem como apirase, uma ATP-difosfohidrolase envolvida com agregação plaquetária e tromborregulação (Vasconcelos *et al.* 1993; Verovjski-Almeida *et al.* 2003), e bilharzina, um inibidor da proteína plasmática denominada de fator XIIa ou fator Hageman, que desencadeia o processo inicial de coagulação, ao entrar em contato com superfícies carregadas negativamente (Tsang & Damian 1977; Tsang *et al.* 1977). Além disto, *S. mansoni* sendo um parasita intravascular, interage com vários componentes do sangue do hospedeiro, incluindo as plaquetas (Da'dara & Skelly 2014). A partir do momento em que *S. mansoni* penetra no sistema vascular do hospedeiro é visto um consumo de plaquetas do sangue circulante, resultando em diminuição da contagem das mesmas (Stanley *et al.* 2003b). Segundo Ngaiza & Doenhoff (1990), os ovos de *Schistosoma* são potencialmente trombogênicos, e isto também leva ao consumo de plaquetas circulantes. Em linhagens de camundongos que desenvolvem esquistossomose grave, como CBA, a infecção por *S. mansoni* causa diminuição plaquetária (trombocitopenia) ao longo da infecção (Ngaiza & Doenhoff 1987; Da'dara & Skelly 2014). Na população humana, estudos realizados por Lambertucci *et al.* (2007) e Medeiros *et al.* (2014) relataram que em pacientes com esquistossomose a contagem de plaquetas declina progressivamente com o aumento da severidade da doença. Entretanto, as plaquetas também desempenham um papel importante de defesa contra alguns patógenos, já tendo sido relatado seu papel protetor contra os esquistossômulos em infecções de *S. mansoni* (Stanley *et al.* 2003b).

Portanto, a infecção por *S.mansoni* acarreta quadros de anemia e desnutrição, e a ausência da via IL-33/ST2 em animais infectados, leva a sintomas intestinais mais graves, com lesões da mucosa devido à má formação dos granulomas e maior sangramento, além da maior mortalidade devido a um conjunto de pequenas alterações hepáticas e intestinais. Esses resultados evidenciam um papel crucial da via IL-33/ST2 no modelo esquistossomótico, de maneira a interferir na indução/amplificação da resposta imune do Th2 e na composição celular do granuloma intestinal, embora o mecanismo exato de como estivesse atuando não esteja completamente esclarecido.

8. CONCLUSÃO

- Não houve diferença estatística na recuperação de vermes adultos de *S. mansoni* nos camundongos ST2^{-/-} em relação aos camundongos Balb/c WT, tanto na fase aguda como na crônica da esquistossomose. Entretanto, camundongos ST2^{-/-} eliminam mais ovos nas fezes durante a fase aguda, e apresentam uma maior retenção de ovos no intestino delgado e grosso durante a fase crônica, em relação aos camundongos WT;
- A quantificação de citocinas no granuloma intestinal induzido pelos ovos de *S. mansoni* mostrou diminuição significativa da concentração de IL-17, IL-4, IL-5 e IL-13, no intestino grosso durante a fase aguda da infecção experimental em camundongos ST2^{-/-} comparação com WT. É importante ressaltar que estas citocinas regulam a ativação de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos que participam da formação e modulação do granuloma capaz de conter a lesão tecidual;
- O nível de atividade de EPO, MPO no intestino delgado e grosso sugere uma redução da infiltração de eosinófilos e neutrófilos nos camundongos ST2^{-/-}. Apesar de não ter sido detectado diferença na atividade de NAG entre os grupos, indicando que o recrutamento de macrófagos foi semelhante, os animais ST2^{-/-} apresentaram menor atividade de arginase no intestino delgado, sugerindo deficiência na diferenciação de macrófagos alternativamente ativados;
- A análise histopatológica do intestino de animais infectados revelou que a deposição de ovos de *S. mansoni* em camundongos ST2^{-/-} resultou em grande infiltrado de células mononucleares com pouca matriz extracelular depositada de maneira desorganizada ao redor dos ovos do parasito, sugerindo que a ativação da via IL-33/ST2 participa da formação e modulação do granuloma esquistossomótico intestinal.

- A infecção por *S.mansoni* resultou em uma redução do número de leucócitos e plaquetas nos camundongos ST2^{-/-}, gerando quadros de menor coagulação sanguínea e maior sangramento nas lesões da mucosa intestinal ocasionadas pela maior retenção dos ovos no intestino destes animais em comparação aos WT, porém estes fatores não levaram a infecções secundárias bacterianas nem a translocação bacteriana;
- Camundongos Balb/c WT e ST2^{-/-} apresentaram anemia semelhante, entretanto camundongos ST2^{-/-} não ganham peso durante a infecção e o perdem bruscamente a partir da 8ª semana de infecção levando-os a óbito.
- Finalmente, concluímos que via IL-33/ST2 interfere na patologia da esquistossomose e que animais ST2^{-/-} apresentam maior mortalidade devido a um conjunto de alterações hepáticas e intestinais.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abath FGC, Morais CNL, Montenegro CEL, Wynn TA, Montenegro SML 2006. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies?. *Trends in Parasitology*: 22 (2) 85-91.
- Abdallah DAS & Denkers EY 2012. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *Front Immunol* 3: 382.
- Ajendra J, Specht S, Neumann AL, Gondorf F, Schmidt D, Gentil K, Hoffmann WH, Taylor MJ, Hoerauf A, Hübner MP 2014. ST2 Deficiency Does Not Impair Type 2 Immune Responses during Chronic Filarial Infection but Leads to an Increased Microfilaremia Due to an Impaired Splenic Microfilarial Clearance. *PLoS ONE* 9(3): e93072.
- Akiho H, Blennerhassett P, Deng Y, Collins SM 2002. Role of il-4, il-13, and stat6 in inflammation-induced hypercontractility of murine smooth muscle cells. *Journal of physiology – gastrointestinal and liver physiology*: 282 226–232.
- Albert TK, Laubinger W, Müller S, Hanisch FG, Kalinski T, Meyer F, Hoffmann W. 2010. Human intestinal TFF3 forms disulfide-linked heteromers with the mucus associated FCGBP protein and is released by hydrogen sulfide. *Journal of Proteome Research*: 9(6) 3108–3117.
- Alisson AC, Andrade Z, Brunner KT, Butterworth AE, Capron A, Cohen S, Colley DG, Coombs RRA, David JR, Davis A, Hoffman DB, Hopewood BCC, Hoube U, Jordan P, Lambert PH, Mahmoud AAF, Sher A, Smithers SR, Sturrock RF, Torrigian G, Warren KS, Webbe G, Weigle W 1974. Immunology of schistosomiasis. *Bull World Health Organ* 51: 553-595.
- Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA Jr, Auxiliadora-Martins M, Basile-Filho A, McKenzie AN, Xu D, Cunha FQ, Liew FY 2010. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med* 16(6):708-12.
- Amaral RS, Tauil PL, Lima DD, Engels D. 2006. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro: 101(Suppl. I) 79-85.
- Amatucci A, Novobrantseva T, Gilbride K, Brickelmaier M, Hochman P, Ibraghimov A 2007. Recombinant ST2 boosts hepatic Th2 response in vivo. *J Leukoc Biol* 82: 124–32.
- Andrade ZA, Cheever AW 1971. Alterations of the intrahepatic vasculature in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg* 20(3): 425-432.
- Andrade ZA 2005. Regressão da fibrose hepática. *Rev Soc Bras Med Trop* 38: 314-320.

