

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

Vinícius Gustavo de Oliveira

**PARTICIPAÇÃO DE EOSINÓFILOS NA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni* EM CAMUNDONGOS**

Belo Horizonte

2016

Vinícius Gustavo de Oliveira

**PARTICIPAÇÃO DE EOSINÓFILOS NA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni* EM CAMUNDONGOS**

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

Orientador: Prof^ª Dra. Debora Aparecida Negrão-Corrêa

Área de concentração: Imunoparasitologia

Belo Horizonte

2016

Vinícius Gustavo de Oliveira

**PARTICIPAÇÃO DE EOSINÓFILOS NA EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO
EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni* EM CAMUNDONGOS**

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

Área de concentração: Imunoparasitologia

Prof^ª. Dra. Debora Aparecida Negrão-Corrêa – UFMG (Orientador)

Prof. Dr. Andrea Teixeira de Carvalho – CPqRR/Fiocruz-Minas (Banca Examinadora)

Prof. Dr. Cíntia aparecida de Jesus Pereira – UFMG (Banca Examinadora)

Belo Horizonte, 19 de outubro de 2016.

Eu dedico este trabalho a mim!

AGRADECIMENTOS

A jornada durante o Mestrado pode ser muito dura e por isso inicialmente eu agradeço aos meus pais e familiares, pois sempre lutaram para me dar o melhor me ajudando a chegar aonde cheguei. O apoio e compreensão que tenho de ambos nas horas difíceis foram cruciais durante esse período e para a conclusão de mais essa fase.

Agradeço à minha orientadora Dra. Deborah Negrão-Corrêa que faz parte da minha jornada nesses sete anos de laboratório desde o início da minha graduação. Durante toda a nossa trajetória sendo um exemplo de profissionalismo e sempre disposta a ajudar no que fosse necessário. Uma parte fundamental para meu crescimento e desenvolvimento na pesquisa, pois me mostrou os prazeres e o privilégio de se trabalhar num bom ambiente de trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia de Helintos Jailza, por ser sempre como uma inspiração para mim, um verdadeiro exemplo nos dias de trabalho e por me ensinar tudo o que sei além de sempre estar disposta a ajudar nas horas mais complicadas, disposta a me xingar quando faço algo errado, mesmo que aparentemente. Os meus amigos do laboratório Vanessa, João, Michelle, Samira, Fernanda, Laura, que comigo compartilham seus momentos e juntos sorrir mesmo naqueles momentos difíceis, tornando nossa caminhada mais leve e divertida. Agradeço a todos pela dose de felicidade que sempre me proporcionam.

Aos meus amigos Ana Luiza e Marcelo que participaram dessa jornada que chamamos de vida. Sempre me apoiando e me aconselhando preciso ou até mesmo para um bom e velho chá para relaxar e relembrar os velhos tempos.

Aos funcionários do GIDE Zenir, Selma, Beth e Zé Carlos, sem os quais nada seria possível. Vocês são os pilares de nosso laboratório sem os quais nada se sustenta ou pode acontecer e ter continuidade na nossa pesquisa.

À minha turma de mestrado, Turma da Roliça, que me proporcionou muitos momentos alegres dentro da jornada das disciplinas. Principalmente àqueles especiais que participam ativamente e especialmente da minha vida Samira, Vanessa, Elis. Poderia dizer apenas que essa reciprocidade é maravilhosa e que é maravilhoso ter vocês por perto, amigos que posso literalmente contar em todos os momentos. A nossa jornada juntos foi iniciada há pouco tempo mas sei que com eles eu a vida se delonga e juntos o sorriso sempre estará presente mesmo naqueles momentos mais apertados.

Não poderia deixar de agradecer ao meu companheiro, Marco Aurélio, que nesses anos foi a pessoa mais compreensiva em todos esses momentos. Cada tropeço, desânimo,

pensamento negativo ele foi capaz de tornar em luz. Hoje eu cheguei ao final, cheio de marcas, mas posso dizer que venci! Obrigado por tudo!

Ao Ary Corrêa pela disponibilidade do laboratório e aprendizado.

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

Agradeço as agências de fomento, FAPEMIG e CAPES (Edital de Parasitologia Básica), pelo financiamento do projeto e a bolsa concedida pelo CNPq, que permitiu a realização deste trabalho experimental.

Também agradeço ao Departamento de Parasitologia e ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo suporte na minha qualificação profissional.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

A gravidade da esquistossomose crônica tem sido associada à intensidade e extensão da reação celular denominada de granuloma, induzida por antígenos secretados pela deposição de ovos do parasito, principalmente no fígado e intestino do hospedeiro. Na fase aguda da doença cerca de 50% das células que constituem o granuloma são eosinófilos, entretanto o papel desta célula na patologia da esquistossomose ainda não está completamente estabelecido. Para investigar a participação dos eosinófilos no controle da carga parasitária, na formação do granuloma e na evolução da morbidade induzida pela infecção experimental de camundongos com *S. mansoni*, animais BALB/c geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) e camundongos BALB/c não deficientes (WT) foram infectados subcutaneamente com 25 cercárias de *S. mansoni* da linhagem LE e acompanhados por 12 semanas. Durante todo período foi acompanhado a mortalidade induzida pela infecção. Após 8 (fase aguda) e 12 (fase crônica) semanas da infecção foram necropsiados animais de cada grupo experimental para estimar a carga parasitária, através da contagem de vermes recuperados da circulação e de ovos retidos no fígado e intestino e eliminados nas fezes de cada animal. No mesmo período, foram realizadas avaliações imunológicas e patológicas através da avaliação de infiltração celular, produção de citocinas, deposição de colágeno e medida dos granulomas no fígado dos animais. Durante a esquistossomose experimental, a ausência de eosinófilos nos camundongos Δ dblGATA foi confirmada pela reduzida atividade de EPO tecidual e ausência de células com morfologia típica de eosinófilos na avaliação histopatológica. A ausência de eosinófilos foi acompanhada por redução de atividade de MPO, mas não de NAG, indicando redução seletiva no recrutamento de granulócitos. Na fase aguda e crônica da esquistossomose o número de vermes recuperados da circulação e de ovos retidos no fígado ou eliminados nas fezes foram semelhantes em camundongos WT e Δ dblGATA; contudo, houve maior retenção de ovos do parasito no intestino dos animais deficientes. Animais Δ dblGATA infectados apresentaram redução significativa da produção de citocinas Th2 (IL-33, IL-13 e IL-5), IL-17 e citocinas regulatórias (IL-10 e TGF- β) e aumento de citocinas Th1 (IFN- γ e TNF- α), em comparação aos animais BALB/c WT, sem mostrar alterações nos níveis de IL-4. A alteração da resposta imune hepática em Δ dblGATA infectados resultou em aumento significativo da área do granuloma e da infiltração de células mononucleares e redução de granulócitos na fase crônica da infecção, sendo acompanhado por aumento significativo dos níveis séricos de transaminases (AST ALT), que indicam maior lesão hepática. Por outro lado, camundongos Δ dblGATA apresentaram menor deposição de colágeno no fígado em resposta à infecção. Os dados apresentados indicam que eosinófilos auxiliam na polarização e modulação da resposta Th2, afetando o controle da lesão tecidual e evolução da fibrose durante a infecção por *Schistosoma mansoni*.

Palavras chave: eosinófilo; *Schistosoma mansoni*; resposta imune; granuloma.

ABSTRACT

The severity of chronic schistosomiasis has been associated with the intensity and type of the granulomatous inflammation, a cellular response induced by secreted antigens from parasite eggs retained in the liver and intestine of the host. During acute schistosomiasis, about 50% of the cells that constitute the granuloma are eosinophils, however, the role of this cell in schistosomiasis pathology is not yet fully established. To investigate the role of eosinophils in the parasitic burden control, granuloma formation and evolution of morbidity induced by experimental infection of mice with *S. mansoni*, BALB/c genetically deficient in the differentiation of eosinophils (Δ dblGATA) and BALB/c not deficient (WT) were infected subcutaneously with 25 cercariae of the LE *S. mansoni* lineage and followed for 12 weeks. During the entire period the mortality induced by the infection was monitored. After 8 (acute phase) and 12 (chronic phase) weeks of infection, animals from each experimental group were euthanized to estimate the parasitic load through the counts of worms recovered from the circulation and eggs retained in the liver and intestine and eliminated in the feces of each animal. In the same period, immunological and pathological evaluations were performed by the assessment of cellular infiltration, cytokine production, collagen deposition and granuloma measurement in the liver of experimental animals. During experimental schistosomiasis, the absence of eosinophils in Δ dblGATA mice was confirmed by reduced EPO tissue activity and absence of cells with the typical eosinophils morphology on the histopathological evaluation. The absence of eosinophils was accompanied by lower MPO activity, but not in NAG activity, suggesting a selective reduction in the recruitment of granulocytes. In acute and chronic phase of schistosomiasis the number of worms recovered from circulation and the eggs retained in the liver or eliminated in the feces were similar in WT and Δ dblGATA mice, however with greater retention of eggs in the intestinal tissue in animals deficient. Δ dblGATA infected mice showed significant decrease in liver concentration of Th2 cytokines (IL-33, IL-13 and IL-5), IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and TGF- β), and increase in Th1 cytokines (IFN- γ e TNF- α), as compared to BALB/c WT animals, but there was no difference in IL-4 levels between the infected mice. The alterations of immune response of infected Δ dblGATA was accompanied by higher infiltration of mononuclear cells and significant increase in the granuloma volume, but lower collagen deposition in liver of chronically infected deficient mice. Moreover, Δ dblGATA mice showed a significant increase in serum transaminase levels (AST ALT), indicating greater liver damage. The current data indicate that eosinophils support the polarization of Th2 response and its modulation, affecting the control of tissue damage and progression of fibrosis during *Schistosoma mansoni* infection.

Keywords: eosinophils; *Schistosoma mansoni*; immune response; granuloma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica dos países endêmicos para a esquistossomose no ano de 2013.....	16
Figura 2 – Distribuição mundial de espécies de <i>Schistosoma</i>	17
Figura 3 – Prevalência da esquistossomose no Brasil. Destacando as áreas de maior concentração de casos, representado principalmente pelos estados de Minas Gerias e Bahia.....	18
Figura 4 – Ciclo evolutivo de <i>S. mansoni</i>	21
Figura 5 – Balanço da produção de citocinas Th1 e Th2 e Treg em infecção primária por <i>S.mansoni</i> em camundongos.....	25
Figura 6 – Modelo de Imunoregulação de células T CD4 ⁺ por eosinófilos.....	30
Figura 7 – Múltiplas funções do eosinófilo no organismo.....	30
Figura 8 – Número de vermes recuperados da circulação sanguínea de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA infectados com <i>Schistosoma mansoni</i>	46
Figura 9 – Número de ovos eliminados nas fezes (A) ou retidos no fígado (B) e intestino (C) de camundongos BALB/c e Δ dblGATA no decorrer da infecção por <i>S. mansoni</i>	48
Figure 10 – Concentração de citocinas TNF- α (A), IFN- γ (B) e IL-17 (C) no homogenato hepático de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a infecção por <i>S.mansoni</i>	50
Figura 11 – Concentração de citocinas perfil Th2 no homogenato de fígado de camundongos Balb/c WT e Δ dblGATA durante a infecção por <i>S.mansoni</i>	51
Figura 12 – Concentração de IL-10 (A) e TGF- β (B) no homogenato hepático em animais BALB/c WT e Δ dblGATA durante a infecção por <i>S.mansoni</i>	52
Figura 13 – Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c (A e C) e Δ dblGATA (B e D) infectados por <i>S. mansoni</i>	53
Figura 14 – Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c (A e C) e Δ dblGATA (B e D).....	53
Figura 15 – Gráficos representam a medida indireta do infiltrado celular no tecido hepático, eosinófilos (A) através da eosinófilo peroxidase, neutrófilos (B) através da mieloperoxidase e macrófagos (C) através da N-acetilglicosaminidase.....	55
Figura 16 - Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c (A e C) e Δ dblGATA (B e D).....	58

Figura 17- Gráficos com níveis de Hidroxiprolina tecidual presentes no fígado (A), intestino delgado (B) e intestino grosso (C) em camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA infectados experimentalmente com <i>S.mansoni</i>	59
Figura 18 – Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c (A e C) e Δ dblGATA (B e D).....	60
Figura 19- Os gráficos representam os níveis de transaminase sérica Aspartato aminotransferase, AST, (A) e Alanina aminotransferase para avaliar o dano tecidual, ALT, (B).....	61
Figura 20 – Curva de mortalidade induzida pela infecção por <i>S. mansoni</i> em camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA.....	62

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Fluxograma ilustrando os grupos experimentais e os procedimentos realizados para avaliações de carga parasitológica e análises histopatológicas em camundongos BALB/c e Δ dblGATA infectados com 25 cercárias *de Schistosoma mansoni* e seus respectivos controles.....37

Esquema 2 – Fluxograma ilustrando os grupos experimentais e os procedimentos realizados para avaliações de infiltração celular, deposição de colágeno, quantificação de citocinas e transaminase sérica em camundongos BALB/c e Δ dblGATA infectados com 25 cercárias *de Schistosoma mansoni* e seus respectivos controles.....38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT- Alanina aminotransferase

AAM- *Alternatively Activated Macrophage* (Macrófago alternativamente ativado)

ANOVA - Análise de Variância

AST- Aspartato transpeptidase

BSA – *Bovin Serum Albumin* (Albumina de Soro Bovino)

CEBIO- Centro de Bioterismo

DALYs - Disability-adjusted life years

ECM- *Extracellular Matrix* (Matriz extracelular)

EDN - *Eosinophil-derived neurotoxin* (Neurotoxina derivada de eosinófilo)

ELISA – *Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay* (Ensaio imunoenzimático)

EPO- *Eosinophil peroxidases* (Peroxidase de eosinófilo)

HE- Hemotoxilina e eosina

HLA-DR – *Human leukocyte antigen* (Antígeno leucocitário humano)

HSC- *Hepatic Stellate Cells* (Células hepáticas estreladas)

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucinas

INF- γ – Interferon gama

LE- Luís Evangelista

LPS- Lipopolissacarídeos

MBP - *Major Basic Protein* (Proteína maior básica)

MPO- *Mieloperoxidases* (Mieloperoxidase)

NAG- N-acetilglicosaminidase

OPD - O-fenilendiamina

OPG- Gramas por ovos

PAMPs- *Molecular Patterns Associated with Pathogens* (padrões moleculares associados a patógenos)

PBMC- *Peripheral blood mononuclear Cells* (Células Mononucleares de sangue periférico)

PBS – Salina tamponada “phosphate buffered saline”

RELM- β - Resistin-like molecule β

SEA- Antígeno solúvel de ovo *Schistosoma mansoni*

SWAP – *Soluble Worm Antigen Parasite* (Antígeno solúvel de verme adulto de *Schistosoma mansoni*)

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 Tipe”

WHO- Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO	8
ABSTRACT.....	9
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ESQUEMAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
SUMÁRIO.....	15
1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Ciclo evolutivo	20
1.2. Evolução Clínica e Resposta Imunológica	22
1.3. Eosinófilos	29
2. JUSTIFICATIVA	36
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. Geral	37
3.2. Específicos	37
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Animais.....	38
4.2 Delineamento Experimental	38
4.2.1 Infecção por <i>S. mansoni</i> em camundongos BALB/c e Δ dblGATA.....	38
4.3 Avaliação parasitológica:.....	40
4.4 Dosagem de citocinas em homogenatos teciduais.....	41
4.5 Avaliação do infiltrado celular.....	42
4.5.1 Quantificação de Peroxidase de Eosinófilos (EPO) e Mieloperoxidase (MPO)	42
4.5.2 Determinação da atividade de N-Acetilglicosaminidase (NAG).....	43
4.6 Avaliação Patológica.....	44
4.6.1 Determinação do teor tecidual de hidroxiprolina.....	44
4.6.2 Quantificação da atividade de AST e ALT.....	45
4.7 Avaliação patológica.....	45
4.7.1 Análise histopatológica	45
4.7.2 Análise morfométrica da área do granuloma	46
4.7.3 Curva de Mortalidade.....	46
4.8 Análise Estatística.....	46
5. RESULTADOS	48

5.1	Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c WT e dBlGATA experimentalmente infectados por <i>S.mansoni</i>	48
5.2	Quantificação de citocinas no tecido hepático	51
5.3	Avaliação Histopatológica	54
5.3.1	Avaliação da área e volume do granuloma esquistossomótico	54
5.3.2	Avaliação do infiltrado celular no granuloma esquistossomótico.	57
5.3.3	Quantificação da deposição de colágeno no tecido hepático e intestinal.....	59
5.3.4	Avaliação do dano tecidual através da transaminase sérica.....	62
5.4	Curva de mortalidade dos animais infectados por <i>S. mansoni</i>	63
6.	DISCUSSÃO	65
7.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	71
8.	CONCLUSÃO	72
9.	REFERÊNCIAS.....	73
	ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado do CEUA	89

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma helmintose crônica e debilitante que acomete mais de 240 milhões de pessoas em 78 países na África, América e Ásia (Figura 1). Cerca de 50 países precisam de quimioterapia preventiva e 800 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de infecção (Colley *et al.*, 2014; WHO, 2014; Weerakoon *et al.*, 2015). O total de DALYs (disability-adjusted life years) para a esquistossomose é estimada em 3.31 milhões, sendo que 77% se concentra no continente africano (Noya *et al.*, 2015).

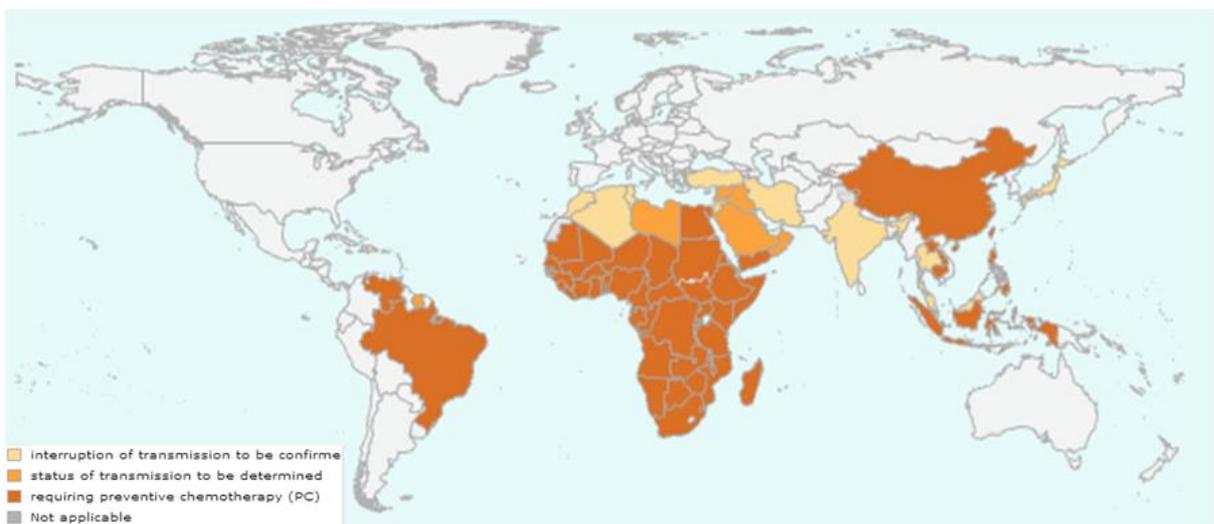


Figura 2 – Distribuição geográfica dos países endêmicos para a esquistossomose no ano de 2013.
 Fonte: WHO (2015).

No Brasil, estima-se que 1,5 - 6 milhões de pessoas estejam infectadas, sendo que cerca de 70% desses indivíduos vivem em Minas Gerais e Bahia (Drummond *et al.*, 2006; Noya *et al.*, 2015) (Ministério da Saúde, 2011). O agente causador da esquistossomose pertence 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. Existem seis espécies do gênero *Schistosoma* que são capazes de completar o desenvolvimento no homem; sendo que *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma mansoni* (Sambon 1907) e *Schistosoma japonicum* Katsurada 1904, são responsáveis pela maioria dos casos humanos, concentrando-se nos continentes americano e africano, enquanto que *Schistosoma intercalatum* Fisher 1934, *Schistosoma mekongi*, Voge, Bruckner & Bruce, 1978, *Schistosoma malayensis* Greer 1988 são parasitos cuja transmissão está relacionada a focos limitados e com menor importância epidemiológica, isolados nas

regiões do norte da África e Ásia (Ross *et al.*, 2002; WHO, 2002; Gryseels *et al.*, 2006; Gryseels, 2012; Colley *et al.*, 2014) (Figura2).

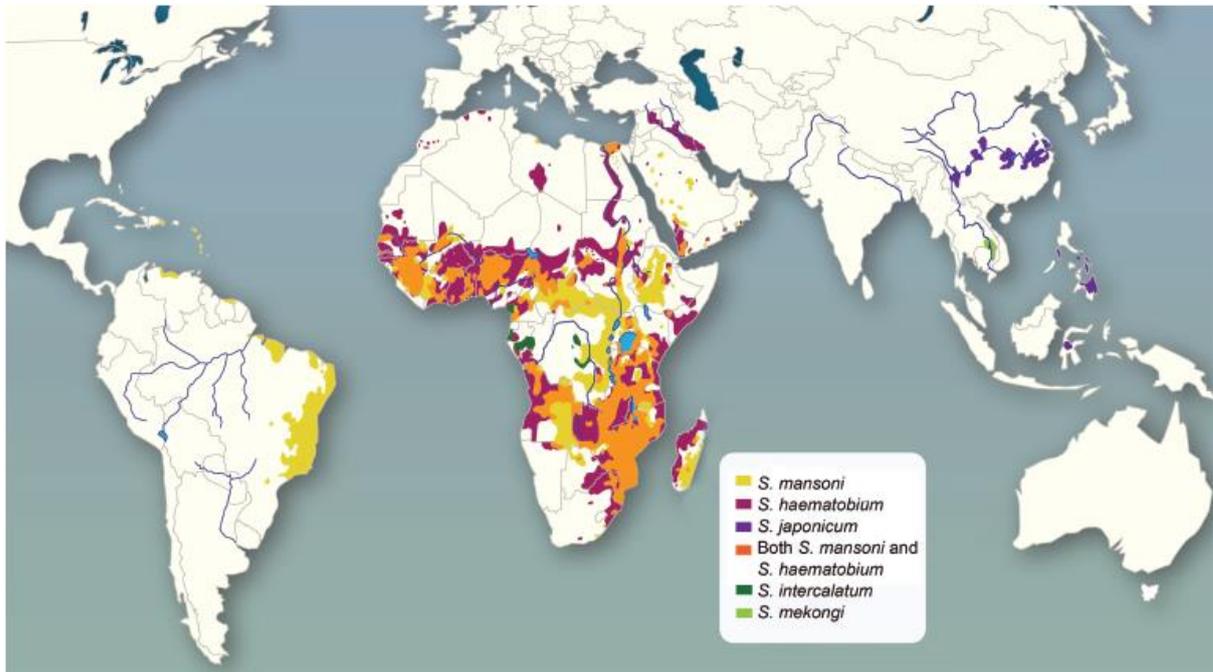


Figura 2 – Distribuição mundial de espécies de *Schistosoma*.
Fonte: Weerakoon *et al.* (2015)

No Brasil, a única espécie do gênero *Schistosoma* encontrado nos indivíduos infectados é *S. mansoni*. Indícios históricos nos levam a crer que o parasito fora introduzido no país na época do tráfico negreiro e ao encontrar um hospedeiro intermediário susceptível e clima favoráveis se desenvolveu e expandiu pelo país (Katz & Almeida, 2003). Atualmente, os casos de esquistossomose ocorrem principalmente na zona litorânea do estado do Maranhão até o Espírito Santo e o Estado de Minas Gerais, onde ainda se encontram regiões com prevalência igual ou superior a 15%. Além disso, Minas Gerais e Bahia concentram cerca de 70% do número de casos que ocorrem no país (Noya *et al.*, 2015) (Figura3). Há também focos isolados de transmissão da doença no Distrito Federal, Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, bem como casos de pacientes positivos que vieram de áreas endêmicas registradas em todo território nacional, principalmente em áreas consideradas de migração, como o estado de Rondônia, que evidenciam a expansão da esquistossomose (Coura & Amaral, 2004).