- Andrade ZA 2008. Patologia da Esquistossomose Humana. In Carvalho, O.S.(Org); Coelho PMZ (Org); Lenzi HL (Org). *Schistosoma mansoni & Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar*: 547-568. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz.
- Andrade ZA & Prata A 1963. Asymptomatic schistosomiasis studied by needle biopsy of the liver. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*: 12 (5) 236-242.
- Araújo FG, Coelho PMZ, Pereira LH, Pellegrino J 1977. *Schistosoma mansoni*: impairment of the cell mediated immune response in mice. *Clinical and Experimental Immunology* : 28 289-291.
- Araújo MI, De Jesus AR, Bacellar O 1996. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur J Immunol* 26: 1399-1403.
- Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Vieira LQ, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology*: 78 (2) 352–358.
- Barcelos LS, Talvani A, Teixeira AS, Vieira LQ, Cassali GD, Andrade SP, Teixeira MM 2005. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology* 78 352-358.
- Bartley PB, Ramm GA, Jones MK, Ruddell RG, Li YS & Mcmanus DP 2006. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. *International Journal of Parasitology*: 36 993-1001.
- Baumgart M, Tompkins F, Leng J, Hesse M 2006. Naturally Occurring CD4 Foxp3 Regulatory T Cells Are an Essential, IL-10-Independent Part of the Immunoregulatory Network in *Schistosoma mansoni* Egg-Induced Inflammation. *J Immunol* (176): 5374-5387.
- Benoit M, Benoît Desnues B, Mege JL 2008. Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology* 3733-3739.
- Bina JC & Prata A 2003. Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarandi: I *Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop*.(36), 2, 211-216.
- Boros DL, Pelley RP; Warren KS 1975. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in Schistosomiasis mansoni. *J.Immunol.* 114, 1437–1441.
- Boros DL & Warren KS 1970. Delayed Hypersensitivity-Type Granuloma Formation And Dermal Reaction Induced And Elicited By a Soluble Factor Isolated From *Schistosoma Mansoni* Eggs. *The Journal of Experimental Medicine*: 488-507.
- Boros LB & Wynn TA 2011. Macrophage activation governs schistosomiasis-induced inflammation and fibrosis. *Eur. J. Immunol.*(41): 2470–2525.

- Bowcutt R, Forman R, Glymenaki M, Carding SR, KJ, Cruickshank SM 2014. Heterogeneity across the murine small and large intestine. *World J Gastroenterol* 20(41): 15216-15232.
- Burke ML, Jones MK, Gobert GN, Li YS, Ellis MK & McManus DP 2009. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*: 31 163-176.
- Bustinduy AL, Sousa-Figueiredo JC, Adriko M, Betson M, Fenwick A, Kabatereine N, Stothard RJ 2013. 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* 7(11): e2542.
- Butterworth AE, Capron M, Cordingley JS, Dalton PR, Dunne DW, Kariuki HC, Kimani G, Koech D, Mugambi M, Ouma JH, Prentice MA, Richardson BA, ARAP-Siongok TK, Taylor DW 1985. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune response. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg* (79) 393-408.
- Caldas IR, Campi-Azevedo AC, Oliveira LF, Silveira AM, Oliveira RC & Gazzinelli G 2008. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Tropica*:108(2-3) 109-117.
- Carvalho WS, Lopes CT, Juliano L, Coelho PM, Cunha-Melo JR, Beraldo WT, Pesquero JL 1998. Purification and partial characterization of kininogenase activity from *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology* 117 (4) 311-319.
- Carvalho E.M & Andrade Z.A 2005. Imunopatologia da Esquistossomose. In: Coura J.R. (Ed.) *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*: Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.I.
- Cascao R, Rosario HS, Souto-Carneiro MM, Fonseca JE 2010. Neutrophils in rheumatoid arthritis: more than simple final effectors. *Autoimmun Rev* 9: 531–535.
- Cayrol C & Girard JP 2009. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U SA*: 106 9021-9026.
- Chan WL, Pejnovic N, Lee CA, Al-Ali NA 2001. Human IL-18 Receptor and ST2L Are Stable and Selective Markers for the Respective Type 1 and Type 2 Circulating Lymphocytes. *The Journal of Immunology* 167:1238-1244.
- Cheever AW, Duvall RH, Hallack TAJR, Minker RG, Malley JD, Malley KG 1987. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* (37) 1 85-97.
- Cheever AW, Poindexter RW, Wynn TA 1999. Egg laying is delayed but worm fecundity is normal in SCID mice infected with *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* with or without recombinant tumor necrosis factor alpha treatment. *Infect Immun* 65: 2201-2208.

- Cheever AW, Hoffmann KF & Wynn T 2000. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunology Today*: 21 465–466.
- Cherry WB, Yoon J, Bartemes KR, Iijima K & Kita H 2008. A novel IL-1 family cytokine, IL-33, potently activates human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol* 121: 1484–1490.
- Chiaromonte MG, Donaldson DD, Cheever AW, Wynn TA 1999. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest* 104: 777-785.
- Chuah C, Jones MK, Burke ML, McManus DP & Gobert GN 2014. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in Parasitology*: 30 141-150.
- Coelho PM, Nogueira RH, Lima WS, Cunha MC 1982. *Schistosoma mansoni*: experimental bovine schistosomiasis. *Rev Inst Med Trop* 24(6):374-7.
- Coelho PMZ 1995. Resistência e susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. In Barbosa, FS. Tópicos em Malacologia Médica, Ed. Fiocruz: 208-217.
- Colley DG, Bustinduy AL, Secor EW, King CH 2014. Human schistosomiasis. *The Lancet*: 28 (383) 2253-2264.
- Coura JR & Amaral RS, 2004. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro: 99(Suppl. I): 13-19.
- Coura JR, Coura LC, Kalache A 1970. Esquistossomose aguda autóctone de foco na cidade do Rio de Janeiro. Estudo de 22 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*: 6 387-96.
- Da'dara A.A & Skelly P.J 2014. Schistosomes versus platelets. *Thrombosis Research*. 134 1176-1181.
- D'Andrea PS; Gentile R; Maroja LS; Maldonado Jr A; Cerqueira R; Rey L 2000. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea-Trematoda) in a naturally infected population of water-rat *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil. *Parasitology* (120) 573–582.
- De Jesus AR, Silva A, Santana LB, Magalhães A, De Jesus AA, Almeida RP, Rêgo MAV, Burattini MN, Pearce EJ, Carvalho EM 2002. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of Infectious Disease*: 185 98–105.

- Deplancke B & Gaskins HR 2001. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *American Journal of Clinical Nutrition*: 73 (6) 1131S–1141S.
- Dessein AJ, Hillaire D, Elwali NE, Marquet S, Mohamed-Ali Q, Mirghani A, Henri S, Abdelhameed AA, Saeed OK, Magzoub MM, Abel L 1999. Severe fibrosis in *S. mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interfero- γ receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.*, (65) 709-721.
- Drummond SC, Silva LCS, Amaral RS, Sousa-Pereira SR, Antunes CM, Lambertucci, JR 2006. Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (101) 37-44.
- Dunne DW & Pearce EJ 1999. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes Infect* (1) 533-560.
- Dunn MA, Rojkind M, Warren KS, Hait PK, Rifas L, Seifter S 1977. Liver Collagen Synthesis in Murine Schistosomiasis. *The Journal of Clinical Investigation* (59) 666-674.
- Elias D, Akuffo H, Thors C, Pawlowski A, Britton S 2005. Low dose chronic *Schistosoma mansoni* infection increases susceptibility to *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. *Clinical & Experimental Immunology*: 139 398-404.
- Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L 2002. The global epidemiological situation of schistosomes: new approaches to control and research. *Acta Tropical*:82 (2) 130-146.
- Fagundes CT, Amaral FA, Souza ALS, Vieira AT, Xu D, Liew FY, Souza DG, Teixeira MM 2007. ST2, an IL-1R family member, attenuates inflammation and lethality after intestinal ischemia and reperfusion. *Journal of Leukocyte Biology*: 81(2) 492–499.
- Fairfax, K; Nascimento M; Huang SCC; Everts B, Pearce EJ 2012. Th2 responses in schistosomiasis. *Semin Immunopathol* 34:863–871.
- Falcão PL, Malaquias LC, Martins-Filho OA, Silveira AM, Passos VM, Prata A 1998. Human Schistosomiasis mansoni: IL-10 modulates the in vitro granuloma formation. *Parasite Immunol* 20: 447-54.
- Fallon PG 2000. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunology Today*:21 29–35.
- Ferraz AA, Campos JM, Júnior JG, De Albuquerque AC, Ferraz EM 2005. Gut bacterial translocation and postoperative infections: a prospective study in schistosomal patients. *Surg Infect (Larchmt)*.6(2) 197-201.