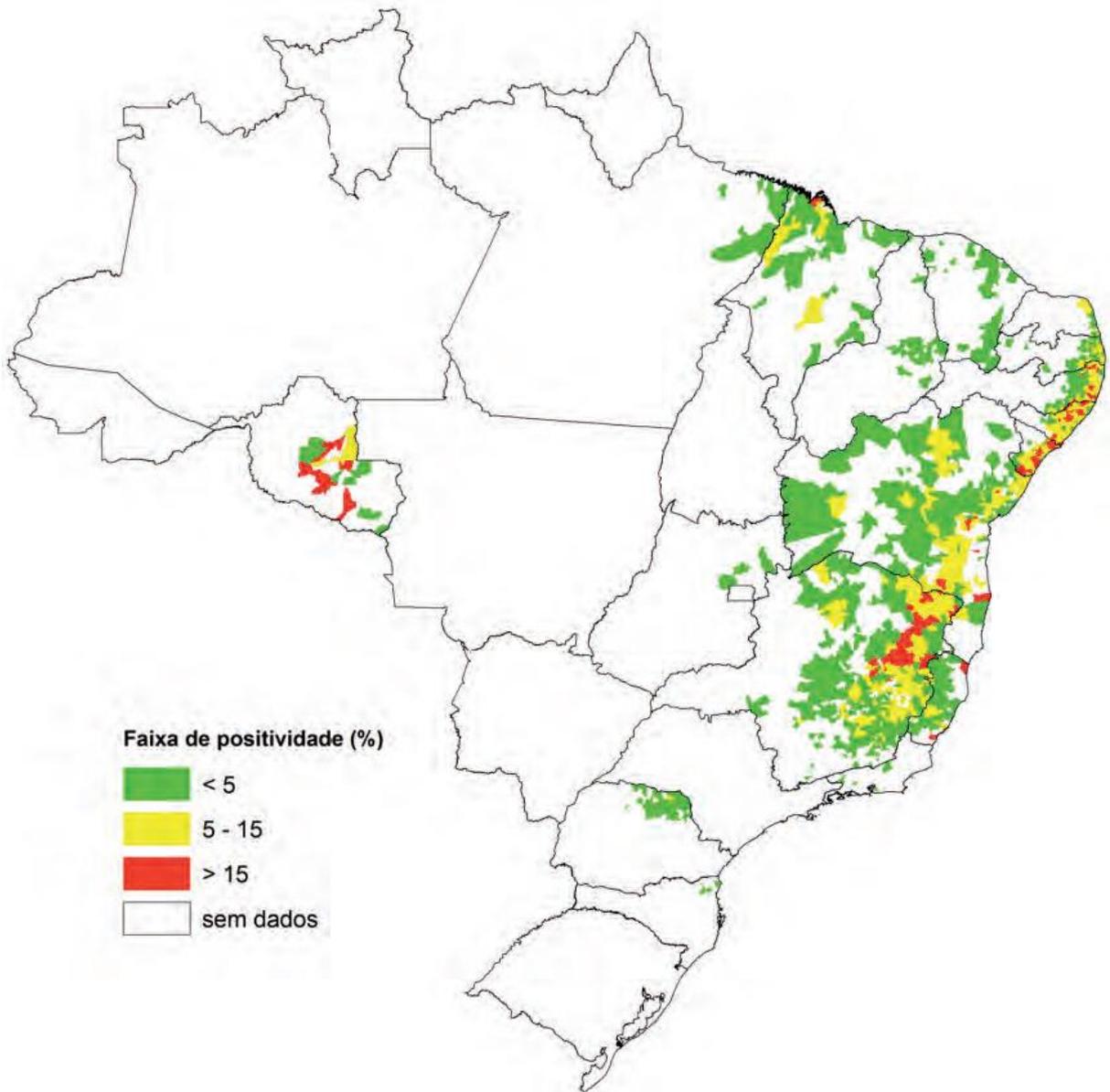


Figura 3 – Prevalência da esquistossomose no Brasil. Destacando as áreas de maior concentração de casos, representado principalmente pelos estados de Minas Gerias e Bahia
Fonte: Manual da Vigilância Sanitária, 2014

Os dados recentes de Katz (2014) indicam uma redução de aproximadamente 8 milhões em 1997 (Katz & Peixoto 2000) para aproximadamente de 1,5 milhões de casos no último inquérito nacional, devido aos avanços nas condições de moradia e saneamento básico. Todavia, a transmissão continua ativa em áreas de alta endemicidade e também àquelas antes não endêmicas, geralmente associado a condições sanitárias precárias em algumas partes do país, como o nordeste onde somente uma pequena parcela da população possui rede de esgoto, enquanto na cidade de Florianópolis, onde a estrutura sanitária ideal atende 35% dos residentes.

A técnica de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972) é padronizada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1993) como sendo padrão-ouro para detecção da esquistossomose, pelo fato de ser quantitativa, possuir um baixo custo e ser de fácil manipulação. Entretanto, vale ressaltar que esta técnica apresenta baixa eficácia para identificar pessoas com baixa carga parasitária, devido a variação diária da oviposição das fêmeas, 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), afirma que para a técnica de Kato-Katz ser eficaz nestas áreas é necessário à confecção de várias lâminas, o que exigiria uma quantidade maior de amostras que poderia dificultar o diagnóstico. Desta forma, os levantamentos utilizando a técnica de Kato-Katz pode subestimar a real prevalência da esquistossomose em áreas onde os indivíduos estão infectados em baixa carga parasitária, como acontece em muitas áreas do Brasil. Atualmente, têm se investido em técnicas parasitológicas que preconizam a concentração de amostras maiores de fezes, como método do gradiente salino, (Coelho *et al.*, 2009), Helmintex® (Teixeira, *et al.*, 2007), que se mostram mais promissoras para o diagnóstico da esquistossomose mansoni em áreas de baixa endemicidade, porém são técnicas mais trabalhosas e ainda não validadas. Com este mesmo intuito, foi padronizado um teste imunológico denominado de POC-CCA (Colley *et al.*, 2013) e técnicas moleculares (Gomes, *et al.*, 2010; Enk, *et al.*, 2012) que tem se mostrado promissores para utilização em áreas de baixa carga parasitária.

1.1. Ciclo evolutivo

A espécie *S. mansoni* utiliza como hospedeiro intermediário algumas espécies de moluscos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria*, onde ocorre o ciclo de reprodução assexuada, e como hospedeiro definitivo poucas espécies de mamíferos, entre as espécies de primatas, de pequenos roedores, além de bovinos e ovinos (Amorim, 1953; Silva *et al.*, 1992; D'Aandrea *et al.*, 2000; Gentile *et al.*, 2000; Modena *et al.*, 2008) além do homem, nos quais ocorre a maturação sexual dos vermes e a reprodução sexuada (Figura 4).

No Brasil, as espécies de *Biomphalaria* encontradas naturalmente infectadas por *S. mansoni* foram *B. tenagophila*, *B. straminea*, *B. glabrata*, sendo a última a espécie mais susceptível ao parasito (Paraense, 2001), enquanto que o homem tem sido apontado como o único hospedeiro definitivo de importância epidemiológica. Os ovos do parasito são

eliminados juntamente com as fezes do hospedeiro definitivo infectado e, ao atingirem coleções hídricas, a larva ciliada, denominada de miracídio, eclode e se movimenta no meio aquático respondendo a estímulos do hospedeiro intermediário. Durante a penetração no caramujo a larva perde sua camada ciliada transformando-se em esporocisto. Em moluscos altamente susceptíveis, cada esporocisto pode formar aproximadamente 100.000 cercárias com cauda bifurcada, através da série de ciclos de reprodução assexuada ocorridos no hospedeiro intermediário, constituindo a forma infectante ao hospedeiro definitivo (Souza *et al.*, 2011; Gryseels, 2012; Colley *et al.*, 2014), que são liberadas do caramujo para o ambiente aquático sob determinadas condições de temperatura e luminosidade (Bogéa *et al.*, 1996; Wolmarans *et al.*, 2002).

O hospedeiro definitivo ao entrar em contato com os recursos hídricos contaminados com as cercárias de *S. mansoni* é infectado pela penetração ativa das larvas através da pele e mucosas com auxílio de suas ventosas e glândulas repletas de secreções histolíticas (Dorsey & Stirewalt, 1971), 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). No decorrer deste processo, ainda pouco elucidado, as larvas perdem a cauda e sofrem alterações fisiológicas, transformando-se em esquistossômulos (Gordon & Griffiths, 1951; Curwen & Wilson, 2003; Whitfield *et al.*, 2003) que migram pela derme até alcançar os vasos sanguíneos, e, via circulação sanguínea, são transportados pelo ventrículo direito para o pulmão e posteriormente para o sistema porta-hepático, onde transformam-se em vermes acasalam e terminam a maturação sexual, formando machos e fêmeas adultos (Lenzi *et al.*, 2008). Em seguida, os casais migram para veias mesentéricas próximas ao intestino, onde começam a postura dos ovos, que são inicialmente encontrados nas fezes após 40 dias da infecção, reiniciando o ciclo de desenvolvimento. No hospedeiro definitivo os vermes adultos podem viver em média 3 a 10 anos (Coelho & Barbosa, 1995; Siqueira-Batista *et al.*, 1998; Lenzi *et al.*, 2008; Souza *et al.*, 2011; Colley *et al.*, 2014).

As fêmeas de *S. mansoni* chegam a produzir cerca de 300 a 400 ovos por dia (Valadares *et al.*, 1981) que são eliminados nos vasos sanguíneos, aproximadamente 40% desses atravessam o endotélio e a membrana basal dos vasos e mucosa intestinal, alcançando a luz do intestino sendo eliminados juntamente com as fezes (Pearce & MacDonald, 2002). Os ovos que não chegam à luz intestinal são carregados pela corrente sanguínea e acumulam-se nos tecidos, principalmente fígado e intestino, podendo também ser encontrados nas placas de Peyer (Turner *et al.*, 2012). Em casos mais graves de infecção os ovos do parasito também sp

podem ser encontrados no baço, pulmão e sistema nervoso, sendo alvo da resposta imune (Boros & Warren, 1970; Warren, 1982).

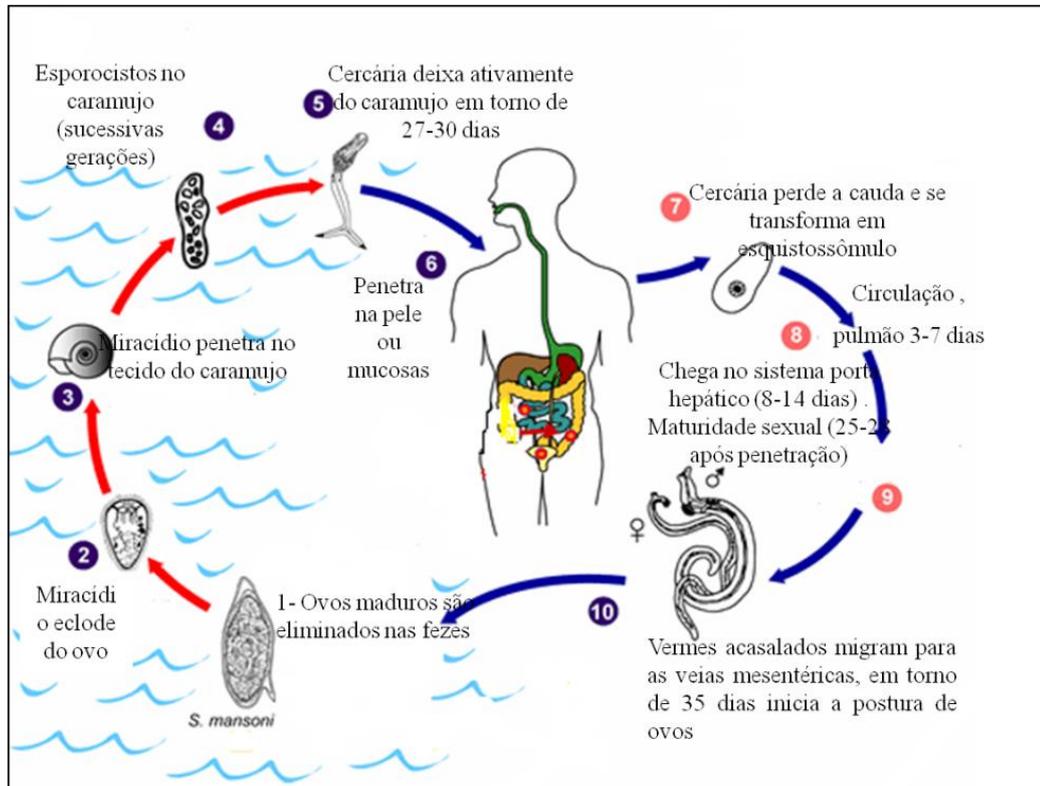


Figura 4 – Ciclo evolutivo de *S. mansoni*.

Disponível em [HTTP://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/schistosomiasis.htm](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/schistosomiasis.htm)

1.2. Evolução Clínica e Resposta Imunológica

A esquistossomose pode ser clinicamente classificada em fase aguda e fase crônica, sendo que a fase aguda pode ser dividida em período pré-patente (antes da oviposição) e pós-patente (após a oviposição) (Hiatt *et al.*, 1979). Os sintomas da fase aguda são relatados principalmente em pessoas previamente não expostas ao parasito (Hiatt *et al.*, 1979; Zuidema, 1981; Raso *et al.*, 1986; King *et al.*, 1998; Caldas *et al.*, 2008), variando também de acordo com a carga de infecção do indivíduo e reatividade do hospedeiro (Milan & Keim, 2007), estando associado a uma resposta de hipersensibilidade sistêmica induzida pela penetração da cercária, levando a erupções micropapulares eritematosas e discretamente edemaciada, conhecida como dermatite cercariana ou contra a migração de vermes e ao início da oviposição que ocorre com a disseminação massiva de granulomas no fígado, pulmão, pâncreas e linfonodos (Lambertucci, 1993; Lambertucci *et al.*, 2005; Gryseels *et al.*, 2006; Bottieau *et al.*, 2006; Caldas *et al.*, 2008). Geralmente, os indivíduos que vivem em áreas

endêmicas e estão continuamente em contato com os antígenos do parasito, apresentam poucos sintomas nessa fase (Bina & Prata, 2003; Caldas *et al.*, 2008). Em casos mais raros, hepatite aguda com necrose focal e enterocolites são observadas (Raso, 1986; Caldas *e. al.*, 2008)

A migração dos esquistossômulos pode causar sintomas inespecíficos, como prostração, febre, calafrios, esplenomegalia, conjugados com leucocitose e eosinofilia com placas de infiltrados que podem ser identificadas em radiografias pulmonares (Gazzinelli *et al.*, 1985), além de serem importantes na liberação de antígenos como prováveis mediadores imunológicos (Capron, *et al.*, 1985; Butterworth *et al.*, 1994). Neste período o paciente pode apresentar tosse não produtiva, eventualmente com crise asmátiforme, diarreia com numerosas evacuações e anorexia (Coura *et al.*, 1970; Hiatt *et al.*, 1979; Ross *et al.*, 2002). Alguns pacientes podem ainda manifestar a Febre de Katayama, reação de hipersensibilidade sistêmica em resposta à migração dos esquistossômulos após a infecção primária (Ross *et al.*, 2002), ou mais tardiamente sintomas abdominais em decorrência do posicionamento dos vermes adultos e início da postura dos ovos (Gryseels *et al.*, 2006). A ocorrência destes sintomas é comum antes mesmo de aparecerem ovos nas fezes, mas geralmente há um pico entre a 6^a e 8^a semanas após infecção (Pearce & MacDonald, 2002). 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, geralmente mais modulada, em relação àqueles que não são de áreas endêmicas. Nestes indivíduos, os sintomas quando aparecem são menos severos (Novato-Silva *et al.*, 1992; Andrade, 2008). Na fase aguda, a infecção por *S. mansoni* induz uma resposta imune predominantemente do tipo 1 (Th1), com elevada produção de Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), gama interferon (IFN- γ) e interleucinas-2, 6 e 12 (IL-2, IL-6 e IL-12) de acordo com o modelo experimental (Vella & Pearce, 1992; Stadecker & Hernandez, 1998; Wynn *et al.*, 1998; Dunne & Pearce, 1999; Hoffmann *et al.*, 2000; Pearce & MacDonald, 2002). Os antígenos que são responsáveis por essa resposta ainda não estão claros, mas acredita-se que os antígenos de esquistossômulos sejam os principais mediadores (Hiatt *et al.*, 1979; Capron & Dessaint, 1985; Butterworth, 1994).

Os antígenos liberados pelos ovos do parasito retidos no organismo do hospedeiro a partir da 5-6 semanas da infecção induzem a produção de IL-4 e IL-5 (Pearce & Sher, 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 & Sher,

1991; Pearce & MacDonald, 2002; Bartley *et al.*, 2006), que atuam na inibição da produção de IL-12, TNF- α e IFN- γ inicial (Fiorentino *et al.*, 1991; De Wall Malefyt *et al.*, 1993; Akuthota *et al.*, 2008), e na estimulação da diferenciação da resposta Th2. Este ambiente imunológico é essencial para o recrutamento e ativação das células responsáveis pela formação do granuloma ao redor dos ovos do parasito e também pela ativação de macrófagos, de células hepáticas estreladas (HSC) e da sua diferenciação em miofibroblastos, que levam a produção dos componentes da matriz extracelular (ECM) essenciais na remodelação tecidual, mas também para formação de fibrose (Pearce & Sher, 1991; Tiggelman *et al.*, 1995; Stadecker & Hernandez, 1998; Maizels & Yazdanbakhsh, 2003; Pearce *et al.*, 2004; Burke *et al.*, 2009).

O granuloma que circunda os ovos de *S. mansoni* é formado através de uma interação dinâmica e intrincada entre célula-célula e célula-matriz do tecido afetado e aquelas recrutadas da circulação. Os linfócitos T CD4⁺ e B, macrófagos e eosinófilos, em decorrência da produção de antígenos pelos ovos alteram a produção e deposição de uma matriz extracelular heterogênea, resultando na formação de uma estrutura esférica compacta que se organiza ao redor do ovo do parasito (Bogliolo, 1958; Boros & Warren, 1970; Raso, *et al.*, 1987; Lenzi *et al.*, 1991; Silva *et al.*, 2004; Pesce *et al.*, 2006; Lenzi *et al.*, 2008). 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 fusão de um macrófago com outro (Pereira *et al.*, 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 (linfócitos, macrófagos e eosinófilos) e locais (fibroblastos e miofibroblastos) dispostas organizadamente em 3 camadas distintas: central (com predomínio de macrófagos) a camada medial (com fibras arranjas concentricamente) e a camada periférica (com riqueza celular e fibras reticulares frouxamente dispostas) (Weinstock & Boros, 1983b; Lenzi *et al.*, 1998; Lenzi *et al.*, 2008). Nesta fase, os granulomas podem conter até 50% de eosinófilos (Lenzi *et al.*, 2008), essas células atraídas pela produção de eotaxina e IL-5 produzida pelas células T CD4⁺, possuem um papel

importante na fibrose hepática (Reiman *et al.*, 2006) e na polarização e estabelecimento da resposta Th2 (Sabin & Pearce, 1995). Os neutrófilos também são participantes, sendo as primeiras células a chegarem ao sítio da infecção (Nathan, 2006), estando presentes na composição do granuloma, embora sua presença em infecções por *Schistosoma japonicum* seja mais pronunciada (Meleney *et al.*, 1953; Hsu *et al.*, 1972; Von Lichtenberg *et al.*, 1973). Em decorrência da deposição de ovos e liberação de seus antígenos há o estímulo de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias produzidas pelos neutrófilos (Chuah *et al.*, 2014), além de contribuir com a eliminação de patógenos via desgranulação e fagocitose, sem alterar a carga parasitária dos animais (Kolaczowska & Kubes, 2013). Os neutrófilos, também contribuem para o dano tecidual gerado no local devido a produção de mediadores citotóxicos e espécies reativas de oxigênio (Cascão *et al.*, 2010).

Por volta de 10-12 semanas (Figura 5), ocorre uma gradual regulação da função das células T CD4⁺ e da imunopatologia, em um processo denominado imunomodulação (Andrade & Warren, 1964; Boros *et al.*, 1975; 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). Os granulomas formados em torno dos ovos tornam-se gradativamente menores (Andrade & Warren, 1964), fenômeno essencial para promover a sobrevivência do hospedeiro durante a infecção e que tem a participação essencial de IL-10 (Pearce & MacDonald, 2002; Wynn *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2007; Chuah *et al.*, 2014), produzido por algumas células como CD4⁺CD25⁺, Tregs e células B. 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; Hesse *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 (Pearce & MacDonald, 2002; Wynn *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2007). Assim, IL-10 também é essencial para evitar excessivas respostas Th2 e conseqüentemente a patologia grave da fase crônica (Hoffmann *et al.*, 2000). Estudos demonstram a participação de outros elementos na modulação da resposta imunológica durante a fase crônica da infecção por *S.mansoni*, que incluiu células T CD8⁺ (Pedras-Vasconcelos & Pearce, 1996), eventos apoptóticos (Rutitzky *et al.*, 2003), anticorpos anti-idiotipos (Montesano *et al.*, 2002) e células B (Jankovic *et al.*, 1998; Pearce & MacDonald, 2002). Fator complicador da elucidação desse mecanismo pode ser explicado pelo perfil variável das citocinas de cada paciente (Abath *et al.*, 2006).

Estudos também mostram que os imunocomplexos possuem um papel importante na modulação granulomatosa. Trabalhos experimentais que avaliam a formação de granuloma *in vitro* a partir de esferas conjugadas com antígenos do ovo do parasita incubadas com células mononucleares do sangue periférico, demonstraram que a adição de soro de pacientes acometidos pela forma intestinal da esquistossomose resultou em redução do tamanho dos granulomas bem como a proliferação de células do sistema mononuclear fagocitário (Góes, *et. al.*, 1991, Rezende, *et. al.*, 1993 e Góes, *et.al.*, 1994, 1997). Imunocomplexos podem modular o granuloma através do aumento na produção de NO, que acarreta na elevação dos níveis de prostaglandina E (Neves, *et.al.*, 1999), além de inibir a produção de TNF- α e elevando os níveis de IL-10, (Rezende, *et.al.*, 1997).