- Friedman JF, Kanzaria HK, Acosta LP, Langdon GC, Manalo DL, Wu H, Olveda RM, McGarvey ST, Kurtis JD 2005. Relationship between *Schistosoma japonicum* and nutritional status among children and young adults in Leyte, the Philippines. *Am J Trop Med Hyg* 72: 527–33.
- Friedman JF, Kanzaria HK, McGarvey ST 2005 (b). Human schistosomiasis and anemia: the relationship and potential mechanisms. *Trends in Parasitology* (21) 8 386-392.
- Galeev Y, Lishmanov Y, Aparcin K, Popov M, Salato O 2009. Scintigraphic visualization of bacterial translocation in experimental strangulated intestinal obstruction. *Journal of Nuclear Medicine*: 36 1822-1828.
- Gao Q, Li Y, Li M 2015. The potential role of IL-33/ST2 signaling in fibrotic diseases. *Journal of Leukocyte Biology*: 98 15-22.
- García-Miguel M, Gonzáles MJ, Quera R, Hermoso MA 2013. Innate Immunity Modulation by the IL-33/ST2 System in Intestinal Mucosa. *BioMed Research Internacional*: 1- 13.
- Gendler SJ & Spicer AP 1995. Epithelial mucin genes. *Annual Review of Physiology*: 57 607–634.
- Gentile R; D’Andrea PS; Cerqueira R; Maroja LS 2000. Population and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. *Stud. Neotrop. Fauna & Environ.* (35) 1–9.
- Gentile R, Costa-Neto SF, Gonçalves MML, Bonecker ST, Fernandes FA, Garcia JS, Barreto MGM, Soares MS, Andrea PSD, Peralta JM, Rey L 2006. An ecological field study of the water-rat *Nectomys squamipes* as a wild reservoir indicator of *Schistosoma mansoni* transmission in an endemic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz* : 101, p.111-117.
- Green AP, Mangan F, Ormerod JE 1980. Induction of cell infiltration and acid hydrolase release into the peritoneal cavity of mice. *Inflammation* 4:205–213.
- Grenfell RFQ, Matins W, Enk M, Almeida A, Siqueira L, Silva-Moraes V, Oliveira E, Carneiro NFF, Coelho PMZ 2013. *Schistosoma mansoni* in a low-prevalence area in Brazil: the importance of additional methods for the diagnosis of hard-to-detect individual carriers by low-cost immunological assays. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*:108 (3) 328-334.
- Gryseels B, Polman K, Clerinx J & Kestens L 2006. Human schistosomiasis. *The Lancet*: 368 1106–1118.
- Gryssels B 2012. Schistosomiasis. *Infectious Diseases Clinics of North American*: 26 383-397.

Grzych JM, Pearce E, Cheever A, Caulada ZA, Caspar P, Heiny S, Lewis F, Sher A 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *Journal of Immunology*: 146 1322–1327.

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

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

Hammerich L & Tacke F 2014. Interleukins in chronic liver disease: lessons learned from experimental mouse models. *Clin Exp Gastroenterol* 7:297-306.

Hazlett LD, McClellan SA, Barrett RP, Huang X, Zhang Y, Wu M, Van Rooijen N, Szliter E 2010. IL-33 Shifts Macrophage Polarization, Promoting Resistance against *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis. *IOVS* (51) 3 1524-1532.

Hayashi F, Means TK, Luster AD 2003. Toll-like receptors stimulate human neutrophil function. *Blood Journal*: 102 (7) 2660–2669.

Hepworth MR, Maurer M, Hartmann S 2012. Regulation of type 2 immunity to helminths by mast cells. *Gut Microbes* (3) 5 476-481.

Hesse M, Piccirillo CA, Belkaid Y, Prufer J, Mentink-Kane M, Leusink M, Cheever AW, Shevach EM, Wynn TA 2004. The Pathogenesis of Schistosomiasis Is Controlled by Cooperating IL-10-Producing Innate Effector and Regulatory T Cells. *J Immunol* 172(5):3157-66.

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

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

Ho LH, Ohno T, Oboki K, Kajiwara N, Suto H, Iikura M, Okayama Y, Akira S, Saito H, Galli SJ, Nakae S 2007. IL-33 induces IL-13 production by mouse mast cells independently of IgE-FcεRI signals. *J Leukoc Biol* 82: 1481–1490.

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

Hoffmann KF, Wynn TA, Dunne DW 2002. Cytokine-mediated host responses during Hogan SP, Seidu L, Blanchard C, Groschwitz K, Mishra A, Karow ML, Ahrens R, Artis D, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Rothenberg ME 2006. Resistin-like molecule β regulates innate colonic function: barrier integrity and

inflammation susceptibility. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*: 118 (1) 257–268.

Hogan SP, Seidu L, Blanchard C, Groschwitz K, Mishra A, Karow ML, Ahrens R, Artis D, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Rothenberg ME 2006. Resistin-like molecule b regulates innate colonic function: Barrier integrity and inflammation susceptibility. *J Allergy Clin Immunol* (118) 257-267.

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

Hung LY, Lewkowich IP, Dawson LA, Downey J, Yang Y, Smith DE, Herbert DR 2013. IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical Type 2 immunity against hookworm. *Proc Natl Acad Sci* 110(1):282-87.

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

Kanzaria HK, Acosta LP, Langdon GC, Manalo DL, Olveda RM, Mcgarvey ST, Kurtis JD, Friedman JF 2005. *Schistosoma japonicum* and occult blood loss in endemic villages in Leyte, the Philippines. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 72(2) 115–118

Katz N, Chaves A, Pellegrino J 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in Schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop* 14(6):397-400.

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

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

Katz N 2014. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose e Geo-helminthos. Disponível em: <http://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/inquerito-nacional-de-prevalencia-da-esquistossomose-e-geo-helminthos/>. Acesso em: 12 fevereiro 2015.

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

Kheir MM, Eltoun IA, Saad AM, Ali MM, Baraka OZ, Homeida MM 1999. Mortality due to schistosomiasis mansoni: afield study in Sudan. *Am. J. trop. Med. Hyg* (60) 307-310.

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

King CH 2010. Parasites and poverty: the case of schistosomiasis. *Acta Trop*. 113(2): 95-104

Knight PA, Brown JK, Pemberton AD 2008. Innate immune response mechanisms in the intestinal epithelium: potential roles for mast cells and goblet cells in the expulsion of adult *Trichinella spiralis*. *Parasitology* (135) 655–670.

Kroeger KM, Sullivan BM, Locksley RM 2009. IL-18 and IL-33 elicit Th2 cytokines from basophils via a MyD88- and p38 α -dependent pathway. *J Leukoc Biol* (86) 769–778.

Komai-Koma M, Xu D, Li Y, McKenzie ANJ, McInnes IB, Liew FY 2007. IL-33 is a chemoattractant for human Th2 cells. *Eur. J. Immunol* (37) 2779–2786.

Kongs A, Marks G, Verlè P, Van der Stuyft P 2001. The unreliability of the Kato-Katz technique limits its usefulness for evaluating *S. mansoni* infections. *Tropical Medicine and International Health* (6) 3 163- 169.

Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Murphy G, Russo RC, Stolarski B, Garcia CC, Komai-Koma M, Pitman N, Li Y, McKenzie ANJ, Teixeira MM, Liew FY, Xu D 2008. IL-33 induces antigen-specific IL-5 T cells and promotes allergic-induced airway inflammation independent of IL-4. *J Immunol* (181) 4780–4790.

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

Lacerda CM, Freire W, Vieira De Melo PS, Lacerda HR, Carvalho G 2002. Splenectomy and ligation of the left gastric vein in schistosomiasis mansoni: the effect on esophageal variceal pressure measured by a non-invasive technique. *Keio J. Med.* (51) 89-92.

Lambertucci JR, Jordan P, Weber G, Surrock RF 1993. *Schistosoma mansoni*: Pathological and clinical aspects. In: (Eds) Human Schistosomiasis. Wallingford: Cab.International, 5 195-235.

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

Lambertucci JR, Silva LCS, Antunes CM 2007. Aspartate aminotransferase to platelet ratio index and blood platelet count are good markers for fibrosis evaluation in

schistosomiasis mansoni. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40 (5):599.

Lamkanfi M & Dixit VM 2009. IL-33 Raises Alarm. *Cell Press* (31) 5-7.

Lefrancais E, Roga S, Gautier V Gonzalez-de-Peredo A, Monsarrat B, Girard JP, Cayrol C 2012. IL-33 is processed into mature bioactive forms by neutrophil elastase and cathepsin G. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 109 1673–1678.

Lenzi HL, Kimmel E, Schoechtma M H, Pelajo-Machado M, Romanha WS, Pacheco RS, Mariano M, Lenzi JA 1998. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 93 supl.1 141-51.

Lenzi HF, Jurberg AD, Coelho PMZ, Lenzi JA 2008. Migração e desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HF. *Schistosoma mansoni* Esquistossomose uma visão multidisciplinária. Ed. Fiocruz: 149-160.

Lenzi HL, Romanha WS, Machado MP, Mota EM, Lezi JA. Patologia Experimental com Enfoque o Granuloma Esquistossomótico. In Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar*. 1ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008 b.

Lenzi HL, Sobral ACL & Lenzi JA 1988. Participation of endotelial cells in murine schistosomiasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, (21) 999-1003.

Li D, Guabiraba R, Besnard AG, Komai-Koma M, Jabir MS, Zhang L, Graham GJ, Kurowska-Stolarska M, Liew FY, McSharry C, Xu D 2014. IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. *J Allergy Clin Immunol* S0091-6749(14): 670-8.

Lima KM, Aires AL, Lucena LR, Almeida TM, Albuquerque MC, Castro CM 2012. Factors influencing the bacterial translocation in mice with chronic schistosomiasis. *Acta Gastroenterol Latinoam* 42(4):309-20.

Lima KM, Dellacqua MN, Santos VEFA, Castro CM 2015. Post splenectomy infections in chronic schistosomiasis as a consequence of bacterial translocation. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 48(3) 314-320.

Liew YF, Pitman NI, McInnes IB 2010. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. *Nature Reviews Immunology* 10 103-110.

Liu Y, Munker S, Müllenbach R, Weng HL 2012. IL-13 signaling in liver fibrogenesis. *Front Immunol* 3: 1-7.

Lohning M, Stroehmann A, Coyle AJ, Grogan JL, Lin S, Gutierrez-Ramos JC, Levinson D, Radbruch A, Kamradt T 1998. T1/ST2 is preferentially expressed on murine Th2 cells, independent of interleukin 4, interleukin 5, and interleukin 10, and important for Th2 effector function. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 6930–6935.

Lopetuso LR, Franco Scaldaferrri F, Pizarro TT 2012. Emerging role of the interleukin (IL)-33/ST2 axis in gut mucosal wound healing and fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair* (5) 18 1-11.

Lundy SK & Lukacs NW 2013. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Frontiers in immunology* 4 1-18.

Luthi AU, Cullen SP, Mcneela EA, Duriez PJ, Afonina IS, Sheridan C, Brumatti G, Taylor RC, Kerse K, Vandenabeele P, Lavelle EC, Martin SJ 2009. Suppression of interleukin-33 bioactivity through proteolysis by apoptotic caspases. *Immunity*: 31 84-98.

Matsuba-Kitamura S, Yoshimoto T, Yasuda K, Futatsugi-Yumikura S, Taki Y, Muto T, Ikeda T, Mimura O, Nakanishi K 2010. Contribution of IL-33 to induction and augmentation of experimental allergic conjunctivitis. *Int Immunol* 22 479–489.

McGuckin MA, Lindén SK, Sutton P, Florin TH 2011. Mucin dynamics and enteric pathogens. *Nature Reviews Microbiology*: 9 (4) 265-278.

McHedlidze T, Waldner M, Zopf S, Walker J, Rankin AL, Schuchmann M, Voehringer D, McKenzie AN, Neurath MF, Pflanz S, Wirtz S 2013. Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. *Immunity* 39(2):357-71.

Medeiros TB; Domingues ALC, Luna CF, Lopes EP 2014. Correlation between platelet count and both liver fibrosis and spleen diameter in patients with *Schistosomiasis mansoni*. *Arq Gastroenterol* (51)1 34-38.

Mei J, Liu Y, Dai N, Hoffmann C, Hudock KM, Zhang P, Guttentag SH, Kolls JK, Oliver PM, Bushman FD, Worthen GS 2012. Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. *J Clin Invest* 122: 974-986.

Melo AL, Coelho PM 2005. *Schistosoma mansoni* e a doença. In: Neves DP (Org), Melo AL (Col) *Parasitologia humana*, 11th ed, São Paulo, Atheneu, p. 193-212.