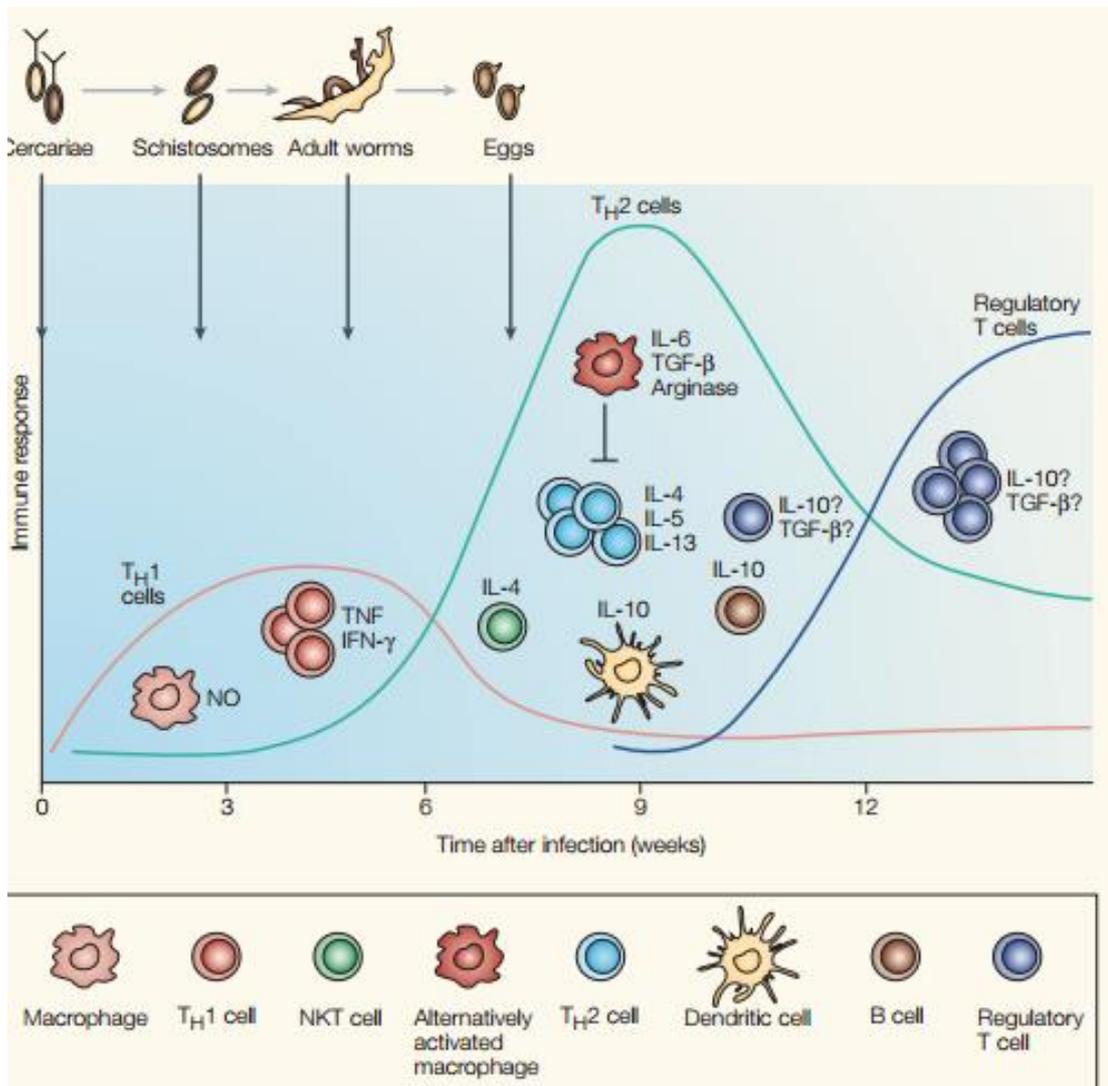


Figura 5 – Balanço da produção de citocinas Th1 e Th2 e Treg em infecção primária por *S.mansoni* em camundongos.

Fonte: Dunne and Cooke (2005).

A sintomatologia da fase crônica da esquistossomose tem sido relacionada com a extensão e intensidade da reação celular do hospedeiro à presença dos ovos nos tecidos (Wynn *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2007), sendo clinicamente classificada em formas intestinal, hepatointestinal e a mais grave, hepatoesplênica, que atinge cerca de 4 - 10 % dos infectados (Bogliolo, 1958; Prata & Bina, 1968; Bica *et al.*, 2000; Andrade, 2004; Carvalho *et al.*, 2005). Alguns dados utilizando amostras de tecido humano sugerem que não exista uma forma intestinal pura, pois o acometimento do fígado é frequente em todas as formas anátomo-clínicas da esquistossomose, mesmo aquelas em que o fígado não é o eixo das manifestações principais da doença (Raso, *et al.*, 1987). Na maioria dos indivíduos infectados, a fase crônica da esquistossomose pode ser assintomática ou expressar sintomas abdominais, como dor local, diarreia intermitente e fezes sanguinolentas, além de sintomas sistêmicos como, fadiga e cefaleia. Nos pacientes que apresentam esta forma mais leve da doença, denominada de forma intestinal ou hepatointestinal, os granulomas hepáticos apresentam-se em menor número e localizados isoladamente nas terminações da veia porta, se apresentando em várias fases de evolução e cicatrização (Andrade & Prata, 1963; Andrade, 2008). Casos graves da doença podem ser causados por uma inflamação granulomatosa intensa produzindo extensa fibrose periportal, que pode acarretar na obstrução do vaso e aumento da pressão portal (Boros & Warren, 1970; Cheever *et al.*, 2000; Andrade, 2009; Wynn & Barron, 2010), caracterizando a forma clínica hepatoesplênica. Esse quadro surge em decorrência da deposição de ovos nos espaços porta em conjunto com lesões destrutivas e obstrutivas da veia porta intra-hepática (Andrade, 2008). Dessa forma, a fibrose dificulta a perfusão sanguínea dos órgãos, por conseguinte, gera um aumento considerável do baço e do fígado (Lambertucci *et al.*, 1993). A elevação da pressão sanguínea leva ao aumento de anastomoses, afim de que o sangue seja desviado para áreas de menor pressão, como esôfago, e assim reduzir o fluxo de sangue nas áreas comprometidas (Lacerda *et al.*, 2002). Alguns pacientes em fase crônica podem também apresentar distúrbios vasculares pulmonares, caracterizado por dispneia de esforço, palpitações, dor torácica constritiva, tosse seca e fadiga extrema (Lambertucci *et al.*, 2005). Segundo estudos de necropsia realizados por Coura (1979), há chance de haver um comprometimento pulmonar é superior em indivíduos que são infectados com altas cargas parasitárias. 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 (Van Der Werf *et al.*, 2003; Abath *et al.*, 2006).

Abath *et al.*, (2006) e Andrade (2008) relataram o desenvolvimento de formas graves da esquistossomose em indivíduos com baixa intensidade de infecção, demonstrando que a

carga parasitária não é o único fator determinante no desenvolvimento da patologia grave. Fatores genéticos e imunológicos também são determinantes no desenvolvimento da forma severa da doença (Butterworth *et al.*, 1985; Cheever *et al.*, 1987; Dessein *et al.*, 1999; Dunne & Pearce, 1999).

Assim, a formação do granuloma é fundamental para a proteção do hospedeiro, pois previne o quadro agudo que pode ser letal devido a produção elevada de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (Pearce & MacDonald, 2002). Experimentos realizados com camundongos geneticamente deficientes para a produção de IL-4 e IL-13 resultaram no aumento da mortalidade durante a infecção experimental por *S. mansoni* que foi associada ao aumento de produção de IFN- γ , TNF- α e NO (Brunet *et al.*, 1997; Chiaramonte *et al.*, 1999; Jankovic *et al.*, 1999 Fallon, 2000). Resultados experimentais também demonstraram que a produção de IL-10 pode modular patologias associadas às respostas Th1 e Th2 (Wynn *et al.*, 1997; Montenegro *et al.*, 1999; Pearce & MacDonald, 2002), sendo verificado que camundongos deficientes para a produção de IL-10 tiveram uma mortalidade maior na fase aguda, provavelmente pela exacerbação da resposta inflamatória do tipo 1 (Hoffmann *et al.*, 2000) enquanto que animais que são deficientes na produção de IL-10 e IL-12, tiveram uma elevada mortalidade na fase crônica (Montenegro *et al.*, 1999; Pearce & MacDonald, 2002). A indução da resposta Th2 é determinante na formação do granuloma, e esta estrutura tem um importante papel na contenção da lesão hepática do hospedeiro, pois a reação celular permite a contenção da secreção de enzimas, toxinas e antígenos do ovo (Dunne & Pearce, 1999; Pearce & MacDonald, 2002). Além disso, o estabelecimento da resposta Th2 também é importante no processo de eliminação dos ovos da mucosa intestinal e a formação do granuloma preserva a parede intestinal e previne uma subsequente invasão bacteriana durante a infecção (Pearce & MacDonald, 2002; Scrivero *et al.*, 2007).

Por outro lado, a formação do granuloma também pode ser responsável pelo desenvolvimento da patologia grave. Citocinas produzidas por células Th2 podem ser responsáveis por mediar certos aspectos da patologia associada à esquistossomose crônica, como progressão da fibrose hepática e a hepatoesplenomegalia (Cheever, 1987; Wynn & Cheever, 1995; Hoffmann *et al.*, 1998; Fallon, 2000; Andrade, 2009). Em camundongos infectados por *S. mansoni*, a deficiência de produção de IL-13 (IL13^{-/-}) (Fallon, 2000) e dos receptores de IL-4 (IL-4 α ^{-/-}) e IL-13 (L-113 α 1^{-/-}) (Jankovic *et al.*, 1999; Schwartz *et al.*, 2014) ou mesmo o tratamento com anticorpos neutralizante anti-IL-13R α 2 solúvel (Chiaramonte *et al.*, 1999) resultaram no desenvolvimento de fibrose hepática branda, menor morbidade e mortalidade devido a menor ativação de macrófagos alternativamente ativados

(Vannella *et al.*, 2014). Além disso, IL-13 estimula a diferenciação das células hemáticas esteladas (HSC) em miofibroblastos ativados, os quais são um dos principais elementos responsáveis pela produção de colágeno e pela fibrogênese no granuloma (Wilson *et al.*, 2011).

Os macrófagos e fibroblastos têm sido apontados como principais células efetoras envolvidas na patogênese da fibrose (Weinstock & Boros, 1983a; Lenzi *et al.*, 1998). Todavia, estudos têm demonstrado que os eosinófilos podem desempenhar um papel fundamental na reparação, remodelação e desenvolvimento da fibrose tecidual pós-inflamatória uma vez que são fontes de IL-13 e TGF- β . Experimentos *in vitro* mostram que eosinófilos estimulam a proliferação de fibroblastos através da produção de citocinas como TGF- β e IL-13 (Munitz & Levi-Schaffer, 2004; Silveira-Lemos *et al.*, 2008) e, portanto, sua contribuição na formação do granuloma esquistossomótico e na evolução da fibrose necessitam ser melhor caracterizados.

1.3. Eosinófilos

Os eosinófilos são células produzidas a partir de células tronco que se encontram na medula óssea. Primeiramente essas células se diferenciam em um precursor comum de basófilos e eosinófilos, que podem diferenciar em eosinófilos através da interação de três fatores de transcrição, GATA-1, PU.1 e C/EBP, que atuam sinergicamente na regulação da diferenciação de eosinófilos (Rothenberg & Hogan, 2006). GATA-1 é certamente o fator mais importante para a maturação de eosinófilos, visto que camundongos que tiveram o sítio de alta afinidade do promotor GATA-1 deletado resultaram em ausência seletiva da diferenciação de eosinófilos (Yu *et al.*, 2002). O fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF) e IL-3 também atuam nas primeiras fases de diferenciação e proliferação de eosinófilos, juntamente com o fator de crescimento de células tronco, SCF, (Kimura *et al.*, 2006). O IL-5 é fundamental para finalizar a maturação dos eosinófilos (Rothenberg & Hogan, 2006) e o recrutamento destas células para o sítio inflamatório ocorre em resposta a expressão de moléculas de adesão como integrinas $\beta 1/2$ (Bochner & Schleimer, 1994) e produção local de quimiocinas, como eotaxina 1 e eotaxina 2 (Zimmermann & Rothenberg, 2003) e da própria IL-5, cuja produção é estimulada por citocinas Th-2. Importante salientar que a não expressão do promotor GATA-1 trouxe alterações na transcrição de genes para a formação de glóbulos brancos e plaquetas, cujos números foram menores nos animais deficientes para a maturação dos eosinófilos.

Koeffler & Billing (1980) demonstraram que moléculas de HLA-DR (human leukocyte antigen), um tipo de MHC-II, são expressas na superfície dos eosinófilos. Todavia, é comprovado pela maioria dos estudos que os eosinófilos só expressam moléculas de MHC-II quando estimulados por GM-CSF (Lucey *et al.*, 1989). Eosinófilos com expressão aumentada de moléculas de MHC-II foram encontrados no lavado broncoalveolar de pacientes com pneumonia eosinofílica (Beninati *et al.*, 1993) e no escarro de pacientes asmáticos (Hansel *et al.*, 1991). Em infecções por *Brugia malayi*, *Strongyloides stercoralis* e em cultura com rinovírus foi evidenciado uma possível atuação de eosinófilos como APC (Pearlman *et al.*, 1993; Handzel *et al.*, 1998; Padigel *et al.*, 2007).

Eosinófilos também são células importantes na polarização das respostas Th1 e Th2 (Figura 6). Testes *in vivo* demonstram que o eosinófilo é capaz de regular a polarização a ativação de células T, através da síntese de indoleamina 2,3- dioxigenase, IDO, que está envolvida na conversão de triptofano em KYN, um regulador do balanço Th1/Th2, através de apoptose de células Th1 (Rothenberg & Hogan, 2006). Em respostas de perfil Th1 é sabido que os eosinófilos podem expressar IL-12 (Grewe *et al.*, 1998) e quando estimulados com IFN- γ expressam quimiocinas que recrutam células Th1, como CXCL9 e CXCL10 (Dajotoy *et al.*, 2004). A presença de IL-16 estimula a produção inicial de IL-4 que rapidamente suprime a liberação de IL-12 por via autócrina, elevando a geração de IL-4 e direcionando a resposta para perfil Th2. É comprovado que eosinófilos expostos a antígenos de vias aéreas de camundongos estimulam a produção de IL-4, IL-5, IL-13 em co-cultura com células Th2. Eosinófilos também produzem IL-25 estimula a expressão de CCR3 induzindo a produção de CCL5, que intensifica a produção de IL-5 e o recrutamento de mais eosinófilos (Kita & Gleich, 1996; Lacy & Moqbel, 2000; Shi *et al.*, 2000; Bandeira-Melo *et al.*, 2001; MacKenzie *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2004). Durante a resposta Th2, eosinófilos produzem IL-4 precocemente e pode participar da diferenciação e expansão de células T CD4⁺ em linfócitos Th2, que também aumenta a produção de IL-5 e o recrutamento de eosinófilos para o sítio de inflamação (Rothenberg & Hogan, 2006). Alguns estudos ainda indicam que a regulação da resposta Th2 pode ocorrer através via IL-25, pois de maneira independente do IL-4, os linfócitos Th2 expostos a ela têm sua proliferação e produção de citocinas Th2 aumentada (Wang *et al.*, 2007). Posteriormente, CCL17 (TARC) e CCL22 (MDC), liberados pelos eosinófilos, são ligantes dos receptores CCR4 e responsáveis por reduzir a resposta inflamatória, como já comprovada em doenças alérgicas nas vias aéreas (Mantovani *et al.*, 2004; Pease & Williams, 2006; Santulli-Marotto *et al.*, 2013).

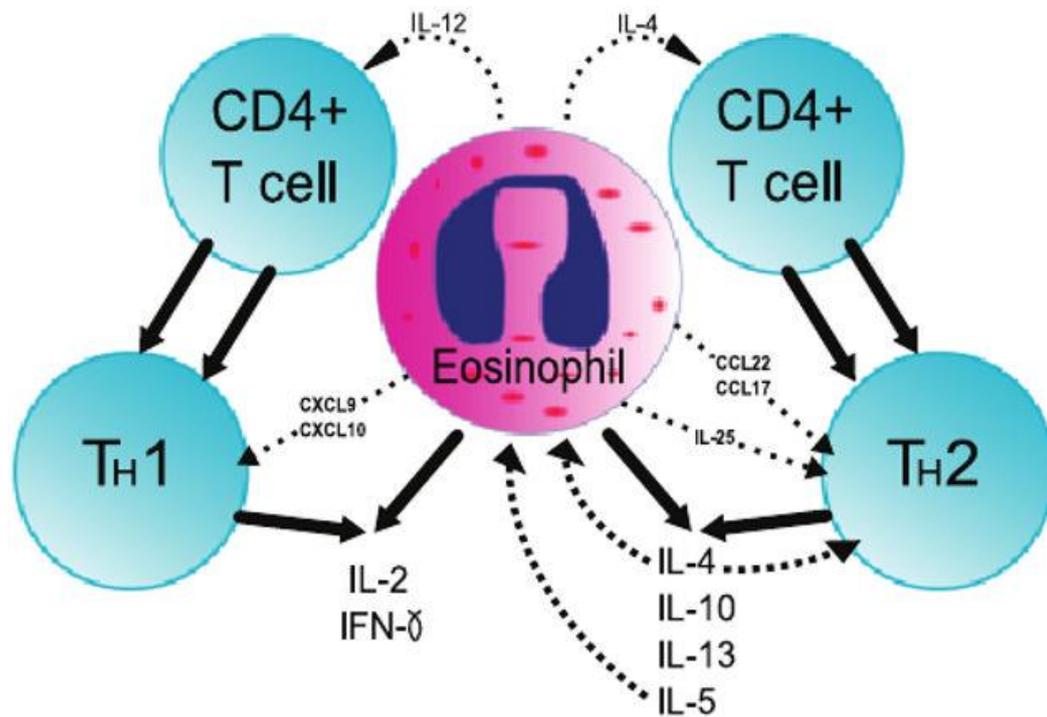


Figura 6 – Modelo de Imunoregulação de células T CD4⁺ por eosinófilos.
Fonte: Akuthota *et al.* (2008).

Adicionalmente, eosinófilos exercem um importante papel na reparação e modelação tecidual, estabelecendo um equilíbrio entre dano e proteção do organismo, conforme ilustrado na Figura 7. Eosinófilos são fontes de TGF- β e IL-13, mediadores pró-fibróticos fundamentais para estimular a produção de colágeno (Munitz & Levi-Schaffer, 2004). Os eosinófilos são capazes de estimular a regeneração tecidual do fígado através da produção de IL-4, responsável por estimular os hepatócitos (Palm *et al.*, 2012).

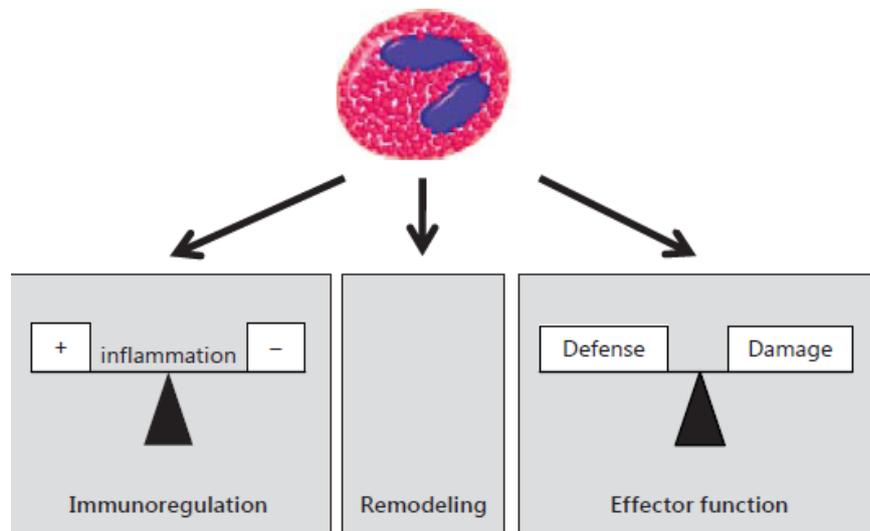


Figura 7 – Múltiplas funções do eosinófilo no organismo.

Fonte: Radonjic-Hösli and Simon (2014).

As citocinas produzidas por eosinófilos têm um papel fundamental nas infecções parasitárias. A secreção de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e TGF- α/β , eotaxina-1 e de mediadores lipídicos pelos eosinófilos auxilia na polarização da resposta Th2, de forma a iniciar uma resposta específica agindo como apresentador de antígenos (MacKenzie *et al.*, 2001; Shi, 2004; Rothenberg, 2009). Os grânulos produzidos pelos eosinófilos são núcleos cristaloides contendo proteína catiônica do eosinófilo (ECP), *major basic proteins* (MBP) e peroxidase de eosinófilo (EPO), que são moléculas com atividade citotóxica e helmintotóxica. Os grânulos de eosinófilos também contêm mediadores lipídicos, como *platelet activating factor* (PAF), que atraem leucócitos, ampliam a produção de mediadores lipídicos, além de ativar neutrófilos, eosinófilos e plaquetas (Rothenberg, 2009; Shamri *et al.*, 2011). A eicosanoides produção de pode atuar de maneira autócrina nos eosinófilos, estimulando a liberação de IL-4 (Bandeira-Melo, *et al.*, 2002). Ao contrario, Tedla, *et.al.* (2003) demonstram que eicosanoides podem estimular a elevação nos níveis de IL-12 e não de IL-4. Estes dados mostram a falta de entendimento do papel destes mediadores na ativação de eosinófilos e a possibilidade da atuação diferenciada destas células em respostas de perfil Th1 e Th2.

O papel dos eosinófilos em infecções por helmintos tem tido resultados controversos. Em infecções por cestódeos, como *Mesocestoides corti*, a utilização de camundongos deficientes para a produção de IL-5, resultou em menor estimulação de eosinófilos, mas esta redução não alterou carga parasitária em comparação com animais não deficientes (Kopf *et al.*, 1996). Animais tratados com anti-IL5 e infectados com o nematódeo intestinal *Trichinella spiralis* também não tiveram diferenças significativas em sua carga parasitária (Herndon &

Kayes, 1992) em relação aos camundongos não tratados. Animais transgênicos para IL-5 e infectados por *T. spiralis* mostram elevado número de eosinófilos circulantes, mas também não tiveram alteração na carga parasitária em comparação com os animais não transgênicos (Hokibara *et al.*, 1997). Outro nematódeo intestinal em que eosinófilo não afeta significativamente a carga parasitária foi *Nippostrongylus brasiliensis*. A infecção primária de camundongos por *N. brasiliensis* induz a migração de eosinófilos produtores de IL-4 para local da migração das larvas; entretanto, a redução da eosinofilia induzida pela infecção experimental pelo nematódeo em camundongos deficientes em IL-5 não alterou significativamente a polarização da resposta Th2 ou a carga parasitária dos animais (Voehringer *et al.*, 2004). Ao contrário do relatado para *T. spiralis* e *N. brasiliensis*, a infecção experimental por *Strongyloides stercoralis* em camundongos revela que o eosinófilo é a principal célula associada à morte de larvas do parasito inoculadas na cavidade peritoneal de camundongos previamente imunizados (Rotman *et al.*, 1996). Posteriormente, em estudos utilizando camundongos deficientes e transgênicos para IL-5, relataram que a diminuição das larvas de *S. stercoralis*, tanto na infecção primária como secundária, estava associada à presença de eosinófilos (De'Broski *et al.*, 2000). Além disto, camundongos transgênicos para IL-5 também foram capazes de eliminar mais rapidamente um grande número de larvas durante a migração tecidual de *S. venezuelensis* e de vermes adultos cirurgicamente transplantados no intestino delgado (El-Malky *et al.*, 2003). Estudos utilizando *Angiostrongylus cantonensis* (Sasaki *et al.*, 1993; Sugaya *et al.*, 1997) e *Brugia malayi* (Babayan *et al.*, 2010; Cadman *et al.*, 2014) também apontam para a importância dos eosinófilos durante a infecção. A ausência dessas células acarreta na elevação do número de larvas recuperadas e conseqüentemente no dano gerado para o hospedeiro.

O papel dessas células na evolução da infecção e morbidade produzida por *S. mansoni* é bastante controverso. Experimentos *in vitro* demonstraram que eosinófilos são capazes de eliminar esquistossômulos via citotoxicidade celular dependente de anticorpos (*antibody-dependent cellular cytotoxicity* – ADCC), depositando MBP em sua superfície causando o rompimento de sua membrana (Butterworth *et al.*, 1979; Andrade *et al.*, 1984; Gentil *et al.*, 2013). Em humanos, análises histoquímicas indicam que os eosinófilos desgranulam nas proximidades do ovo, afetando o miracídio (Hsü *et al.*, 1980). Em biópsias de fígado humano, foi verificado que granulomas com ovos em processo de formação apresentam infiltrado eosinofílico e deposição de MBP secretados por eosinófilos, que não ocorre nos granulomas já em processo de regressão (Kephart *et al.*, 1988; Chiavaroli & Grima, 2008). Um estudo populacional feito por Wilson *et al.* (2013), utilizando um grupo de humanos infectados com

Schistosoma haematobium, tratados previamente ou posteriormente com praziquantel, demonstrou que a exposição de eosinófilos aos antígenos do parasito elevam a quantidade de IL-33 no soro, responsável pelo aumento da produção de IL-5 e IL-13 pelos eosinófilos e consequentemente a fibrose tecidual.