Mjosberg JM, Trifari S, Crellin NK, Peters CP, van Drunen CM, Piet B, Fokkens WJ, Cupedo T, Spits H 2011. Human IL-25 and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat Immunol* 12 1055–1062.

Modena CM, Coelho PM, Barbosa FS, Lima WS 1993. Transmission of *Schistosoma mansoni* under experimental conditions using the bovine *Biomphalaria glabrata* bovine model. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*.35(1):11-6.

Modena CM, Lima WS, Coelho PMZ 2008. Wild and domesticated animals as reservoirs of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Acta Tropica* (108): 242-244.

Montenegro SM, Miranda P, Mahanty S, Abath FG, Texeira KM, Coutinho EM, Brinkman J, Gonçalves I, Domingues LA, Domingues AL, Sher A, Wynn TA 1999. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J Infect Dis* 179: 1502-1514.

Moritz DR, Rodewald HR, Gheyselinck J, Klemenz R 1998. The IL-1 receptor-related T1 antigen is expressed on immature and mature mast cells and on fetal blood mast cell progenitors. *J Immunol* 161 4866– 4874.

Mosmann TR 1992. T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. *Annals of the New York Academy Sciences*:664 89–92.

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

Murphy K 2014. Conceitos Básicos em Imunologia. *Imunobiologia de Janeway*. 8ªed. Porto Alegre: Artmed: 1-36.

Nair MG, Guild K.J, Du Y, Zaph C, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy A, Stevens S, Karow M, Artis D 2008. Goblet cell-derived resistinlike molecule β augments CD4+ T cell production of IFN- γ and infection-induced intestinal inflammation. *Journal of Immunology*: 181(7) 4709 1-17.

Nakae S, Iwakura Y, Suto H, Galli SJ 2007. Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17. *Journal of Leukocyte Biology* (81) 1258-1268.

Nausch N, Appleby LJ, Sparks AM, Midzi N, Mduluzi T, Mutapi F 2015. Group 2 innate lymphoid cell proportions are diminished in young helminth infected children and restored by curative anti-helminthic treatment. *PLoS Negl Trop Dis*. 9 (3) 1-16.

Negrão-Corrêa D, Souza DG, Pinho V, Barsante MM, Souza AL, Texeira MM 2004. Platelet-activating factor receptor deficiency delays eliminations of adult worms but reduces fecundity in *Strongyloides venezuelensis*- infected mice. *Infection and Immunity*: 72 1135-1142.

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

Ngaiza JR & Doenhoff MJ 1990. Blood platelets and schistosome egg excretion. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* (193) 73–79.

- Ngaiza JR & Doenhoff MJ 1987. *Schistosoma mansoni*-induced thrombocytopenia in mice. *The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (81) 655-656.
- Novato-Silva E, Gazzinelli G, Coley DG 1992. Immune Response During Human Schistosomiasis mansoni. XVIII. Immunologic Status of Pregnant Women and their Neonato. *Scandinavian Journal of Immunology* 35 (3) 429-437.
- Nunes T, Bernardazzi C, Souza HS 2014. Interleukin-33 and Inflammatory Bowel Diseases: Lessons from Human Studies. *Mediators of Inflammation*: 2014 1-10.
- Oboki K, Ohno T, Kajiwara N, Saito H, Nakae S 2010. IL-33 and IL-33 Receptors in Host Defense and Diseases. *Allergology International*: 59 (2) 143-160.
- Oeser K, Schwartz C, Voehringer D 2015. Conditional IL-4/IL-13-deficient mice reveal a critical role of innate immune cells for protective immunity against gastrointestinal helminths. *Mucosal Immunol* 8(3): 672-82
- Paraense WL 2001. The schistosome vectors in the Americas. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*: 96 7-16.
- Pastorelli L, De Salvo C, Cominelli MA, Vecchi M, Pizarro TT 2011. Novel cytokine signaling pathways in inflammatory bowel disease: insight into the dichotomous functions of IL-33 during chronic intestinal inflammation. *Therapeutic Advanced Gastroenterology*: 4 311–323.
- Pastorelli L, De Salvo C, Cominelli MA, Vecchi M, Pizarro TT 2013. The role of IL-33 in gut mucosal inflammation. *Mediators of Inflammation*: 2013 1- 11.
- Pastorelli L, Garg RR, Hoang SB, Spina L, Matiulli B, Scarpa M, Fiocchi C, Vecchi M, Pizarro TT 2010. Epithelial-derived IL-33 and its receptor ST2 are dysregulated in ulcerative colitis and in experimental TH1/TH2 driven enteritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 107(17) 8017–8022.
- Pearce EJ, Caspar P, Grzych JM, Lewis FA, Sher A 1991. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Experimental Medicine*: 173 159–166.
- Pearce EJ. & Macdonald AS 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology*: 2 499-511.
- Pearce EJ, Kane CM, Sun J, Taylor JJ, McKee AS, Cervi L 2004. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological Reviews* 201 117-126.
- Pecaric-Petkovic T, Didichenko SA, Kaempfer S, Spiegl N, Dahinden CA 2009. Human basophils and eosinophils are the direct target leukocytes of the novel IL-1 family member IL-33. *Blood* 113 1526–1534.