Camundongos tratados com anticorpos anti-IL5 (Shever et. al., 1990) tiveram redução da quantidade de eosinófilos no granuloma de 40% para 1-2% e em camundongos deficientes para a produção de IL-5 essa taxa cai de 55% para 7,5% (Brunet, et al. 1999). A diminuição da infiltração de eosinófilos para o granuloma resultou em menor produção de IL-4 e IL-13, por conseguinte houve menor ativação de células Th2, reduzindo o tamanho do granuloma sem alterar a carga parasitária entre os grupos avaliados. Em experimentos utilizando anticorpos anti-IL5 (Sher, 1990) indicam que mesmo com a neutralização da citocina e redução de eosinófilos não houve diferença na carga parasitária e no tamanho do granuloma esquistossomótico, bem como na deposição de colágeno. Porém, Remain, et. al., (2006) mostraram uma carga parasitária mais elevada em camundongos geneticamente deficientes para IL-5 infectados com *Schistosoma mansoni*.

Brunet et. al., (1999) e Reiman, et. al., (2006), trabalhando com animais deficientes para a produção de IL-5, IL-4 e IL-4R, apresentam redução da eosinofilia induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni*, contudo sem alterar a carga parasitária dos grupos experimentais. O estudo de Seki et. al. (2012), utilizando animais de IL-4^{-/-}/IL-3^{-/-} também não evidenciaram estatística na carga parasitária durante a infecção por *Schistosoma japonicum*.

A falta de modelos experimentais para o estudo unicamente da função dos eosinófilos durante a processos infecciosos e inflamatórios levou ao desenvolvimento de camundongos Δ dblGATA, animais que apresentam uma deleção pontual na zona palindrômica do promotor de alta afinidade do gene GATA-1, causando a deleção seletiva dos eosinófilos sem afetar significativamente as demais hematopoiéticas (Yu et al., 2002). Com este mesmo intuito também foram desenvolvido camundongos denominados de TgPHIL, nos quais foi introduzido o gene de toxina diftérica A no promotor do gene GATA-1, que resulta na morte das células durante o processo de diferenciação em eosinófilos (Lee et al., 2004). Infecção experimental por *S. mansoni* utilizando os modelos em questão mostram que a ausência de eosinófilos não alterou a carga parasitária ao longo da infecção (Swartz et al., 2006). Além disso, pode-se verificar uma deficiência na polarização da resposta Th1/Th2 apresentando redução no granuloma hepático em comparação aos não deficientes, além de uma

considerável redução na deposição de colágeno e volume do granuloma hepático (Reiman *et al.*, 2006; M. Schwartz & Baruch, 2014).

Estudos recentes utilizando camundongos deficientes para a produção de thymic stromal lymphopietin-TSLP e IL-33, TSLP/IL-25 e TSLP/IL-25/IL-33, citocinas da resposta inata, mostram que na ausência destas citocinas a infecção por *S. mansoni* induz menor recrutamento de eosinófilos, redução da produção de IL-5 e IL-13 e redução da fibrose hepática dos animais (Vannella *et al.*, 2016).

Desta forma, fica evidente a necessidade de mais estudos que possam esclarecer a participação de eosinófilos na formação/regulação do granuloma induzido pela infecção por *S. mansoni* e na evolução da morbidade associada a esta infecção.

2. JUSTIFICATIVA

Conforme discutido anteriormente, a morbidade associada à infecção por *S. mansoni* é determinada pela extensão e intensidade da inflamação granulomatosa ao redor dos ovos do parasito retidos nos tecidos. Desta forma, estudos que esclareçam os mecanismos imunológicos envolvidos na formação e na modulação do granuloma esquistossomótico são importantes no entendimento da patologia da esquistossomose e, conseqüentemente, no prognóstico da doença. A diferenciação, o recrutamento e a ativação de eosinófilos são processos dependentes da produção de citocinas e quimioquinas típicas do perfil de resposta Th-2, que é a resposta predominante durante a formação do granuloma. Diversos estudos demonstram que eosinófilos tem papel importante como fonte inicial de citocinas, como célula apresentadora de antígenos e na remodelação tecidual em vários modelos infecção parasitaria.

Na esquistossomose experimental, os eosinófilos podem compor até 50% do infiltrado inflamatório do granuloma. Apesar da infecção por *S. mansoni* ser um grande indutor de eosinofilia, o papel desta célula para o controle do parasito e para a evolução da morbidade é bastante controverso. Portanto, o presente trabalho experimental tem como objetivo a investigação do papel dessa célula durante a infecção por *Schistosoma mansoni*, através da análise comparativa da infecção experimental em camundongos BALB/c não deficientes e camundongos BALB/c Δ dblGATA, que são seletivamente deficientes na diferenciação de eosinófilos.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O presente estudo pretende avaliar a participação dos eosinófilos no controle da carga parasitária, indução da resposta e na gravidade da patologia induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos BALB/c.

3.2. Específicos

- Avaliar comparativamente a sobrevivência de camundongos BALB/c não deficientes (WT) e camundongos BALB/c geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) durante 12 semanas da infecção com *Schistosoma mansoni*.

- Realizar a avaliação da carga parasitária em camundongos WT e Δ dblGATA após 8 e 12 semanas após a infecção por *Schistosoma mansoni*, através da contagem de vermes recuperados na circulação, ovos depositados no fígado e intestino e ovos do parasito eliminados nas fezes dos animais experimentais.

- Quantificar e qualificar a resposta imunológica após 8 e 12 semanas de infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos WT e Δ dblGATA, através da análise da infiltração celular e quantificação de citocinas no fígado dos animais experimentais.

- Avaliar a morbidade induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos WT e Δ dblGATA, através da quantificação da deposição de colágeno no tecido hepático, da análise histopatológica e morfométrica dos granulomas hepáticos e quantificação de transaminases hepáticas após 8 e 12 semanas de infecção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Camundongos BALB/c geneticamente deficientes na diferenciação de eosinófilos (Δ dblGATA) (Yu, et. al., 2002) originalmente importados pelo Dr. Mauro Martins Teixeira e cedidos pelo professor Channing Yu, são mantidos no Biotério de Imunohelmintologia do Departamento de Parasitologia. Camundongos BALB/c não deficientes, de peso e idades semelhantes foram adquiridos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas – UFMG, para utilização como controle na realização do trabalho experimental.

Todos os camundongos são mantidos em racks ventiladas e alimentados com ração granulada para camundongo (marca Labina, fabricado por Cargill Nutrição Animal Ltda, Sao Paulo, Brasil) e água potável ad libitum. Como rotina sanitária do Biotério, todos os animais adquiridos do CEBIO ou desmamados no Biotério de Imunohelmintologia são rotineiramente tratados com Ivermectina, via oral por 7 dias consecutivos (0,8mL de Ivermectina 1% - Chemitac® / L água, fornecida ad libidum). As infecções experimentais foram realizadas após um período mínimo de 10 – 15 dias do final do tratamento. Os experimentos que serão aqui descritos foram previamente analisados e aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animal em pesquisa CEUA – UFMG, com protocolo N°159/2012.

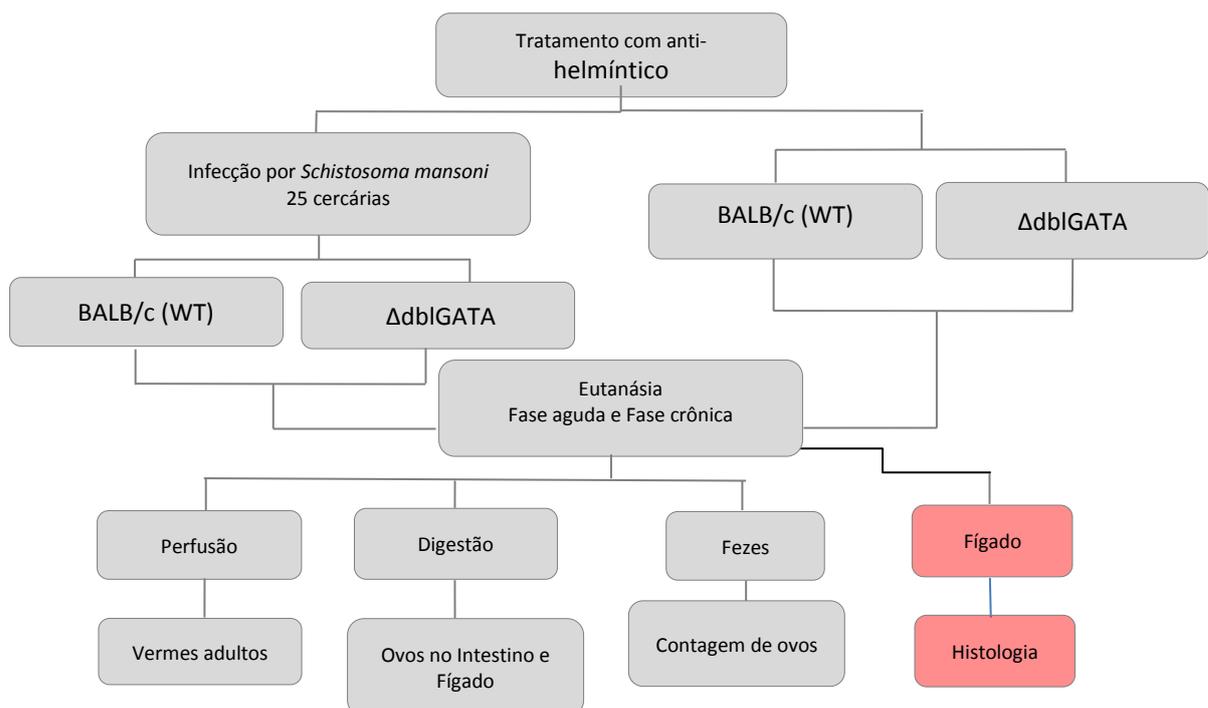
4.2 Delineamento Experimental

4.2.1 Infecção por *S. mansoni* em camundongos BALB/c e Δ dblGATA

Camundongos BALB/c e Δ dblGATA foram individualmente infectados, por inoculação subcutânea, com cerca de 25 cercárias de *S. mansoni*. Nas infecções experimentais foi utilizado *S. mansoni* da cepa LE que vem sendo mantida no laboratório de Esquistossomose por meio de sucessivas passagens por hamsters (*Mesocricetus auratus*) e *Biomphalaria glabrata*, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968).

Os animais infectados de ambos os grupos experimentais e seus respectivos controles foram acompanhados no período de 12 semanas de infecção e as eventuais mortes foram anotadas. Após 8 e 12 semanas da infecção, animais de cada grupo experimental foram anestesiados intraperitonealmente com solução de Ketamina/Xilazina (88 mg/Kg de Dopalen

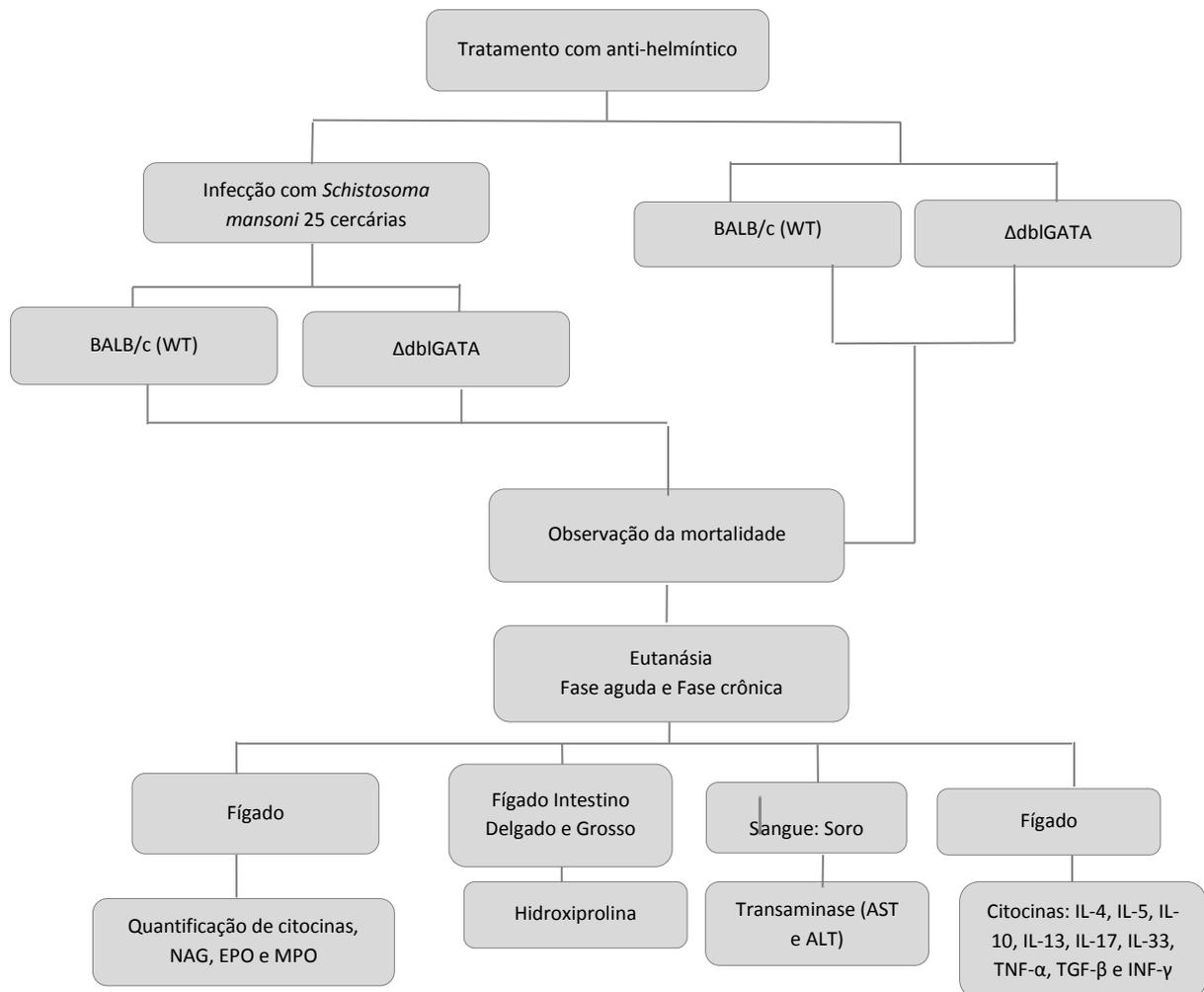
– Sespo Indústria e Comércio Ltda, Jacareí –Brasil e 16 mg/Kg de Kensol – Laboratórios köing S.A. – Avellaneda - Argentina) e eutanasiados por deslocamento cervical para ser utilizados para análises parasitológicas e imunopatológicas. Para análise da carga parasitária, 8-10 animais de cada grupo experimental foram submetidos à perfusão sanguínea para a recuperação de vermes adultos, conforme detalhado a seguir. Posteriormente o fígado e intestino foram retirados e submetidos à digestão para recuperação e quantificação de ovos nos tecidos. Para quantificar os ovos do parasito eliminados nas fezes, no dia anterior à necropsia amostras de fezes de cada animal foram coletadas, pesadas e homogeneizadas em solução contendo fixador para posterior contagem. Em cada grupo experimental foram separados 5-6 animais, que foram eutanasiados no mesmo período e tiveram o fígado e intestino imediatamente separado e fixado para análises histopatológicas (Esquema 1), tendo em vista que a perfusão inviabiliza o uso do tecido para as análises histológicas.



Esquema 1 – Fluxograma ilustrando os grupos experimentais e os procedimentos realizados para avaliações de carga parasitológica e análises histopatológicas em camundongos BALB/c e ΔdbIGATA infectados com 25 cercárias de *Schistosoma mansoni* e seus respectivos controles. Os animais utilizados para histologia não foram perfundidos. Fonte: Elaborado pelo autor.

Animais de todos os grupos experimentais, 8-10 camundongos/grupo, foram anestesiados e eutanasiados após 8 e 12 semanas da infecção para as análises imunológicas. Após a anestesia, a coleta de sangue de cada animal foi realizada pelo plexo braquial e soro obtido foi utilizado para a quantificação de transaminase glutâmica oxalacética (TGO) e transaminase glutâmica pirúvica (TGP). Após a coleta de sangue, os animais foram

eutanasiados e necropsiados para a coleta dos órgãos; o fígado de cada animal experimental foi recolhido, separado em lobos que foram congelados, sendo que o lobo bilobado foi utilizado para a quantificação de citocinas, EPO e MPO, o lobo quadrado foi armazenado para quantificar a atividade de NAG e o lobo maior para avaliação dos níveis de hidroxiprolina tecidual. A metade posterior do intestino delgado e o intestino grosso de cada animal também foram retirados e armazenados para quantificar hidroxiprolina (Esquema 2).



Esquema 2 – Fluxograma ilustrando os grupos experimentais e os procedimentos realizados para avaliações de infiltração celular, deposição de colágeno, quantificação de citocinas e transaminase sérica em camundongos BALB/c e ΔdbIGATA infectados com 25 cercárias de *Schistosoma mansoni* e seus respectivos controles. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Avaliação parasitológica:

A quantificação carga parasitária de cada animal infectado de ambos os grupos experimentais foi realizada através da contagem de vermes recuperados da circulação sanguínea, do número de ovos retidos no fígado e no intestino e do número de ovos

eliminados nas fezes. Antes de serem eutanasiados, foram recolhidas fezes de cada animal experimental infectado, as quais passaram por pesagem e homogeneizadas para serem mantidas em formalina 4%, e posterior contagem de ovos eliminados nas fezes. Posteriormente os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e tiveram suas vísceras expostas. Uma análise macroscópica dos órgãos foi feita, e após ligadura do reto, e secção da veia porta na região em que se seguem seus aferentes mesentéricos. Uma agulha (qual) acoplada a uma bomba de perfusão (Automatic Pipetting Brewer, modelo 60453, B.D) foi introduzida na aorta torácica. Os animais foram então perfundidos com solução salina a 0,85% contendo 80 unidades/L de heparina e o líquido recuperado foi individualmente recolhido em Becker de 250-500mL. O procedimento foi repetido no seio hepático e os vermes recuperados quantificados.

O fígado e intestino de cada camundongo foram recolhidos, picotados e ressuspendidos em solução aquosa contendo 5% de Hidróxido de Potássio (KOH) e incubados por cerca de 4 h em banho-maria 37°C, para que todo tecido fosse digerido. Após sucessivas lavagens para retirada da solução de KOH, o sedimento com os ovos do parasito foram fixados em formalina 4% e, para serem contados e assim estimar a quantidade de ovos retidos no tecido.

4.4 Dosagem de citocinas em homogenatos teciduais

Níveis das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, TNF- α , INF- γ , TGF- β foram estimados em homogenatos de fígado. Para essa quantificação foram maceradas amostras de 100 mg do tecido em um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) na presença de 1ml de tampão fosfato contendo 0,5 % Tween 20; 0,5% Albumina de soro bovino; 0,1mM 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 10.000 g a 4°C e o sobrenadante, recolhido, aliqotado e imediatamente congelado a - 20°C para dosagem de citocinas. O pellet restante foi armazenado para a realização da quantificação da atividade enzimática de EPO e MPO.

As citocinas foram quantificadas utilizando-se kits para ELISA de camundongo seguindo especificações do fabricante (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN). Placa de 96 poços foram sensibilizadas por aproximadamente 15 h (*overnight*) em placas “Half Area” (High Bind) (Greiner Bio-one) com anticorpo de captura anti-citocina de interesse (IL-4,IL-5,

IL-10, IL-13, IL-33, TNF- α , INF- γ e TGF- β) na concentração indicada pelo fabricante. Posteriormente, a placa foi bloqueada com tampão PBS contendo 1% de albumina bovina (BSA- Sigma) Amostras do homogenato de fígado de cada animal experimental foram diluídas (1:5) em tampão PBS contendo 0,1% de BSA (tampão de diluição) e foram adicionadas às placas previamente bloqueadas. Em paralelo, amostras contendo concentrações conhecidas da citocina de interesse diluídas em tampão de diluição foram aplicadas às placas para gerar uma curva padrão. As placas foram incubadas por 2 horas e lavadas com três vezes com a solução de lavagem (PBS 1x + Twen 0,05%). Após as lavagens, foi adicionado tampão de diluição contendo o anticorpo de detecção conjugado à biotina na concentração definida pelo fabricante e as placas foram incubadas por 2 h em temperatura ambiente seguido pela adição de tampão de diluição contendo Streptoavidina conjugada à peroxidase (diluído 1:2000). A reação foi revelada pela adição de substrato (1.6mM tetrametilbenzidina e 0,5 mM H₂O₂ em 0,05mM de tampão NaPO₄ pH 5,4) e, após 30-40 min, a reação foi interrompida com adição de solução 4N de H₂SO₄ e a intensidade da cor foi detectada 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, a leitura de absorbância das amostras foi interpolado à curva padrão gerada pela diluição seriada de quantidades conhecidas de citocinas e o valor foi expresso em pg/100 mg de tecido.

4.5 Avaliação do infiltrado celular

Amostras de homogenato de intestino e fígado obtidas de camundongos dos diferentes grupos experimentais foram usadas para estimar indiretamente a infiltração/atividade de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos através de atividade enzimática, detalhadamente descrita a seguir:

4.5.1 Quantificação de Peroxidase de Eosinófilos (EPO) e Mieloperoxidase (MPO)

A quantificação dos níveis de EPO no intestino e fígado foi realizada como uma forma indireta de medir a eosinofilia tecidual induzida pelo parasito. Este ensaio será conduzido da maneira descrita por Strath *et al.* (1985) e modificado por Silveira *et al.* (2002). Para a realização do ensaio, o pellet obtido do homogenato hepático utilizado para quantificação de citocinas foi ressuspensionado com 1,5mL de salina 0,2% para lise de hemácias, e em seguida de 1,5mL de salina 1,6% contendo 5% de glicose. As amostras foram novamente centrifugadas a

10.000g durante 10 minutos a 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspendido em 1,9mL PBS contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas a 3.000 g durante 10 min a 4°C e o sobrenadante utilizado para realização do ensaio enzimático. O ensaio enzimático foi realizado em placas de 96 poços, adicionando-se 75µl de cada amostra, ou somente 75 µl do diluente (branco), juntamente com 75 µl da solução do substrato composta por 1,5mM o-fenilenodiamina (OPD) em tampão tris-HCL 0,075 mM, pH 8 suplementado com 6.6 mM de H₂O₂. Após aproximadamente 30 minutos de incubação, com o desenvolvimento da cor, a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de solução 4 N de H₂SO₄ e a intensidade da cor estimada através da leitura da absorbância em leitor de microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) a 492 nm.

A quantificação de mieloperoxidase é medida indireta da infiltração e/ou ativação de neutrófilos no parênquima intestinal e hepático. O ensaio foi conduzido conforme descrito por Bayle (1988) e modificado por Barcelos et al (2005). O tecido (100mg) será processado como descrito para quantificação de EPO, porém, a ressuspensão final do sedimento foi feita em 200µl de tampão (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA, pH 4,7), após a adição do tampão, a solução foi homogeneizada em vórtex e centrifugada (10000 g por 15 minutos a 4 °C). O sedimento 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. Após tal procedimento, a solução foi então centrifugada por 15 minutos a 10000 g e o sobrenadante utilizado para o ensaio colorimétrico no qual a atividade de mieloperoxidase na amostra foi estimada pela medida de densidade óptica a 450nm após a incubação com o substrato (1.6 mM tetrametilbenzidina e 0,5 mM H₂O₂ em 0,05 mM de tampão Na PO₄ pH 5,4).

4.5.2 Determinação da atividade de N-Acetilglicosaminidase (NAG)

A atividade da enzima N-acetilglicosaminidase reflete o número de macrófagos que migram para um dado órgão e é amplamente utilizada para estimar a infiltração de macrófagos em amostras de tecidos. Este ensaio foi conduzido, como descrito por Barcelos et al (2005), sendo que nessas condições a reatividade cruzada com enzimas de neutrófilos é mínima. De forma sucinta, 100 mg do lobo quadrado do fígado ou 100 mg de intestino delgado ou grosso dos animais foram pesados e processados em um homogeneizador de tecidos em 1,9 ml de tampão de extração (NaCl 0,1 M, Na₃PO₄ 0,02 M e Na₂EDTA 0,015M

pH 4,7). O material foi centrifugado a 12,000 g por 10 min. O sobrenadante então descartado e eventuais eritrócitos lisados pela adição de 1,5 mL de NaCl 0,2% seguida de 1,5 ml de NaCl 1,6% contendo glicose 5%. As amostras foram mais uma vez centrifugadas e o sobrenadante descartado. O sedimento ressuspenso em 2,0 mL de solução de Triton x-100 em NaCl 0,9%. A suspensão resultante foi centrifugada a 4° C por 10 min a 3.000 r.p.m. e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático que se procederá como descrito a seguir: Adicionando um volume de 100 µl uma placa de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA), em duplicata, o substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-glicosamina), foi adicionado, 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 incubada a 37° C por 10 minutos. O produto final 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 para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) em comprimento de onda igual a 400 nm.

4.6 Avaliação Patológica

4.6.1 Determinação do teor tecidual de hidroxiprolina

Fragmentos de 100 mg de fígado, intestino delgado e grosso de camundongos foram removidos para a determinação de hidroxiprolina como medida indireta da deposição de colágeno, assim como descrito em Reddy & Enwemeka (1996). O tecido foi homogeneizado com salina (0,9% NaCl) e liofilizado. O ensaio foi realizado com 20mg do material liofilizado, que foi submetido à hidrólise alcalina em 300µl de solução salina contendo 75µl de NaOH 10M, autoclavado a 120°C por 20 min. À alíquota de 100µl do hidrolisado foi adicionado 450 µl do Tampão acetado/citrato pH6,5 contendo 0,056M Cloramina T e 10% de n-propanol e incubou-se por 20 min para que a oxidação ocorresse. Uma curva padrão com diluição seriada de hidroxiprolina, a partir de 500µg de hidroxiprolina/ml, foi preparada da mesma maneira. A reação colorimétrica foi iniciada pela adição do reagente de Ehrlich (p-dimetilaminobenzaldeído 1M diluído em n-propanol/ácido perclórico 2:1v/v) e incubadas a 65°C por 35 minutos. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 1500 x g a 4°C. Uma alíquota de 200 µl do sobrenadante foi transferida para placas de 96 poços (Plate Flat Botton – SARSTEDT, Inc.USA) e foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 550nm em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland).

4.6.2 *Quantificação da atividade de AST e ALT*

A avaliação da atividade hepática, a atividade de aspartato aminotransferase (AST) que pode ser nominada também de transaminase glutâmico oxalacética (TGO). A análise foi feita através de um teste colorimétrico da Bioclin seguindo as instruções do fabricante. A curva padrão foi preparada com as dosagens conhecidas oxalato. Para a determinação da atividade enzimática das amostras, 50µl do substrato (Tampão fosfato, 0,1mmol/L pH 7,4, ácido L aspártico, 0,153 mol/L, ácido alfa cetoglutárico 2mmol/L e azida sódica 7,7 mmol/L) foi colocado num tubo de polipropileno de 2,0 ml e incubado a 37°C por 3 minutos. Posteriormente acrescentados 20µl da amostra soro previamente homogeneizada e a mistura foi incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida, 50µl do reagente de cor (2,4 dinitrofenilhidrazina 1,0 mM e ácido clorídrico 1,0M) foi somada a mistura e, depois de homogeneizada, a solução foi colocada em repouso por 20 minutos à temperatura ambiente. Passado o tempo foi adicionado 500µl de hidróxido de sódio 0,4N, após homogeneizar foi colocada em repouso por 5 minutos. Para a leitura, 200µl da curva padrão e das amostras foram colocadas numa placa de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc, USA), então foi feita a leitura da absorbância foi realizada no leitor de microplacas (Statur-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) em comprimento de onda de 505nm.

A quantificação do nível de alanina aminotransferase (ALT), ou transaminase glutâmico pirúvica (TGP), foi realizada utilizando o Kit para teste colorimétrico da Bioclin, seguindo as instruções do fabricante. A curva padrão será preparada com as dosagens conhecidas de piruvato. Seguindo, posteriormente os passos descritos anteriormente para a quantificação de AST.

4.7 Avaliação patológica

4.7.1 *Análise histopatológica*

Para análises histopatológicas, amostras de fígado e intestino delgado foram removidas e lavadas 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 embocado 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.

4.7.2 Análise morfométrica da área do granuloma

As lâminas preparadas de secções do fígado e intestino, coradas pelo método Hematoxilina-eosina, foram analisadas ao microscópio óptico para caracterização do infiltrado inflamatório e da composição dos granulomas formados ao redor de ovos depositados nestes tecidos. Para analisar comparativamente o tamanho de granulomas hepáticos induzidos por ovos de *S. mansoni* em ambos os grupos experimentais, as imagens foram capturadas com uma objectiva 20x com uma ampliação de 10x ocular com uma câmera digital (DP12; Olympus) e analisados com software Image Pro-Plus 4.0. Foram analisados cerca de trinta granulomas de fase exudativa-produtiva contendo um único ovo central com miracídeos viáveis selecionados aleatoriamente para cada animal. Os granulomas coalescentes, isto é, granulomas nas quais é possível observar mais de um ovo, ou granulomas em que o ovo não era visível ou encontrava-se destruídos foram excluídos da análise. A área de granuloma foi medida em imagens digitais usando o Image Pro-Plus 4.0, o volume e área de cada um foi calculado assumindo uma forma esférica.

4.7.3 Curva de Mortalidade

Para a realização da curva de mortalidade os grupos de camundongos BALB/c WT e ΔdblGATA infectados com *S.mansoni* foram observados semanalmente durante 12 semanas, e os eventuais casos de óbitos foram anotados.

4.8 Análise Estatística

Os dados apresentados foram avaliados utilizando o software Graphpad Prism 5.1 e a identificação daqueles paramétricos por meio do teste de normalidade de Shapiro-wilk.

Posteriormente, apresentados como média \pm erro padrão e analisados usando teste t de Student (2 grupos) ou o teste de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Newmans-Keuls para comparações de todos os grupos entre si. A curva de mortalidade foi analisada utilizando o teste Kaplan-Meier seguido do post-test Longrank. As diferenças de $P \leq 0,05$ foram consideradas significativas.

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da carga parasitária em camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA experimentalmente infectados por *S.mansoni*

A inoculação de 25 cercárias de *S. mansoni*, permitiu que a carga parasitária dos camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA fosse estimada através da quantificação de vermes adultos recuperados pela técnica de perfusão sanguínea, pela contagem de ovos por grama de fezes e daqueles que ficaram retidos nos tecidos.

Na 8ª semana da infecção experimental, fase aguda da esquistossomose, a perfusão sanguínea resultou na recuperação média de $11,3 \pm 0,70$ vermes de camundongos BALB/c e de $11,7 \pm 0,55$ em animais Δ dblGATA, sem diferença estatística entre os grupos experimentais (Figura 8A). Na fase crônica, também não foi observado diferença significativa na recuperação de vermes entre os grupos experimentais, sendo recuperado em média $10,9 \pm 0,60$ vermes adultos em camundongos BALB/c e $11,5 \pm 0,68$ nos camundongos Δ dblGATA (Figura 8B). Também não foi verificada diferença estatística no número de vermes fêmeas ou machos recuperados de ambos os grupos experimentais, tanto na fase aguda como na fase crônica da esquistossomose experimental (Figura 8A e 8B).

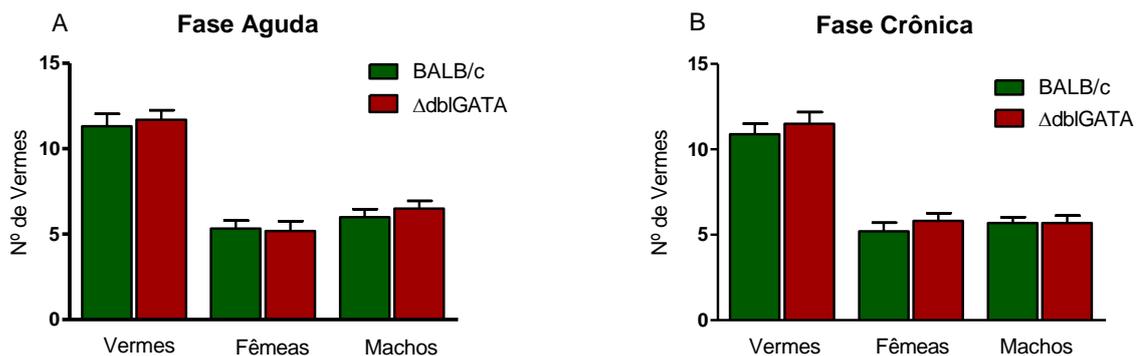


Figura 8 – Número de vermes recuperados da circulação sanguínea de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA infectados com *Schistosoma mansoni*. Camundongos de ambos os grupos experimentais foram infectados subcutaneamente com 25 cercárias/camundongos e, após 8 semanas (fase aguda - A) e 12 semanas (fase crônica - B), foram perfundidos e os vermes recuperados, diferenciados em machos e fêmeas e contados. Os valores representam a média \pm EPM de vermes recuperados de camundongos infectados BALB/c (fase aguda, n=9; fase crônica, n=10) e Δ dblGATA (fase aguda, n= 10; fase crônica, n=10).

A quantificação do número ovos do parasito eliminados nas fezes dos animais infectados revelou que camundongos BALB/c WT eliminaram em média $274,7 \pm 55,43$

ovos/g de fezes e os camundongos Δ dblGATA em média $187,7 \pm 70,87$ ovos/g de fezes durante a fase aguda. Na fase crônica, foram recuperados em média $223,4 \pm 36,07$ ovos/g de fezes nos camundongos BALB/c e $163,1 \pm 29,29$ ovos/g de fezes nos camundongos Δ dblGATA, não sendo verificado diferença estatística no número de ovos eliminados nas fezes dos camundongos infectados de ambos os grupos experimentais (Figura 9A). Os camundongos infectados apresentaram um aumento do número de ovos acumulados no intestino e fígado da fase aguda para a fase crônica da infecção em ambos os grupos experimentais (Figura 9B e 9C). Entretanto, para cada fase da infecção não foi observada diferença significativa no número de ovos retidos no fígado dos animais Δ dblGATA comparado com WT. Ao contrário do observado no fígado, o número de ovos retidos no intestino dos camundongos Δ dblGATA cronicamente infectado foi significativamente maior que nos camundongos WT cronicamente infectados.

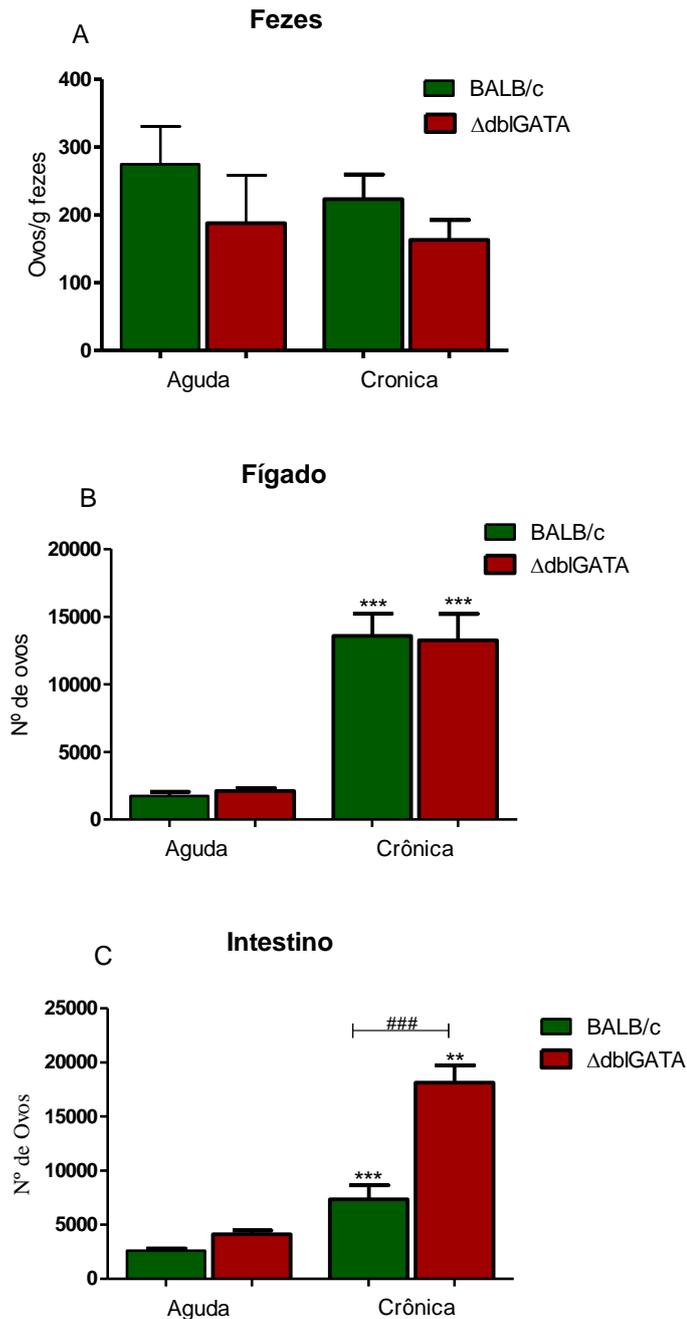


Figura 9 – Número de ovos eliminados nas fezes (A) ou retidos no fígado (B) e intestino (C) de camundongos BALB/c e Δ dblGATA no decorrer da infecção por *S. mansoni*. O número total de ovos eliminados por grama de fezes, retidos no fígado e intestino foi estimado a partir de contagens realizadas em microscópio óptico de amostras processadas na fase aguda (8 semanas) e fase crônica (12 semanas) da infecção experimental com 25 cercárias/camundongos. Os valores representam a média \pm EPM de camundongos BALB/c (fase aguda, n=12; fase crônica, =10) e Δ dblGATA (fase aguda, n=10; fase crônica, n=10) * representa p < 0,05, ** representa p < 0,01, *** representa p < 0,001 na comparação entre o número de ovos quantificados na fase aguda (8 semanas) e fase crônica (12 semanas) da infecção *S. mansoni* em camundongos com o mesmo genótipo e ### é p < 0,001 na comparação de animais de genótipo diferente. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

5.2 Quantificação de citocinas no tecido hepático

A quantificação de citocinas no homogenato hepático de camundongos BALB/c não deficientes revelou que a concentração de TNF- α (Figura 10A) e de INF- γ (Figura 10B) aumenta significativamente durante a fase aguda da esquistossomose experimental, retornando a níveis próximos aos basais durante a fase crônica da infecção. Em camundongos deficientes para diferenciação de eosinófilos a concentração destas citocinas manteve-se aumentada na fase crônica, revelando uma diferença estatística em relação os camundongos BALB/c WT.

Os níveis de IL-17 (Figura 10C) aumenta de maneira progressiva e significativa ao longo do tempo em ambos os grupos experimentais, BALB/c e Δ dblGATA. Todavia, os camundongos WT retratam um aumento mais elevado em relação àqueles deficientes para a maturação de eosinófilos. Portanto ao realizar a comparação dos dois grupos é possível visualizar uma diferença estatística entre eles.

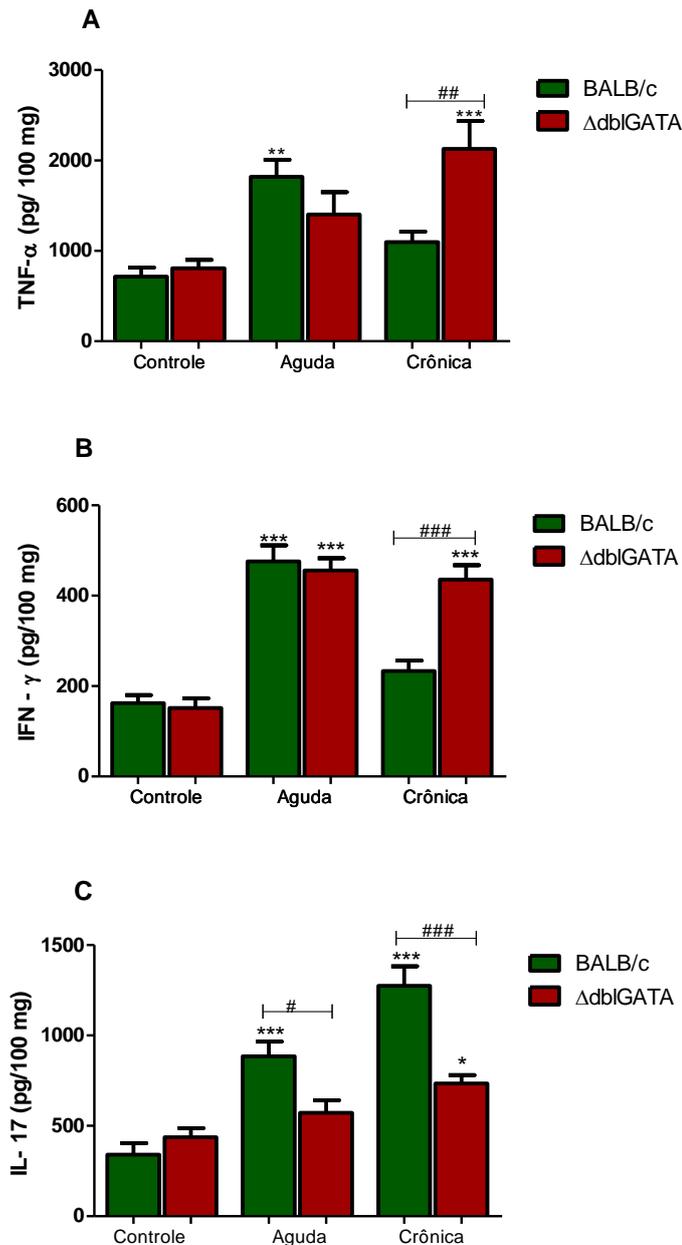


Figure 10 – Concentração de citocinas TNF- α (A), IFN- γ (B) e IL-17 (C) no homogenato hepático de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA durante a infecção por *S.mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de TNF- α , IL-17 e IFN- γ estimada pela técnica de ELISA no homogenato de fígado de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA infectados subcutaneamente com 25 cercárias/animal e necropsiados após 8 semanas de infecção (fase aguda) e 12 semanas (fase crônica). BALB/c n=8/10 animais; Δ dblGATA n=8/10 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente). ### representa p <0,001, ## representa p < 0,01 e # representa p<0,05 em comparação aos animais de genótipo diferente. *** representa p<0,001, ** representa p < 0,01 e * representa p < 0,05 para comparação entre camundongos de mesmo genótipo. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

No homogenato de tecido hepático também foi avaliado o perfil de citocinas de perfil Th2, através da quantificação de IL-33 (Figura 11A), IL-5 (Figura 11B), IL-13 (Figura 11c) e IL-4 (Figura 11D). Os níveis de IL-33, IL-13 e IL-5 apresentam uma elevação na fase aguda e

retornam a valores basais na fase crônica da infecção, após a modulação da resposta, sendo significativo nos animais BALB/c e menos pronunciado nos camundongos Δ dblGATA. Ao comparar a produção das citocinas dentre os grupos experimentais foi verificado que animais WT apresentam níveis significativamente maiores que os camundongos Δ dblGATA fase aguda. A concentração de IL-4 no homogenato hepático também aumentou na fase aguda e retornou aos níveis basais na fase crônica em ambos os grupos, mas sem diferença estatística entre os grupos.

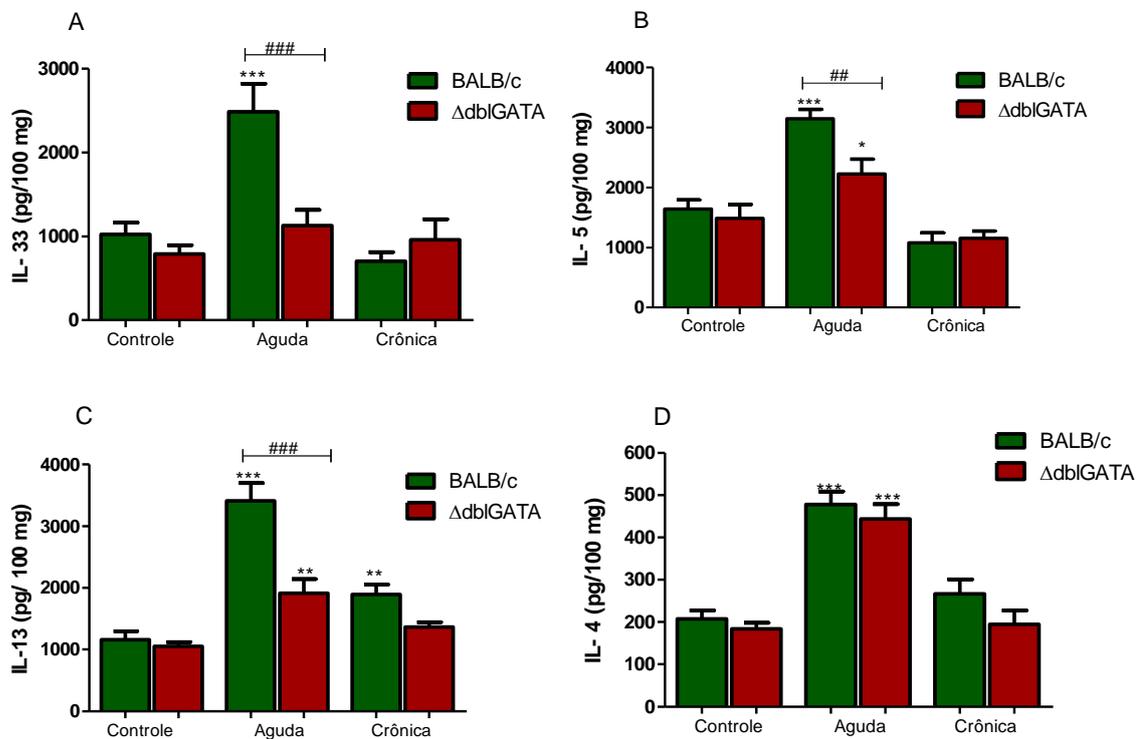


Figura 11 – Concentração de citocinas perfil Th2 no homogenato de fígado de camundongos Balb/c WT e Δ dblGATA durante a infecção por *S.mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de IL-33 (A), IL-5 (B), IL-13 (C) e IL-4 (D) estimada pela técnica de ELISA no homogenato de fígado de camundongos Balb/c WT e Δ dblGATA infectados subcutaneamente com 25 cercárias/animal e necropsiados após 8 semanas de infecção (fase aguda) e 12 semanas (fase crônica). Para o fígado : Balb/c n=8/10 animais; Δ dblGATA n=8/10 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente). ### representa p <0,001, ## representa p < 0,01 e # representa p<0,05 em comparação aos animais de genótipo diferente . *** representa p<0,001, ** representa p < 0,01 e * representa p < 0,05 para comparação entre camundongos de mesmo genótipo. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

A concentração de citocinas regulatórias, IL-10 e TGF- β , no homogenato hepático dos animais experimentais no decorrer da infecção por *S. mansoni* esta ilustrado na Figura 12. Os dados mostram que a concentração destas citocinas aumenta progressivamente no decorrer da infecção tanto em camundongos BALB/c WT como em Δ dblGATA. Entretanto, a concentração hepática de IL-10(Figura 12A) e de TGF- β (Figura 12B) foi significativamente

superior nos camundongos BALB/c em relação àqueles Δ dblGATA tanto na fase aguda como na fase crônica da esquistossomose.