- Pellegrino J & Macedo DG 1995. A simplified method for concentration of cercarial. *Journal of Parasitology*: 41 306–309.
- Pellegrino J & Siqueira AF 1956. A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs. *Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropical*: 8 589–597.
- Pereira FEL, Bogliolo L 2000. Inflamações. In Bogliolo L, Brasileiro Filho G. *Patologia*, 6 edição. Rio de Janeiro, cap. 7, p.112-148, Guanabara Koogan.
- Prata A 2007. Esquistossomose Mansonii. In: Veronesi R, Veronesi FR, (editor). *Tratado de infectologia*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu: 1695-1720.
- Rank MA, Kobayashi T, Kozaki H, Bartemes KR, Squilance DL, Kita H 2009. IL-33-activated dendritic cells induce an atypical Th2-type response. *J Allergy Clin Immunol* 123:1047–1054.
- Rankin AL, Mumm JB, Murphy E, Turner S, Yu N, McClanahan TK, Bourne PA, Pierce RH, Kastelein R, Pflanz S 2010. IL-33 induces IL-13-dependent cutaneous fibrosis. *J Immunol*. 184:1526–1535.
- Raso P, Pedroso RPE, Neves J 1986. Patologia da forma aguda toxêmica, da esquistossomose mansoni. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop* (19) 45-55.
- Reiman RM, Thompson RW, Feng CG 2006. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect Immun* 74: 1471–1479.
- Ross AGP, Bartley PB, Sleight AC, Olds GR, Li Y, Williams GM, MacManus DP 2002. Schistosomiasis. *The New England Journal of Medicine*: 346 (16) 1212-1220.
- Rocha IC 2015. Participação de IL-33 na formação e modulação do granuloma hepático em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*. Doutorado- Universidade Federal de Minas Gerais- Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- Santos NSJ, Draibe AS, Kamimura MA, Cuppari L 2004. Serum albumin as nutritional marker of hemodialysis patients. *Rev. Nutr., Campinas*, 17(3):339-349.
- Sattler S, Hermelijn SH, Damo X, Fang-Ping H 2013. The Evolutionary Role of the IL-33/ST2 System in Host Immune Defence. *Archivum. Immunologiae et Therapiae Experimentalis*: 6 1107-1117.
- Scalfone LK, Hendrik JN, Lucille FG, Jody LC, Shaikha AS, Cynthia AL, Padraic GF, Judith AA 2013. Participation of MyD88 and Interleukin-33 as Innate Drivers of Th2 Immunity to *Trichinella spiralis*. *Infection and immunity*: 1354-1363.
- Schall V, Massara CL, Enk MJ, Barros HS, Miranda ES 2007. Os caminhos da esquistossomose dentro do nosso corpo. Série Esquistossomose nº 8 Parte 1. Belo Horizonte: FIOCRUZ/Instituto René Rachou.

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK, Zurawski G, Moshrefi M, Qin J, Li X, Gorman DM, Bazan JF, Kastelein RA 2005. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*: 23 479–490.

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

Schunk M, Kebede Mekonnen S, Wondafrash B, Mengele C, Fleischmann E, Herbig KH, Verweij JJ, Geldmacher C, Bretzel G, Löscher T, Zeynudin A 2015. Use of Occult Blood Detection Cards for Real-Time PCR-Based Diagnosis of *Schistosoma mansoni* Infection. *PLoS ONE* 10(9): 1-10.

Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffmann RL, Sher A 1989. A role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunol* 112:161-82.

Silva RR, Machado-Silva JR, Faerstein NF, Lenzi HL, Rey L 1992. Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni*: parasitological aspects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* (87) 271–276.

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

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

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

Siqueira LMV, Gomes LI, Oliveira E, Oliveira ER, Oliveira AA, Enk MJ, Figueiredo Carneiro NF, Rabello A, Zech Coelho PMZ 2015. Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*: 110 (2): 209-214.

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

- Souza CPF, Vitorino RR, Costa AP, Faria FCF, Santana LA, Gomes AP 2011. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*: 9 (4) 300-307.
- Stanley RG, Ngaiza JR, Atieno E, Jell G, Francklow K, Jackson CL, Parry H, Doenhoff MJ 2003a. Immune-dependent thrombocytopaenia in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 126 225–229.
- Stanley RG; Ngaiza JR; Wambayi E; Lewis J; Doenhoff MJ 2003b. Platelets as an innate defence mechanism against *Schistosoma mansoni* infections in mice. *Parasite Immunology* 25 467–473.
- Stirewalt MA 1971. Penetration stimuli for schistosome cercariae. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL 2008. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro 87-145.
- Stolarski B, Kurowska-Stolarska M, Kewin P, Xu D, Liew FY 2010. IL-33 exacerbates eosinophil-mediated airway inflammation. *J Immunol* 185:3472–3480.
- Strauss-Ayali D, Conrad SM, Mosser DM 2007. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol.* 82(2) 244-52.
- Tiggelman AM, Boers W, Linthorst C, Sala M, Chamuleau RA 1995. Collagen synthesis by human liver (myo)fibroblasts in culture: evidence for a regulatory role of IL-1 beta, IL-4, TGF beta and IFN gamma. *Journal of Hepatology*: 2(3) 307-317.
- Todt JC, Whitfield JR, Ivard SR, Boros DL 2000. Down-regulation of interleukin-12, interleukin-12R expression/activity mediates the switch from Th1 to Th2 granuloma response during murine Schistosomiasis mansoni. *Scand J Immunol* 52: 385–392.
- Townsend MJ, Fallon PG, Matthews DJ, Jolin HE, McKenzie AN 2000. T1/ST2-deficient mice demonstrate the importance of T1/ST2 in developing primary T helper cell type 2 responses. *J Exp Med* 191(6):1069-76.
- Tsang VC & Damian RT 1977. Demonstration and mode of action of an inhibitor for activated Hageman factor (Factor XIIa) of intrinsic blood coagulation pathways from *Schistosoma mansoni*. *Blood* (49) 619-633.
- Tsang VC, Hubbard WJ, Damian RT 1977. Coagulation factor XIIa (activated Hageman factor) inhibitor from adult *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, (26) 243-247.
- Turner JD, Jenkins GR, Hogg KG, Aynsley SA, Paveley RA, Cook PC, Coles MC, Mountford AP 2011. CD4CD25 regulatory cells contribute to the regulation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by schistosome infection. *PLoS Negl Trop Dis* 5:(8) 1269

- Turnquist HR, Sumpter TL, Tsung A, Zahorchak AF, Nakao A, Nau GJ, Liew FY, Geller DA, Thomson AW 2008. IL-1beta-driven ST2L expression promotes maturation resistance in rapamycin-conditioned dendritic cells. *J Immunol* 181:62–72.
- Van Der Vlugt LEPM, Labuda LA, Ozir-Fazalalikhani A, Lievers E, Gloudemans AK, Liu K-Y, Barr TA, Sparwasser T, Boon L, Ngoa UA, Feugap NE, Adegnikaa AA, Kremsner PG, Gray D, Yazdanbakhsh M, Smits HH 2012 Schistosomes Induce Regulatory Features in Human and Mouse CD1dhi B Cells: Inhibition of Allergic Inflammation by IL-10 and Regulatory T Cells. *PLoS ONE* 7(2): e30883.
- Van Der Werf MJ, De Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, Engels D 2003. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 86:125-139.
- Valadares TE, Coelho PMZ, Pellegrino J, Sampaio IBM 1981. *Schistosoma mansoni*: comparação de oviposição entre as cepas LE' (Belo Horizonte), SP (São Paulo) e ST (Libéria) em camundongos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*: 23 (1) 1-5.
- Vasconcelos EG, Nascimento PS, Meirelles MN, Verjovski-Almeida S, Ferreira ST 1993. Characterization and localization of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 58(2) 205-14.
- Verjovski-Almeida S, DeMarco R, Martins EA, Guimarães PE, Ojopi EP, Paquola AC, Piazza JP, Nishiyama MY Jr, Kitajima JP, Adamson RE, Ashton PD, Bonaldo MF, Coulson PS, Dillon GP, Farias LP, Gregorio SP, Ho PL, Leite RA, Malaquias LC, Marques RC, Miyasato PA, Nascimento AL, Ohlweiler FP, Reis EM, Ribeiro MA, Sá RG, Stukart GC, Soares MB, Gargioni C, Kawano T, Rodrigues V, Madeira AM, Wilson RA, Menck CF, Setubal JC, Leite LC, Dias-Neto E 2013. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nat Genet.* 35(2):148-57.
- Vocca L, Sano CD, Uasufa CG, Salaa A, Riccobono O, Gangemia S, Albano GD, Bonanno A, Gagliardo R, Profita M 2015. IL-33/ST2 axis controls Th2/IL-31 and Th17 immune response in allergic airway diseases. *Immunobiology* (220) 954–963.
- Zhang Y, Chen L, Liu G, Ren C, Wang S, Shen J 2012. IL-17 neutralization significantly ameliorates hepatic granulomatous inflammation and liver damage in *Schistosoma japonicum* infected mice. *Eur. J. Immunol* (42) 1523–1535.
- Warren KS, Domingo EO, Cowan RBT 1967. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. *Am J Pathol* 51: 735-756.
- Weinstock JV & Boros DL 1983. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.*, 130 418-422.

Weerakoon KGAD, Gobert GN, Cai P, McManus DP 2015. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clin Microbiol Rev*: (28) 4 939-967

Wiest R, Rath HC 2003. Bacterial translocation in the gut. *Best Practice and Research Clinical Gastroenterology*: (17) 397-425.

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

World Health Organization (WHO). Schistosomiasis. A major public health problem. Disponível em: < <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>>. Acesso em: 20 agosto 2014.

World Health Organization (WHO). Schistosomiasis. Status of schistosomiasis endemic countries, 2013. Disponível em: < http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html/>. Acesso em: 22 julho 2015.

World Health Organization (WHO). Schistosomiasis: Situation and trends. Disponível em: < http://www.who.int/gho/neglected_diseases/schistosomiasis/en/>. Acesso em: 22 julho 2015.

World Health Organization (WHO) 2009. Working to overcome the global impact of neglected disease. Geneva. Download no site: <http://www.who.int/neglected_diseases>.

Wynn TA, Cheever AW, Williams ME, Hieny S, Caspar P, Kühn R, Müller W, Sher A 1998. IL-10 Regulates Liver Pathology in Acute Murine *Schistosomiasis mansoni* But Is Not Required for Immune Down-Modulation of Chronic Disease. *The Journal of Immunology* 4473-4480.

Wynn TA & Cheever AW 1995. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology* (7) 505-511.

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

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

Yanaba K, Yoshizaki A, Asano Y, Kadono T, Sato S 2011. Serum IL-33 levels are raised in patients with systemic sclerosis: association with extent of skin sclerosis and severity of pulmonary fibrosis. *Clinical Rheumatology* 30:825–830.

Yasuda K, Muto T, Kawagoe T, Matsumoto M, Sasaki Y, Matsushita K, Taki Y, Futatsugi-Yumikura S, Tsutsui H, Ishii KJ, Yoshimoto T, Akira S, Nakanishi K 2012.

Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(9):3451-6.

Ypsilantis P, Panopoulou M, Lambropoulou M, Tsigalou C, Pitiakoudis M, Tentes I, Kartali S, Apachristou F, Papadopoulos N, Simopoulos C 2010. Bacterial translocation in a rat model of large volume hepatic radiofrequency ablation. *Journal of Surgical Research*: 161 250-258.

Comitê de Ética Animal

Projeto 1: Papel da ativação da via IL-33/ST2 na formação do granuloma hepático induzido pela infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos (Bolsa CNPq)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 159 / 2012, relativo ao projeto intitulado “Avaliação da participação de eosinófilos e da produção de IL-33 na evolução das alterações hepáticas e intestinais induzidas pela infecção p”, que tem como responsável Deborah Aparecida Negro-Correa, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 13/08/2012. Este certificado espira-se em 13/08/2017.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 159 / 2012, related to the Project entitled “The role of IL-33 and eosinophils in the severity of schistosomiasis in infected mice”, under the supervision of Deborah Aparecida Negro-Correa, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 13/08/2012. This certificate expires in 13/08/2017.

FRANCISNETE GRACIANE ARAUJO MARTINS
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 13/08/2012.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG
<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br