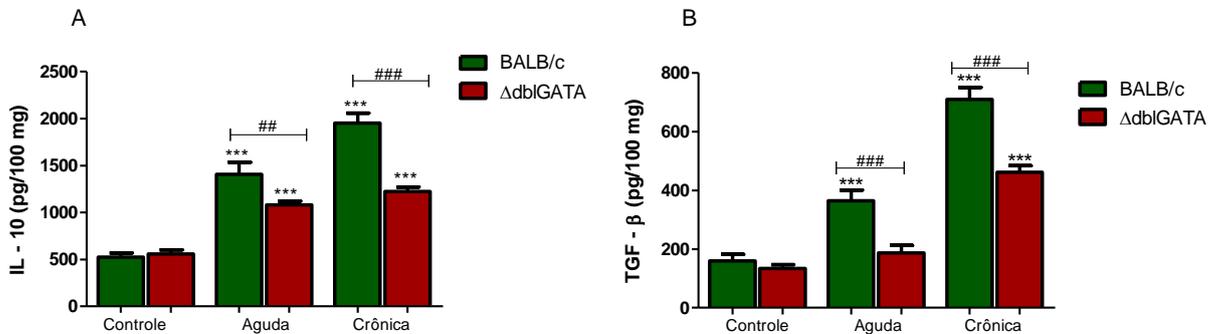


Figura 12 – Concentração de IL-10 (A) e TGF- β (B) no homogenato hepático em animais BALB/c WT e Δ dblGATA durante a infecção por *S.mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de IL-10 e TGF- β estimada pela técnica de ELISA no homogenato de Fígado de camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA infectados subcutaneamente com 25 cercárias/animal e necropsiados após 8 semanas de infecção (fase aguda) e 12 semanas (fase crônica). Para o fígado: BALB/c n=8/10 animais; Δ dblGATA n=8/10 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente). ### representa p <0,001, ## representa p < 0,01 e # representa p <0,05 em comparação aos animais de genótipo diferente. *** representa p <0,001, ** representa p < 0,01 e * representa p < 0,05 para comparação entre camundongos de mesmo genótipo. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

5.3 Avaliação Histopatológica

5.3.1 Avaliação da área e volume do granuloma esquistossomótico

Na figura 13 encontra-se ilustrado aparência e tamanho dos granulomas hepáticos induzidos pelos ovos de *S. mansoni* em camundongos WT e Δ dblGATA, na fase aguda e crônica da esquistossomose. Em camundongos BALB/c WT, os granulomas hepáticos observados na fase aguda (8 semanas da infecção) são grandes, com intenso infiltrado inflamatório e deposição desorganizada de matriz extracelular (Figura 13A). A aparência da reação granulomatosa ao redor dos ovos depositados no fígado de camundongos Δ dblGATA após 8 semanas da infecção tem aparência bastante semelhante (Figura 13B). Na fase crônica da esquistossomose os granulomas hepáticos observados em camundongos BALB/c WT apresentam redução de celularidade e deposição organizada de matriz extracelular, características do processo de modulação (Figura 13C) Todavia, em camundongos Δ dblGATA cronicamente infectados, o granuloma hepático continua apresentando um intensa infiltração celular, especialmente na periferia da reação e a deposição de matriz extracelular

continua grande e desorganizada (Figura 13D). A análise morfométrica de granulomas hepáticas dos diferentes grupos experimentais mostram que na fase aguda da esquistossomose a área (figura E) e o volume (figura F) dos granulomas são semelhantes entre camundongos WT e Δ dblGATA. Na fase crônica da esquistossomose a área e volume dos granulomas reduz significativamente nos camundongos WT e Δ dblGATA; entretanto, o tamanho dos granulomas de animais WT são significativamente menores que o tamanho dos granulomas hepáticos de camundongos deficientes para a maturação de eosinófilos. (Figura 13E e 13F).

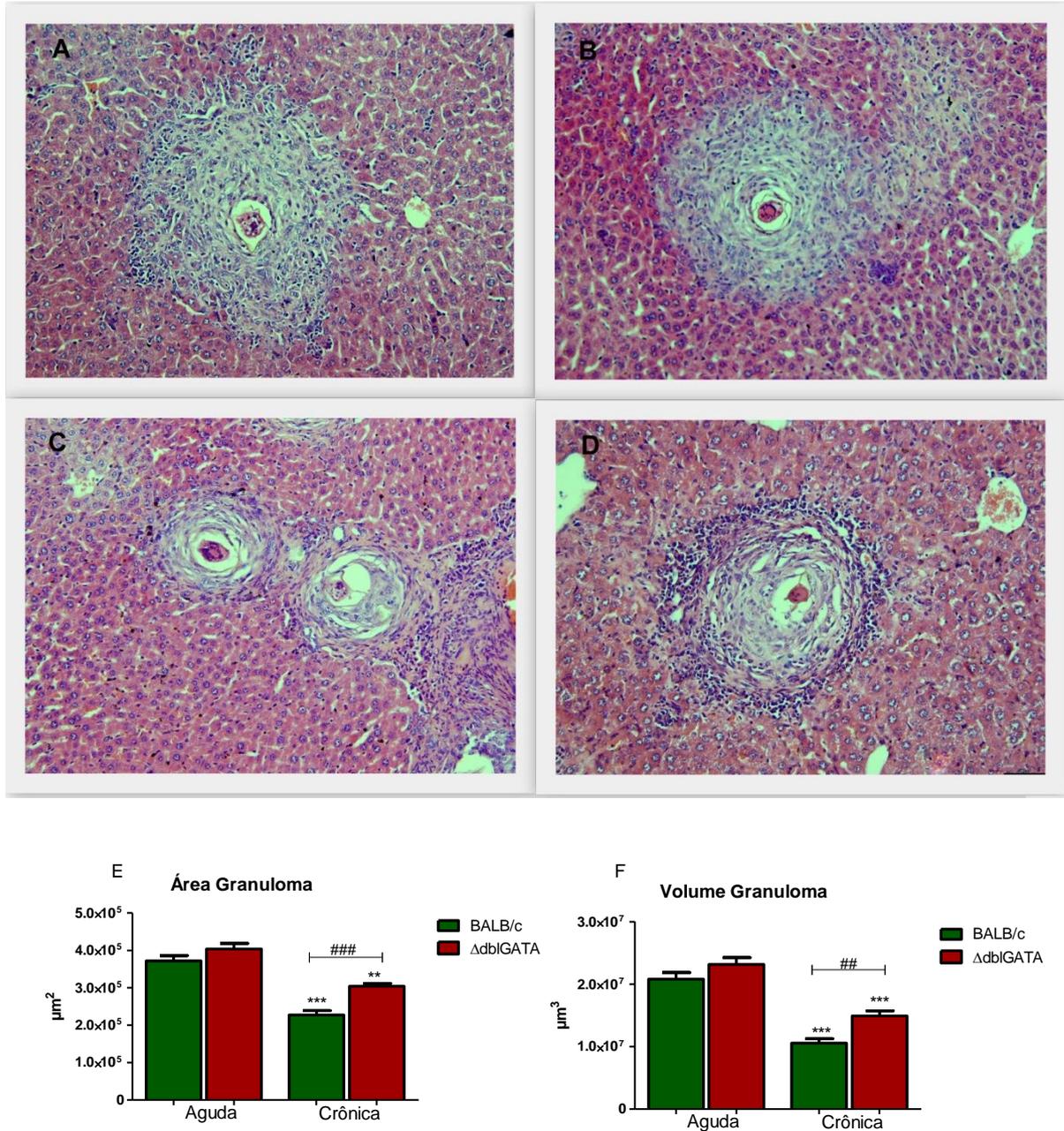


Figura 13 – Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c (A e C) e $\Delta\text{dblGATA}$ (B e D) infectados por *S. mansoni*. Os animais foram infectados com cerca de 25 cercárias após 8 semanas (A e B) e 12 semanas (C e D) o fígado foi retirado, fixado, embocado em parafina e seccionado. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. Aumento de 200x. Granulomas isolados foram fotografados e medidos, sendo representado nas figuras E e F representando a análise morfométrica dos granulomas hepáticos, área (E) e volume (F) em camundongos BALB/c WT e $\Delta\text{dblGATA}$ infectados experimentalmente com *S.mansoni*. Os camundongos BALB/c WT e $\Delta\text{dblGATA}$ foram infectados experimentalmente com cerca de 25 cercárias e acompanhados nas fases aguda (8 semanas) e crônica (12 semanas). Para o fígado: BALB/c n=5/4 animais; $\Delta\text{dblGATA}$ n=5/5 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente). Para ** p < 0,01 e *** p < 0,001 na comparação de animais do mesmo genótipo e # p < 0,05 e ## p < 0,01 para comparar animais de genótipos distintos. Análise ANOVA-post test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

5.3.2 Avaliação do infiltrado celular no granuloma esquistossomótico.

Na figura 14 está ilustrado o tipo de infiltração celular presente no granuloma esquistossomótico na fase aguda e crônica da infecção por *Schistosoma mansoni*. Neste aumento é possível identificar a presença de granulócitos, especialmente eosinófilos, nos granulomas hepáticos em camundongos WT (Figura 14 A e C), mas não em Δ dblGATA (Figura 14B e D), este apresentando uma maior quantidade de mononucleares.

Na figura 15, está evidente a maior presença de polimorfonucleares nos animais WT, uma vez que apresentam um nível de EPO (figura 15A), para eosinófilos, e MPO (figura 15B), para neutrófilos, estatisticamente maiores nos mesmos durante as fases aguda e crônica da infecção por *Schistosoma mansoni*. Em contrapartida o infiltrado de mononucleares avaliado através dos níveis de NAG encontra-se semelhante em ambos os grupos experimentais no período de 8 e 12 semanas após a infecção. (15C).

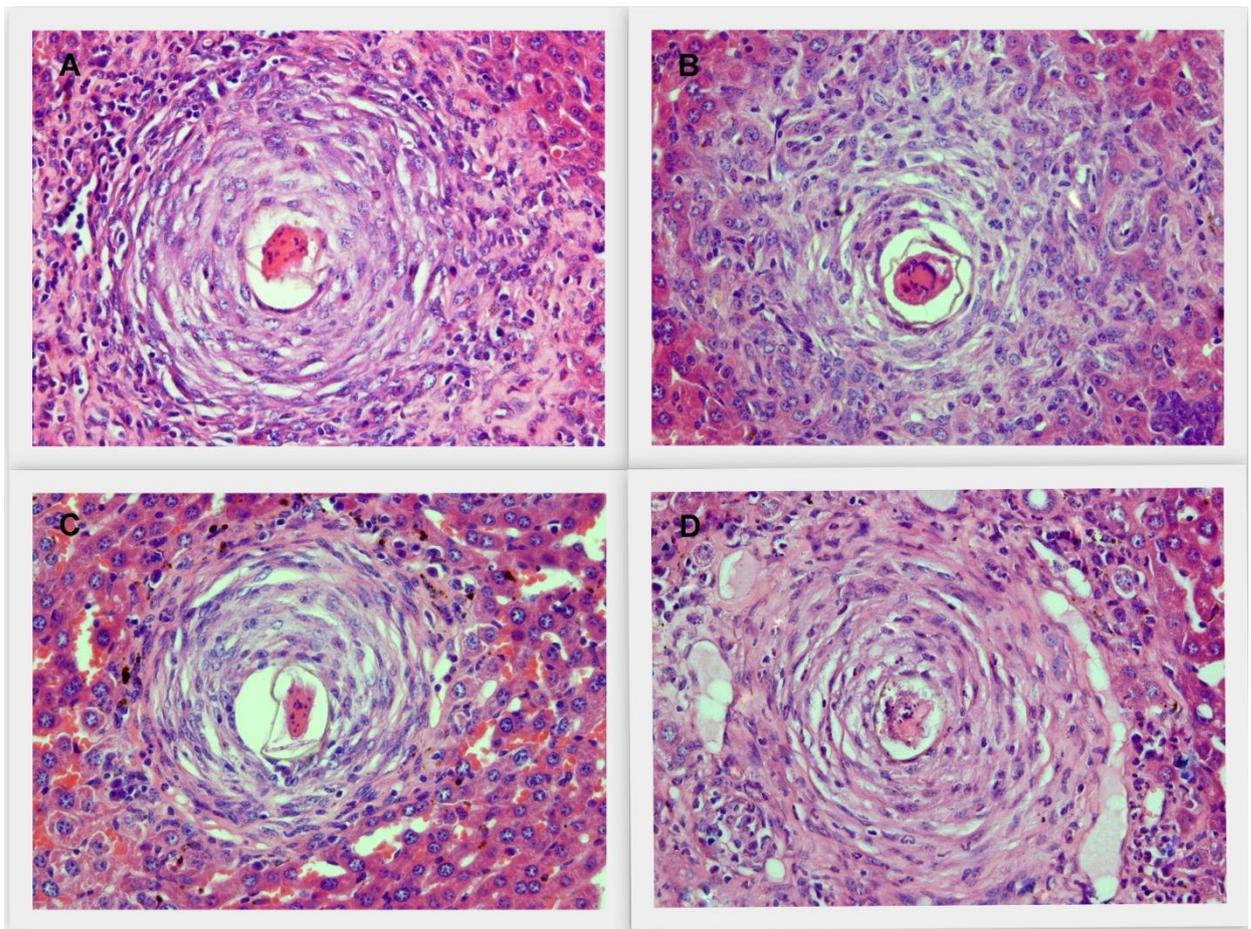


Figura 14 – Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c (A e C) e Δ dblGATA (B e D). Os animais foram infectados com 25 cercárias/camundongos e após 8 semanas (A e B) e 12 semanas (C e D) o fígado foi retirado, fixado, embocado em parafina e seccionado. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. Aumento de 400x. Notar a presença de eosinófilos (circundados) em A e C

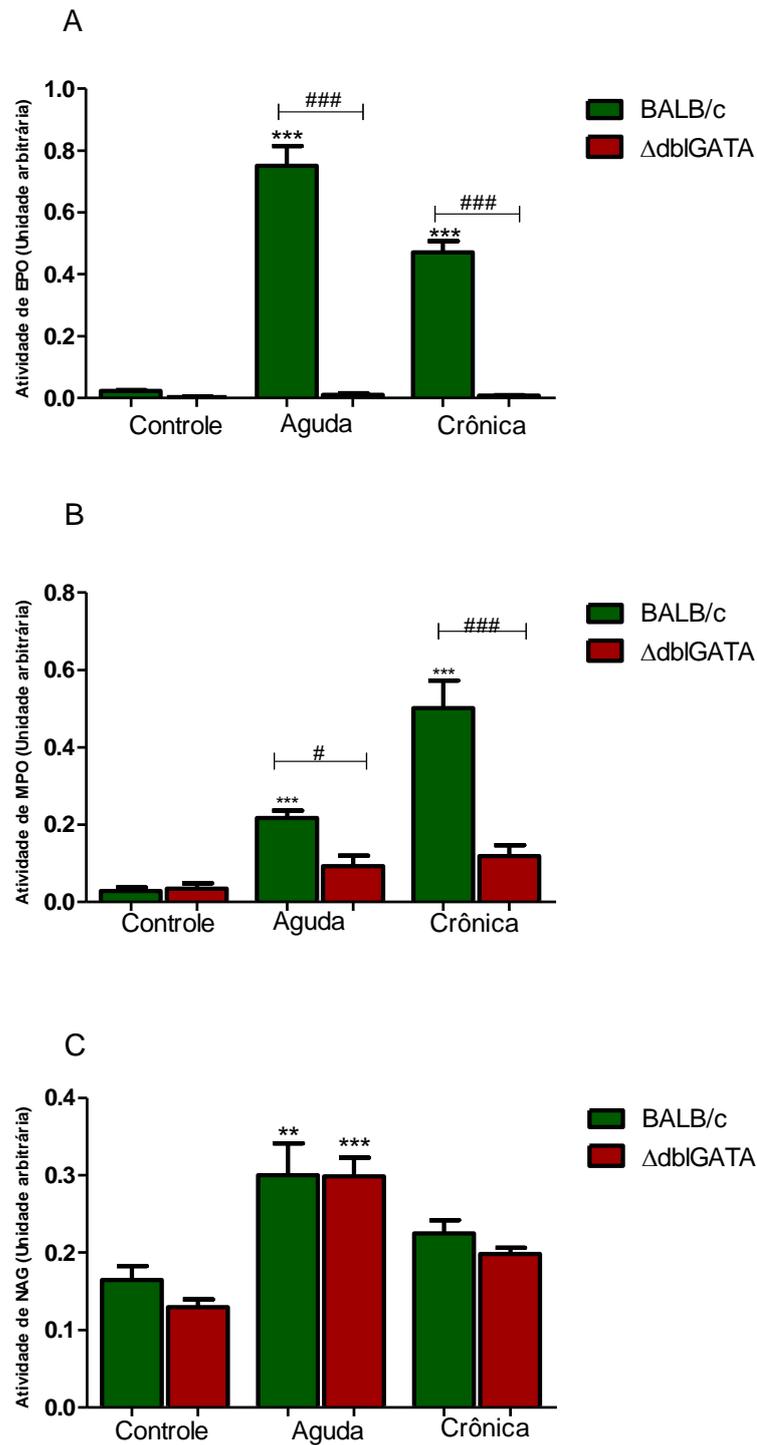


Figura 15 – Gráficos representam a medida indireta do infiltrado celular no tecido hepático, eosinófilos (A) através da eosinófilo peroxidase, neutrófilos (B) através da mieloperoxidase e macrófagos (C) através da N-acetilglicosaminidase. Os valores representam a média \pm EPM de absorvância obtidos com 100 mg de fígado de camundongos BALB/c WT e Δ dbIGATA não infectados, após 8 (fase aguda) e 12 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. Para o fígado: BALB/c n=9/8 animais; Δ dbIGATA n=10/8 animais (fase aguda/fase crônica, respectivamente). Para # representa $p < 0,05$ e ### representa $p < 0,001$ em comparação aos animais de genótipos diferentes. Para ** $p > 0,01$ e *** representa $p < 0,001$ na comparação entre camundongos de mesmo genótipo. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

5.3.3 Quantificação da deposição de colágeno no tecido hepático e intestinal

As figuras 16 e 17 demonstram diferenças na deposição de colágeno no tecido hepático dos camundongos BALB/c e Δ dblGATA infectados por *S. mansoni*. A deposição de matriz extracelular no granuloma foi evidenciada pela coloração por Tricrômico de Masson e foi evidenciada pela cor azul nas fotomicrografias (figura 16). Em camundongos WT, o granuloma de fase aguda mostra uma coloração azul difusa pela inflamação, mas menos intensa (Figura 16A), já na fase crônica da esquistossomose é possível observar uma coloração azul bem intensa e compactada, formando fibras concêntricas ao redor dos ovos do parasito (Figura 16C). Diferentemente, em camundongos Δ dblGATA a coloração azul que caracteriza deposição de matriz extracelular na reação granulomatosa induzida pelos ovos do parasito apresenta-se difusa e pouco intensa tanto na fase aguda (Figura 16B), como na fase crônica (Figura 16D).

A quantificação de colágeno no tecido foi indiretamente estimada pela quantidade de hidroxiprolina em amostras de fígado dos grupos experimentais (Figura 17). Os dados mostram que os níveis de deposição de colágeno no tecido hepático (17A), intestino delgado (17B) e intestino grosso (17C) são significativamente mais elevados nos animais BALB/c em relação aos animais Δ dblGATA no período de 8 e 12 semanas após infecção, fase aguda e crônica respectivamente evidenciam sua menor presença de prolina em relação àqueles BALB/c.

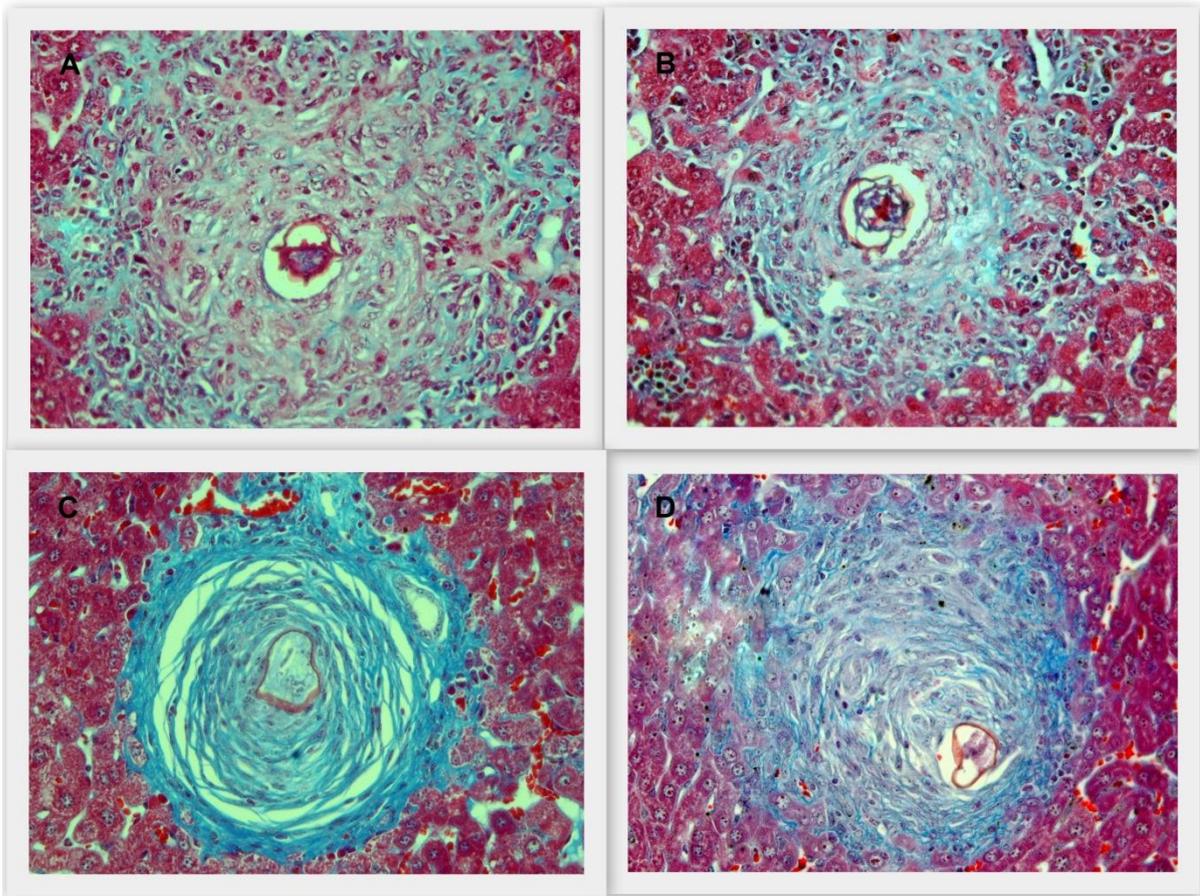


Figura 16 - Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c (A e C) e Δ dblGATA (B e D). Os animais estão infectados com cerca de 25 cercárias após 8 semanas (A e B), fase aguda, e 12 semanas (C e D), fase crônica. Os cortes foram corados com Tricrômico de Masson. Aumento 400x.

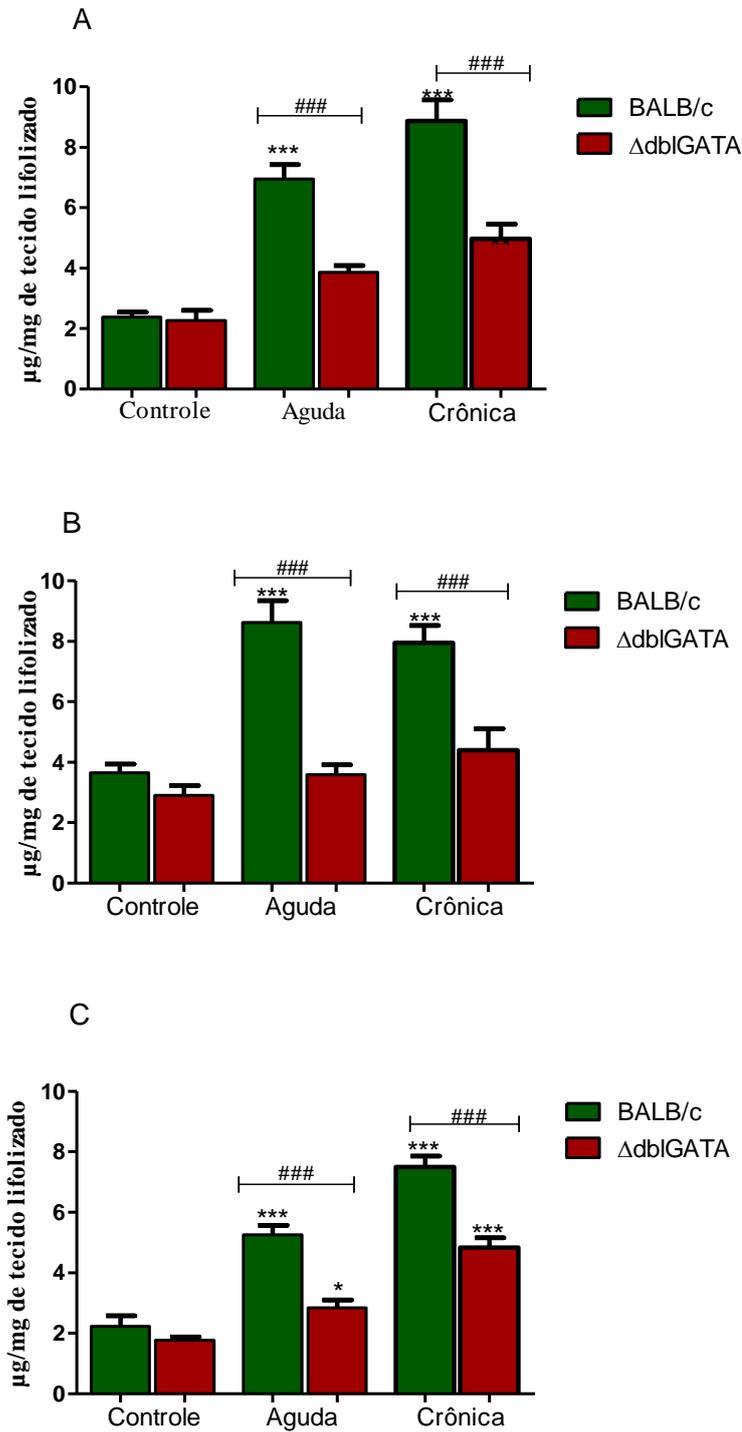


Figura 17 - Gráficos com níveis de Hidroxiprolina tecidual presentes no fígado (A), intestino delgado (B) e intestino grosso (C) em camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA infectados experimentalmente com *S.mansoni*. Os camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA foram infectados experimentalmente com cerca de 25 cercárias e acompanhados nas fases aguda (8 semanas) e crônica (12 semanas). Os dados são de 1 experimento somando BALB/c WT são 11/9 e Δ dblGATA são 10/10, fase aguda e crônica respectivamente. Para * p < 0,05 e *** p < 0,001 na comparação de animais do mesmo genótipo e ### p < 0,001 para comparar animais de genótipos distintos. Análise ANOVA-post test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

5.3.4 Avaliação do dano tecidual através da transaminase sérica

As lesões hepáticas provocadas pela infecção por *S. mansoni* nas áreas adjacentes ao granuloma podem ser mais bem visualizada na figura 18. A infecção por *S. mansoni* resulta em áreas de necrose observada no tecido hepático tanto em camundongos WT (Figura 18A e C) como em Δ dblGATA (Figura 18 B e D). Entretanto as lesões parecem mais intensas e extensas nos camundongos deficientes em eosinófilos (Figura 18B e D).

As imagens representando o dano tecidual sofrido pelos animais corroboram com os dados da quantificação de transaminase sérica, AST e ALT, gráficos 19A e 19B respectivamente. A lesão tecidual é retratada com maior intensidade nos animais Δ dblGATA, detentores dos níveis mais elevados de transaminase nas fases aguda e crônica em relação aos camundongos BALB/c.

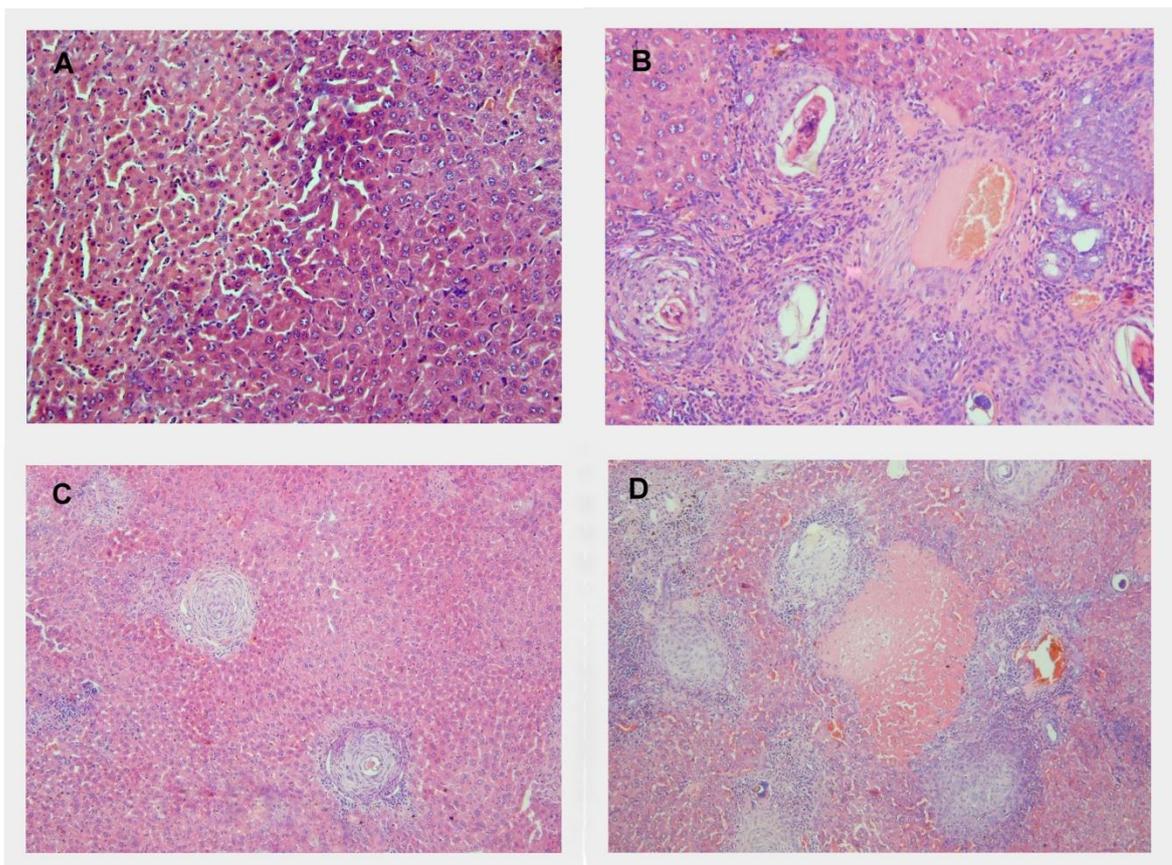


Figura 18 – Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos BALB/c (A e C) e Δ dblGATA (B e D). Os animais estão infectados com cerca de 25 cercárias após 8 semanas, fase aguda. Os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina. Aumento de 200x (A e B) e 100x (C e D) .

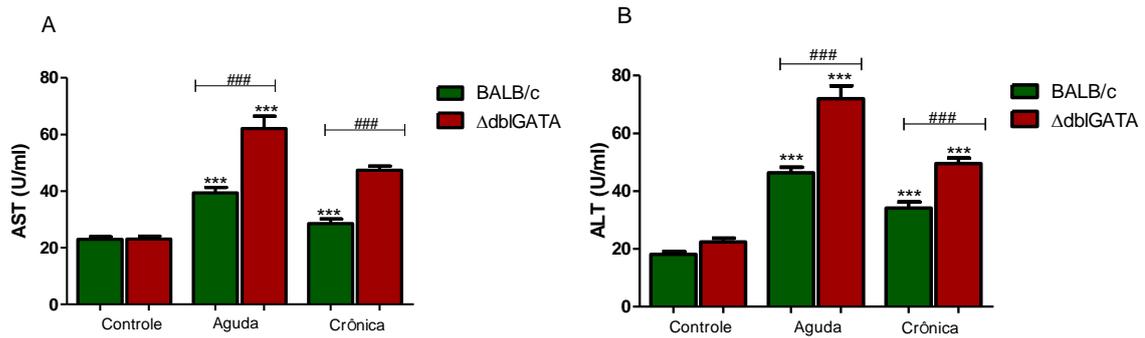


Figura 19 –Os gráficos representam os níveis de transaminase sérica Aspartato aminotransferase, AST, (A) e Alanina aminotransferase para avaliar o dano tecidual, ALT, (B). Os camundongos foram infectados com *S. mansoni*, cerca de 25 cercárias/animal, e através do seu soro foram quantificados os níveis de ALT e AST com 8 (fase aguda) e 12 (fase crônica) semanas. Resultado baseado em 1 experimento (BALB/c = 10/9 animais e ΔdblGATA = 8/10 animais, fase aguda e crônica respectivamente. Para * p< 0,05 e *** p < 0,001 na comparação de animais do mesmo genótipo e # p< 0,05 e ### p<0,001 para comparar animais de genótipos distintos. Análise ANOVA-post test Newman-Keuls Multiple Comparison Test.

5.4 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 12^a semana de infecção (fase crônica), para contabilizar a mortalidade induzida pela esquistossomose nos camundongos BALB/c WT e ΔdblGATA (Figura 20). Em camundongos WT e ΔdblGATA na fase aguda a taxa de sobrevivência foi de 100 % e os óbitos ocorreram a partir da 10^a semana de infecção, enquanto que animais ΔdblGATA infectados por *S.mansoni* obtiveram uma taxa de sobrevivência de 92 % e os BALB/c cerca de 96% não havendo diferença significativa entre os grupos experimentais.

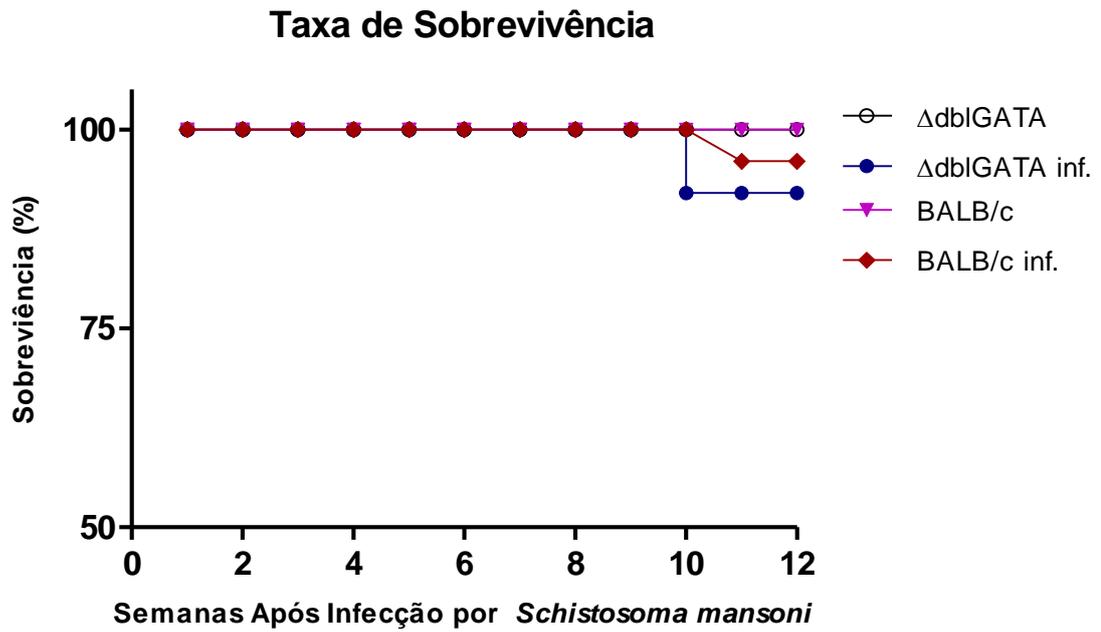


Figura 20 – Curva de mortalidade induzida pela infecção por *S. mansoni* em camundongos BALB/c WT e Δ dblGATA. Foram acompanhados camundongos BALB/c e Δ dblGATA infectados com 25 cercárias/animal durante 12 semanas de infecção (BALB/c n= 10animais; Δ dblGATA n=10animais), realizado em 1 experimento . Análise comparação por Kaplan-Meier, post-test Longrank.

6. DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste estudo indicam que eosinófilos não tem uma participação essencial no controle da infecção por *S. mansoni*; entretanto, a ausência destas células tem um grande impacto na evolução das lesões hepáticas induzidas pela deposição de ovos do parasito.

A participação de eosinófilos na destruição de helmintos foi inicialmente demonstrada em infecções experimentais por *Strongyloides stercoralis* e *Angiostrongylus cantonensis* (Sasaki, et al. 1993; Rotman, et al. 1996; Sugaya, et al. 1997) em camundongos deficientes na produção de IL-5, que demonstraram que os animais deficientes apresentaram grande redução de eosinófilos circulantes acompanhada por aumento da carga parasitária.

No caso de *S. mansoni*, vários estudos realizados *in vitro* demonstraram que os eosinófilos, com auxílio de anticorpos específicos, são capazes de eliminar esquistossômulos (Butterworth *et al.*, 1979; Andrade *et al.*, 1984; Gentil *et al.*, 2013). Entretanto, apesar da grande redução na eosinofilia observada em camundongos deficientes na produção de IL-5 (IL-5^{-/-}) e infectados por *S. mansoni*, não foi detectado diferença significativa da carga parasitária de camundongos IL-5^{-/-} e WT (Reiman, et al., 2006). No presente estudo, a infecção experimental por *S. mansoni* foi realizada em camundongos Δ dblGATA, que são seletivamente deficientes para a maturação dos eosinófilos, e também não foi detectado diferenças no número de vermes recuperados da circulação ou de ovos eliminados nas fezes ou retidos no fígado entre camundongos WT e camundongos Δ dblGATA, indicando que eosinófilos não tem papel fundamental na destruição das diferentes formas evolutivas de *S. mansoni*. Estes dados são semelhantes àqueles obtidos por Swartz, et. al. (2006) utilizando animais Δ dblGATA e TgPHIL.

Diferente do encontrado no fígado, as contagens de ovos realizadas no intestino dos animais cronicamente infectados claramente mostram retenção significativamente maior de ovos no tecido de camundongos Δ dblGATA em relação aos BALB/c. É possível que a ausência de eosinófilos afeta a resposta imune que facilita a saída dos ovos do parasito da mucosa para na luz intestinal. A produção e secreção de enzimas proteolíticas geradas pela reação granulomatosa podem lesar o tecido intestinal e facilitar a passagem dos ovos e sua excreção na urina ou fezes (Doenhoff *et al.*, 1986; Perrin & Phillips, 1988).

Na esquistossomose, cerca de 40% dos ovos produzidos pelo parasito ficam retidos nos tecidos do hospedeiro, principalmente no fígado e intestino, e são responsáveis pela indução da resposta Th2, fundamental para a formação do granuloma esquistossomótico

(Chiaramonte *et al.*, 1999; Fallon, 2000; Pearce & MacDonald, 2002; Wynn *et al.*, 2004; Gryseels *et al.*, 2006; Souza *et al.*, 2011). A reação celular decorrente dessa resposta influencia diretamente na morbidade da doença na fase crônica. (Ross *et al.*, 2002; Andrade, 2005; Chuah *et al.*, 2014). Dessa forma, também avaliamos aspectos da resposta imune associados à esquistossomose experimental e seu impacto nos camundongos deficientes para a maturação de eosinófilos.

A ausência de eosinófilos durante a infecção por *Schistosoma mansoni* alterou significativamente a resposta imune no fígado, principal local de formação dos granulomas induzidos pela retenção dos ovos do parasito. No homogenato hepático obtido na fase aguda da esquistossomose de camundongos Δ dblGATA foi verificado uma redução significativa na concentração de citocinas do perfil Th2, especialmente IL-33, IL-5 e IL-13, bem como das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β e também IL-17 em relação aos animais infectados não deficientes. As citocinas de perfil Th1 não tiveram alteração na esquistossomose aguda, mas os níveis de TNF- α e INF- γ foram significativamente maiores em camundongos Δ dblGATA cronicamente infectados. Os eosinófilos são fontes de IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18 e TGF- α/β , eotaxina-1 e de mediadores lipídicos que auxiliam na polarização da resposta Th2 (Kita & Gleich, 1996; MacKenzie *et al.*, 2001; Shi, 2004; Rothenberg & Hogan, 2006; Akuthota *et al.*, 2008), assim é justificável as alterações observadas na ausência destas células na composição do granuloma. Além de contribuir com a produção local de citocinas e de produzir quimiocinas responsáveis pelo recrutamento de outras células importantes durante a formação do granuloma, eosinófilos também influenciam na polarização da resposta Th2, como demonstrado por Sabin *et al.*, (1996).

Dados obtidos em camundongos geneticamente deficientes na produção de IL-4, ou em camundongos deficientes para IL-4 e IL-13, mostram que nestes animais a infecção por *S. mansoni* resultou em aumento de mortalidade e morbidade dos animais. A gravidade da esquistossomose nestes modelos foi atribuída a maior lesão hepática além do aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ , TNF- α e NO e ausência de citocinas anti-inflamatórias Th2 como IL-4 e IL-10, devido à redução de citocinas regulatórias responsáveis pela modulação da resposta imunológica (Brunet *et al.* 1997; Chiaramonte *et al.* 1999; Fallon *et al.* 2000; Rutitzky *et al.* 2001; Wynn *et al.* 2004; Wilson *et al.* 2007). A deficiência em polarizar e estabelecer uma resposta imunológica ideal causa a elevação de citocinas pró-inflamatórias e por conseguinte é possível encontrar níveis superiores de transaminases séricas (ALT e AST) nos animais deficientes para a maturação de eosinófilos. Este desbalanço na resposta imunológica local, com aumento de citocinas do perfil Th-1 e redução

das citocinas Th-2 e Treg também foi observada em camundongos Δ dblGATA infectados por *S. mansoni*. Em paralelo, foi verificado que camundongos Δ dblGATA infectados apresentaram aumento de área de necrose hepática e aumento dos níveis de ~~Portanto o método de quantificação da~~ transaminase sérica, indicando que a ausência de eosinófilo e as alterações no tipo e intensidade da resposta imunológica resultaram em uma maior lesão tecidual nos animais Δ dblGATA em comparação com WT, similar ao encontrado no trabalho de Seki *et.al.* (2012), utilizando animais *knockout* para produção de IL-4/IL-13. Em experimentos com animais deficientes para a produção de IL-4 e IL-4/IL-13, apresentaram dificuldades formar os granulomas e as lesões hepáticas geradas resultaram no óbito dos animais na 9ª semana (Cheever, 1997; Fallon, 2000; Schwartz, *et al.*, 2014). Nos animais Δ dblGATA a morbidade foi menos intensa pois a produção de IL-4 pode ter sido compensada pela via autócrina das células T e por basófilos (Jankovic *et al.*, 2000; Noben-Trauth *et al.*, 2002), mantendo níveis similares em ambos os grupos experimentais, corroborando com os dados de Swartz (2006).

Apesar do aumento de citocinas do perfil Th1, nossos dados mostram que camundongos deficientes na diferenciação de eosinófilos apresentam níveis reduzidos de IL-17 no fígado durante a infecção por *S. mansoni*. A pesquisa de Rutitzky *et al.* (2005) demonstrou que a resposta Th17 desempenha um papel importante na patologia granulomatosa e na gravidade da morbidade na infecção por *S. mansoni*, pois ao neutralizar a IL-17 (com anticorpos monoclonais anti-IL-17) é possível controlar o tamanho do granuloma, indicando que apesar dos antígenos parasitários induzir clones de linfócitos Th17, a proliferação destas células deve ser controlada causando a redução dos granulomas esquistossomóticos. Rutitzky and Stadecker (2011) utilizando animais deficientes em IL-17 e IFN- γ infectados por *S. mansoni*, foi constatado que a imunopatologia grave da esquistossomose é impulsionada principalmente por IL-17 e regulado pela produção IFN- γ . A redução de IL-17 durante a esquistossomose em camundongos Δ dblGATA também pode ter contribuído para a morbidade da esquistossomose não ser mais grave, podendo levar os animais ao óbito.

Durante a fase aguda da infecção por *S.mansoni*, os eosinófilos são células predominantes no infiltrado celular do granuloma que envolve os ovos do parasito (Scott *et al.*, 1989; Chiaramonte *et al.*, 1999; Fallon, 2000; Reiman *et al.*, 2006). Os dados apresentados e ilustrados mostram a quantificação de maneira indireta o infiltrado celular presente no granuloma esquistossomótico dos animais experimentais. Os níveis de Eosinófilo peroxidase (EPO), medida indireta de infiltração dos eosinófilos e mieloperoxidase (MPO),

medida indireta de infiltração dos neutrófilos, se mostraram significativamente inferiores nos animais Δ dblGATA, indicando a menor infiltração de polimorfonucleares. Os neutrófilos são células recrutadas principalmente por IL-17 produzido pelas células Th17. Quando atraídos e ativados os neutrófilos secretam moléculas antimicrobianas, espécies reativas de oxigênio, quimiocinas e citocinas inflamatórias que recrutam células dendríticas e macrófagos (Hayashi, 2003). Neutrófilos são vistos inicialmente durante a resposta imune inata e contribuem para inflamação através da produção de citocinas IL-17 e IL-23 podendo atuar como apresentadores de antígenos, além de promover a diferenciação de células Th1 para Th17 (Abdallah *et al.*, 2012; Mei *et al.*, 2012). A redução na infiltração de neutrófilos pode ter sido resultado da queda nos níveis de IL-17 nos camundongos Δ dblGATA. Por fim, como a influência dessa população celular na resposta ainda é incerta, ela irá se tornar alvo de nossos estudos futuros. Outra célula que deverá ser melhor investigada neste modelo experimental são os macrófagos. 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 das citocinas que influenciam os macrófagos, eles podem ser diferencialmente ativados em M1 (ou classicamente ativado) e M2 (alternativamente ativados) (Strauss-Ayali *et al.*, 2007). Nossos dados mostram que a atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG), enzima indicava da infiltração de monócitos no tecido, foi similar em ambos os grupos experimentais. Entretanto, apesar de não ter sido encontrada diferença significativa na infiltração de macrófago entre os grupos analisados, esse fato não esclarece se há diferença nos subtipos de macrófagos e na sua ativação.

Na avaliação patológica do dano tecidual na infecção por *S. mansoni*, foi constatada a redução de citocinas como TGF- β , IL-10 e IL-13, responsáveis por modular a resposta imune e orquestrar a fibrinogênese do granulo esquistossomótico. Além disso, também sabemos que IL-10 desempenha uma importante função no controle da fibrose hepática, pois em camundongos deficientes para produção de IL-10, IL-12/23 a fibrose foi muito intensa de tal maneira a aumentar a morbidade da doença (Mentink-Kane *et al.*, 2011).

A diferença na resposta imune local levou a modificações em aspectos associados à morbidade. A análise histopatológica e morfométrica do fígado dos camundongos BALB/c e Δ dblGATA infectados indicou que, na fase aguda da esquistossomose, não apresentaram diferença estatística em relação a área e volume do granuloma. Todavia, na fase crônica da infecção, após 12 semanas, os granulomas dos animais WT mostram uma redução de volume devido ao processo de imunomodulação que não foi verificada nos camundongos Δ dblGATA

cronicamente infectados. Também foi verificado que a concentração de hidroxiprolina no fígado e intestino delgado e grosso dos animais infectados foi estatisticamente superior nos camundongos WT em relação àqueles camundongos deficientes para a maturação de eosinófilos. Os dados são contraditórios ao que já foi apresentado na literatura, pois demonstram que há diferença estatística entre o volume e área dos granulomas dos animais diferente do relatado por Reiman *et al.*, 2006; Swartz *et al.*, 2006. Contudo, dados recentes apresentados por Vannella *et al.* (2016) utilizando animais deficientes para TSLP/IL-25/IL-33 demonstram que a infecção por *S. mansoni* nestes animais resulta em redução na ativação dos eosinófilos e menor fibrose tecidual. Segundo Pearce & MacDonald (2002), IL-13 é um importante fator para a fibrose além de regular a resposta de perfil Th2. Assim, a redução da concentração hepática de IL-33, IL-5 e IL-13, pode ter alterado a infiltração celular e a produção de matriz extracelular que auxiliam na contenção do dano tecidual junto ao IL-33, elevando também o dano tecidual causado pela ausência dessas citocinas. Outros trabalhos também demonstraram que, no sítio inflamatório, os eosinófilos ativados são fontes importantes de citocinas fibrogênicas, como TGF- β e IL-13 potentes mediadores pró-fibróticos, que estimulam a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (Noguchi *et al.*, 1992; Levi-Schaffer *et al.*, 1999; Silveira-Lemos *et al.*, 2008; Wynn & Barron, 2010).

Estudos realizados por Paiva (2010), Yoshida (2012) e Bowen (2013), mostram que TGF- β é fundamental para promover a fibrose através da ativação de HSC. No modelo de infecção pelo nematódeo *Nippostrongylus brasiliensis*, foi demonstrado 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 (Fang *et al.*, 2013). No estudo de Vannella (2016) em animais triplo knockout para IL-33, IL-25 e TSLP infectados por *S. mansoni* tiveram menor estimulação da produção de IL-13 e IL-5, gerando uma resposta Th2 menos pronunciada e menor fibrose hepática. A participação da produção de IL-33 na fibrose também foi evidenciada através da utilização de camundongos transgênicos para produção de IL-33 em modelo de fibrose cutânea induzida por albumina bovina (Rankin (2010).

Nossos dados se mostram divergentes em relação àqueles apresentados por Mentink-Kane *et al.* (2011), que verificaram que em camundongos ‘*triplo knockout*’ para IL-10/IL-13R α 2/IL-12-23(p40) não tiveram diferença estatística na concentração tecidual de hidroxiprolina, como estimativa da deposição de colágeno, na fase aguda por infecção de *S. mansoni* em relação aos resultados apresentados indicando maior concentração de

hidroxiprolina tecidual nos animais WT. A análise morfológica dos granulomas também revelou que a deposição de colágeno no granuloma de camundongos Δ dblGATA ocorreu de maneira desorganizada, não sendo verificada a presença de fibras colágenas arranjadas em disposição concêntrica. Estas alterações podem estar associadas a composição celular do granuloma, pois os eosinófilos podem ter um papel importante na reparação, remodelação e no desenvolvimento de fibrose tecidual já que as proteínas e citocinas secretadas durante a desgranulação de eosinófilos teciduais são importantes para o processo de fibrose (Noguchi *et al.*, 1992; Levi-Schaffer *et al.*, 1999). Em contrapartida, Mata-Santos *et al.* (2014), relataram que em animais infectados por *S.mansoni* e tratados com silimarina, um importante hepatoprotetor, anti-fibrótico e imunomodulador (Valenzuela & Garrido, 1993), tiveram redução na proliferação de células de fibroblastos e na produção de IL-13, que também afetaram a produção de colágeno do tipo I, corroborando com os dados apresentados neste trabalho.

Os dados experimentais e clínicos obtidos em áreas de transmissão da infecção por *S. mansoni* demonstram que a reação celular 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). A ausência de eosinófilos pode alterar o balanço de citocinas Th1/Th2 (Rothenberg & Hogan, 2006) conseqüentemente, a formação do granuloma induzido pela infecção por *S. mansoni*, levando as alterações na eliminação dos ovos do parasito através do intestino e na morbidade. Contudo, o trabalho em questão não apresenta diferença estatística na taxa de mortalidade dos animais ao utilizar a carga parasitária em questão.

Portanto, a ausência dos eosinófilos nos camundongos Δ dblGATA foi prejudicial para o hospedeiro vertebrado, mesmo não havendo alteração na carga parasitária. A redução das citocinas Th2 e regulatórias afetou diretamente a produção daquelas pró-inflamatórias, de forma a gerar um dano tecidual mais intenso os para animais, mas não o suficiente para levá-los a óbito. A alteração no perfil de citocinas gerou uma alteração no infiltrado celular, no qual houve menor presença de granulócitos nos animais Δ dblGATA. Os granulomas hepáticos foram afetados diretamente e durante a fase crônica da infecção uma vez que as fibras colágenas apresentaram-se mais desorganizadas e seu tamanho estatisticamente superior afeta a saúde do tecido. Concluindo, os dados apresentados nesse trabalho levam a afirmar que o eosinófilo têm um papel fundamental na evolução da doença bem como na morbidade da esquistossomose mansoni afetando a resposta imune, composição celular do granuloma e remodelação tecidual, apesar do mecanismo não ser totalmente elucidado e ainda haver muita divergência acerca do assunto na literatura.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os camundongos Δ dblGATA e BALB/c experimentalmente infectados por *S. mansoni* não apresentam diferença significativa no número de vermes recuperados da circulação e de ovos retidos no fígado ou eliminados nas fezes. Todavia, no intestino dos animais Δ dblGATA cronicamente infectados houve uma maior retenção de ovos, sugerindo dificuldade de eliminação destes ovos na ausência de eosinófilos;
- A análise imunológica permite demonstrar que a ausência de eosinófilos nos animais Δ dblGATA resultou em redução da produção de citocinas Th2 e regulatória, mas aumento da concentração de IFN- γ e TNF- α , no fígado de camundongos infectados por *S. mansoni*;
- A deposição de ovos de *S. mansoni* no fígado de camundongos Δ dblGATA experimentalmente infectados não induz aumento da atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO) no tecido, confirmando a ausência de eosinófilos nestes animais. Além disso, em camundongos Δ dblGATA infectados não houve atividade reduzida de mieloperoxidase (MPO), mas não de N-acetilglicosaminidase (NAG), indicando redução seletiva de granulócitos para o sítio inflamatório. As análises histopatológicas revelam ainda que na ausência de eosinófilos foi detectado maior infiltração de células mononucleares durante a fase crônica da esquistossomose;
- A infecção por *S. mansoni* em avaliação histopatológica indicou que os animais Δ dblGATA apresentam níveis de transaminase sérica, AST e ALT, significativamente superiores retratando uma lesão tecidual mais intensa em relação aos camundongos BALB/c. A quantificação de hidroxiprolina no tecido hepático, intestino delgado e grosso, foi inferior nos animais deficientes para a maturação de eosinófilos em relação aos animais WT que se apresentam fibras colágenas mais organizadas e compactas ao redor dos ovos do parasito.
- A taxa de mortalidade analisada ao longo das 12 semanas de infecção não evidenciou diferença significativa na sobrevivência dos grupos experimentais avaliados.

8. CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que eosinófilos não são fundamentais no controle da infecção por *Schistosoma mansoni*. Todavia, a ausência destas células acarreta em alterações na evolução da doença bem como na lesão induzida e deposição de ovos do parasito pelo parasito no tecido do hospedeiro.

9. REFERÊNCIAS

- Abath, F. G., Morais, C. N., Montenegro, C. E. L., Wynn, T. A. & Montenegro, S. M. (2006) Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in parasitology*, **22**, 85-91.
- Abdallah, D. S. A., Lin, C., Ball, C. J., King, M. R., Duhamel, G. E. & Denkers, E. Y. (2012) *Toxoplasma gondii* triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps. *Infection and immunity*, **80**, 768-777.
- Akuthota, P., Wang, H., Spencer, L. & Weller, P. (2008) Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. *Clinical & Experimental Allergy*, **38**, 1254-1263.
- Amorim, J. d. (1953) Infestação experimental e natural de murídeos pelo *Schistosoma mansoni* (Nota prévia). *Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop*, **5**, 219-222.
- Andrade, Z. A. (2004) Schistosomal hepatopathy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**, 51-57.
- Andrade, Z. A. (2008) Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. *Acta Tropica*, **108**, 79-82.
- Andrade, Z. A. & Prata, A. (1963) Asymptomatic Schistosomiasis studied by Needle Biopsy of the Liver. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **12**, 854-858.
- Andrade, Z. A., Reis, M. G., Reis, M., Reis, M. G., REIS, M., dos Reis, M. G., *et al.* (1984) Estudo sobre o papel dos eosinófilos na destruição dos esquistossômulos do *Schistosoma mansoni* in vivo. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **79**, 371-373.
- Andrade, Z. A. & Warren, K. S. (1964) Mild prolonged schistosomiasis in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **58**, 53-57.
- Andrade, Z. d. A. (2005) Regressão da fibrose hepática.
- Andrade, Z. d. A. (2009) Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite immunology*, **31**, 656-663.
- Anthony, R. M., Rutitzky, L. I., Urban, J. F., Stadecker, M. J. & Gause, W. C. (2007) Protective immune mechanisms in helminth infection. *Nature Reviews Immunology*, **7**, 975-987.
- Araújo, M. I., de Jesus, A. R., Bacellar, O., Sabin, E., Pearce, E. & Carvalho, E. M. (1996) Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *European journal of immunology*, **26**, 1399-1403.
- Babayan, S. A., Read, A. F., Lawrence, R. A., Bain, O. & Allen, J. E. (2010) Filarial parasites develop faster and reproduce earlier in response to host immune effectors that determine filarial life expectancy. *PLoS Biol*, **8**, e1000525.

- Bandeira-Melo, C., Sugiyama, K., Woods, L. J. & Weller, P. F. (2001) Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. *The Journal of Immunology*, **166**, 4813-4817.
- Barcelos, L., Talvani, A., Teixeira, A., Vieira, L., Cassali, G., Andrade, S., *et al.* (2005) Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of leukocyte biology*, **78**, 352-358.
- Bartley, P. B., Ramm, G. A., Jones, M. K., Ruddell, R. G., Li, Y. & McManus, D. P. (2006) A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. *International journal for parasitology*, **36**, 993-1001.
- Beninati, W., Derdak, S., Dixon, P. F., Grider, D. J., Strollo, D. C., Hensley, R. E., *et al.* (1993) Pulmonary eosinophils express HLA-DR in chronic eosinophilic pneumonia. *Journal of allergy and clinical immunology*, **92**, 442-449.
- Bica, I., Hamer, D. H. & Stadecker, M. J. (2000) Hepatic schistosomiasis. *Infectious disease clinics of North America*, **14**, 583-604.
- Bina, J. C. & Prata, A. (2003) Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I- Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. *Rev Soc Bras Med Trop*, **36**, 211-216.
- Bochner, B. S. & Schleimer, R. P. (1994) The role of adhesion molecules in human eosinophil and basophil recruitment. *Journal of allergy and clinical immunology*, **94**, 427-438.
- Bogéa, T., Favre, T. C., Rotenberg, L., Silva, H. S. & Pieri, O. S. (1996) Circadian pattern of cercarial emergence in *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes: Digenea) from isolated *Biomphalaria glabrata*. *Chronobiology international*, **13**, 93-101.
- Bogliolo, L. (1958) [Schistosomiasis mansoni. Pathology.]. *Revista brasileira de malariologia e doencas tropicais. Publicacoes avulsas*, **11**, 359-424.
- Boros, D., Pelley, R. & Warren, K. (1975) Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. *The Journal of Immunology*, **114**, 1437-1441.
- Boros, D. L. & Warren, K. S. (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*, **132**, 488-507.
- Bowen, T., Jenkins, R. H. & Fraser, D. J. (2013) MicroRNAs, transforming growth factor beta-1, and tissue fibrosis. *The Journal of pathology*, **229**, 274-285.
- Brunet, L. R., Finkelman, F. D., Cheever, A. W., Kopf, M. A. & Pearce, E. J. (1997) IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *The Journal of Immunology*, **159**, 777-785.
- Burke, M., Jones, M., Gobert, G., Li, Y., Ellis, M. & McManus, D. (2009) Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite immunology*, **31**, 163-176.
- Butterworth, A. (1994) Human immunity to schistosomes: some questions. *Parasitology Today*, **10**, 378-380.

- Butterworth, A., Capron, M., Cordingley, J., Dalton, P., Dunne, D., Kariuki, H., *et al.* (1985) Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**, 393-408.
- Butterworth, A. E., Wassom, D. L., Gleich, G. J., Loegering, D. A. & David, J. R. (1979) Damage to schistosomula of *Schistosoma mansoni* induced directly by eosinophil major basic protein. *The Journal of Immunology*, **122**, 221-229.
- Cadman, E. T., Thyse, K. A., Bearder, S., Cheung, A. Y., Johnston, A. C., Lee, J. J., *et al.* (2014) Eosinophils are important for protection, immunoregulation and pathology during infection with nematode microfilariae. *PLoS Pathog*, **10**, e1003988.
- Caldas, I. R., Campi-Azevedo, A. C., Oliveira, L. F. A., Silveira, A. M. S., Oliveira, R. C. & Gazzinelli, G. (2008) Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta tropica*, **108**, 109-117.
- Capron, A. & Dessaint, J. (1985) Effector and regulatory mechanisms in immunity to schistosomes: a heuristic view. *Annual review of immunology*, **3**, 455-476.
- Carvalho, E., Andrade, Z. & Coura, J. (2005) Imunopatologia da esquistossomose. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro*, 947-957.
- Cascão, R., Moura, R. A., Perpétuo, I., Canhão, H., Vieira-Sousa, E., Mourão, A. F., *et al.* (2010) Identification of a cytokine network sustaining neutrophil and Th17 activation in untreated early rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, **12**, 1.
- Cheever, A. W. (1987) Comparison of pathologic changes in mammalian hosts infected with *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* and *S. haematobium*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **82**, 39-45.
- Cheever, A. W., Duvall, R. H., Hallack Jr, T. A., Minker, R. G., Malley, J. D. & Malley, K. G. (1987) Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, **37**, 85-97.
- Cheever, A. W., Hoffmann, K. F. & Wynn, T. A. (2000) Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunology Today*, **21**, 465-466.
- Chen, L., Grabowski, K. A., Xin, J.-p., Coleman, J., Huang, Z., Espiritu, B., *et al.* (2004) IL-4 induces differentiation and expansion of Th2 cytokine-producing eosinophils. *The Journal of Immunology*, **172**, 2059-2066.
- Chiaromonte, M., Donaldson, D., Cheever, A. & Wynn, T. (1999) An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *The Journal of clinical investigation*, **104**, 777-785.
- Chiaromonte, M. G., Schopf, L. R., Neben, T. Y., Cheever, A. W., Donaldson, D. D. & Wynn, T. A. (1999) IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *The Journal of Immunology*, **162**, 920-930.

- Chiavaroli, R. & Grima, P. (2008) Detection of early liver fibrosis in patients with intestinal schistosomiasis: sonographic and histologic findings in *Schistosoma mansoni* infection. *Infection*, **36**, 585-589.
- Chuah, C., Jones, M. K., Burke, M. L., McManus, D. P. & Gobert, G. N. (2014) Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. *Trends in parasitology*, **30**, 141-150.
- Coelho, P. & Barbosa, F. (1995) Relação molusco/parasita: resistência e susceptibilidade à infecção por *Schistosoma mansoni* em caramujos do gênero *Biomphalaria*. *Tópicos em Malacologia Médica*.
- Coelho, P. M. Z., A. D. Jurberg, et al. (2009). "Use of a saline gradient for the diagnosis of schistosomiasis." *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104(5): 720-723.
- Colley, D. G., Bustinduy, A. L., Secor, W. E. & King, C. H. (2014) Human schistosomiasis. *The Lancet*, **383**, 2253-2264.
- Coura, J. (1979) Morbidade da esquistossomose mansoni no Brasil. *Morbidade da esquistossomose mansoni no Brasil*.
- Coura, J. & Amaral, R. (2004) Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **99**, 13-19.
- Coura, J. R., Camillo-Coura, L., Kalache, A. & Argendo, C. A. (1970) Esquistossomose aguda autóctone de foco na cidade do Rio de Janeiro: Estudo de 22 casos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **4**, 387-397.
- Curwen, R. S. & Wilson, R. A. (2003) Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. *Trends in parasitology*, **19**, 63-66.
- D'Aandrea, P. S., MAROJA, L. S., Gentile, R., Cerqueira, R., Maldonado, A. & Rey, L. (2000) The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea–Trematoda) in a naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia–Sigmodontinae) in Brazil. *Parasitology*, **120**, 573-582.
- Dajotoy, T., Andersson, P., Bjartell, A., Löfdahl, C.-G., Tapper, H. & Egesten, A. (2004) Human eosinophils produce the T cell-attracting chemokines MIG and IP-10 upon stimulation with IFN- γ . *Journal of leukocyte biology*, **76**, 685-691.
- De Wall Malefyt, R., Yssel, H. & De Vries, J. (1993) Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. *J. Immunol*, **150**, 4754.
- De'Broski, R. H., Lee, J. J., Lee, N. A., Nolan, T. J., Schad, G. A. & Abraham, D. (2000) Role of IL-5 in innate and adaptive immunity to larval *Strongyloides stercoralis* in mice. *The Journal of Immunology*, **165**, 4544-4551.
- Dessein, A. J., Marquet, S., Henri, S., El Wali, N. E. M., Hillaire, D., Rodrigues, V., et al. (1999) Infection and disease in human schistosomiasis mansoni are under distinct major gene control. *Microbes and Infection*, **1**, 561-567.

- Doenhoff, M., Hassounah, O., Murare, H., Bain, J. & Lucas, S. (1986) The schistosome egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection or parasite survival? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **80**, 503-514.
- Dorsey, C. H. & Stirewalt, M. (1971) *Schistosoma mansoni*: fine structure of cercarial acetabular glands. *Experimental parasitology*, **30**, 199-214.
- Drummond, S. C., Silva, L. C. d. S., Amaral, R. S. d., Sousa-Pereira, S. R., Antunes, C. M. & Lambertucci, J. R. (2006) Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **101**, 37-44.
- Dunne, D. W. & Cooke, A. (2005) A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, **5**, 420-426.
- Dunne, D. W. & Pearce, E. J. (1999) Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes and infection*, **1**, 553-560.
- El-Malky, M., Maruyama, H., Hirabayashi, Y., Shimada, S., Yoshida, A., Amano, T., *et al.* (2003) Intraepithelial infiltration of eosinophils and their contribution to the elimination of adult intestinal nematode, *Strongyloides venezuelensis* in mice. *Parasitology international*, **52**, 71-79.
- Fallon, P. G. (2000) Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. *Immunology today*, **21**, 29-35.
- Fang, S.-l., Fan, T.-c., Fu, H.-W., Chen, C.-J., Hwang, C.-S., Hung, T.-J., *et al.* (2013) A novel cell-penetrating peptide derived from human eosinophil cationic protein. *PloS one*, **8**, e57318.
- Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Mosmann, T., Howard, M. & O'garra, A. (1991) IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *The Journal of Immunology*, **147**, 3815-3822.
- Gazzinelli, G., Lambertucci, J. R., Katz, N., Rocha, R. S., Lima, M. & Colley, D. (1985) Immune responses during human Schistosomiasis mansoni. XI. Immunologic status of patients with acute infections and after treatment. *The Journal of Immunology*, **135**, 2121-2127.
- Gentil, K., Hoerauf, A. & Layland, L. (2013) Eosinophil-mediated responses toward helminths. *Eosinophils in health and disease*. Elsevier, New York, NY, 303-312.
- Gentile, R., D'Andrea, P. S., Cerqueira, R. & Santoro Maroja, L. (2000) Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **35**, 1-9.
- Gordon, R. & Griffiths, R. (1951) Observations on the means by which the cercariae of *Schistosoma mansoni* penetrate mammalian skin, together with an account of certain morphological changes observed in the newly penetrated larvae. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **45**, 227-243.
- Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nature reviews immunology*, **3**, 23-35.

- Grenfell, R. F. Q., Martins, W., Enk, M., Almeida, Á., Siqueira, L., Silva-Moraes, V., *et al.* (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**, 328-334.
- Grewe, M., Bruijnzeel-Koomen, C. A., Schöpf, E., Thepen, T., Langeveld-Wildschut, A. G., Ruzicka, T., *et al.* (1998) A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. *Immunology today*, **19**, 359-361.
- Gryseels, B. (2012) Schistosomiasis. *Infectious Disease Clinics of North America*, **26**, 383-397.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J. & Kestens, L. (2006) Human schistosomiasis. *The Lancet*, **368**, 1106-1118.
- Handzel, Z. T., Busse, W. W., Sedgwick, J. B., Vrtis, R., Lee, W. M., Kelly, E., *et al.* (1998) Eosinophils bind rhinovirus and activate virus-specific T cells. *The Journal of Immunology*, **160**, 1279-1284.
- Hansel, T. T., De Vries, I. J. M., Iff, T., Rihs, S., Wandzilak, M., Betz, S., *et al.* (1991) An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *Journal of immunological methods*, **145**, 105-110.
- Hayashi, M. (2003) Clinical features of cerebral schistosomiasis, especially in cerebral and hepatosplenomegaly type. *Parasitology international*, **52**, 375-383.
- Herndon, F. J. & Kayes, S. (1992) Depletion of eosinophils by anti-IL-5 monoclonal antibody treatment of mice infected with *Trichinella spiralis* does not alter parasite burden or immunologic resistance to reinfection. *The Journal of Immunology*, **149**, 3642-3647.
- Hesse, M., Piccirillo, C. A., Belkaid, Y., Prufer, J., Mentink-Kane, M., Leusink, M., *et al.* (2004) The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, **172**, 3157-3166.
- Hiatt, R. A., Sotomayor, Z. R., Sanchez, G., Zambrana, M. & Knight, W. B. (1979) Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *Journal of Infectious Diseases*, **139**, 659-666.
- Hoffmann, K. F., Caspar, P., Cheever, A. W. & Wynn, T. A. (1998) IFN- γ , IL-12, and TNF- α are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. *The Journal of Immunology*, **161**, 4201-4210.
- Hoffmann, K. F., Cheever, A. W. & Wynn, T. A. (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. *The Journal of Immunology*, **164**, 6406-6416.
- Hokibara, S., Takamoto, M., Tominaga, A., Takatsu, K. & Sugane, K. (1997) Marked eosinophilia in interleukin-5 transgenic mice fails to prevent *Trichinella spiralis* infection. *The Journal of parasitology*, 1186-1189.

- Hsu, S. L., Hsu, H., Davis, J. & Lust, G. (1972) Comparative studies on the lesions caused by eggs of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in livers of albino mice and rhesus monkeys. *Annals of tropical medicine and parasitology*, **66**, 89-97.
- Hsü, S. L., Hsü, H., Mitros, F., Helms, C. & Solomon, R. (1980) Eosinophils as effector cells in the destruction of *Schistosoma mansoni* eggs in granulomas. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **74**, 179-183.
- Jankovic, D., Cheever, A. W., Kullberg, M. C., Wynn, T. A., Yap, G., Caspar, P., *et al.* (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**, 619-629.
- Jankovic, D., Kullberg, M. C., Noben-Trauth, N., Caspar, P., Paul, W. E. & Sher, A. (2000) Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4⁺ lymphocytes with a Th2 cytokine profile. *The Journal of Immunology*, **164**, 3047-3055.
- Jankovic, D., Kullberg, M. C., Noben-Trauth, N., Caspar, P., Ward, J. M., Cheever, A. W., *et al.* (1999) Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. *The Journal of Immunology*, **163**, 337-342.
- Junqueira, L. C. U., Bignolas, G. & Brentani, R. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *The Histochemical journal*, **11**, 447-455.
- Katz, N. & Almeida, K. (2003) Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciência e Cultura*, **55**, 38-43.
- Katz, N., Chaves, A. & Pellegrino, J. (1972) A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, **14**, 397-400.
- Kephart, G., Andrade, Z. & Gleich, G. J. (1988) Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of *Schistosoma mansoni* in human pathologic tissue. *The American journal of pathology*, **133**, 389.
- Kimura, K., Song, C. H., Rastogi, A., Dranoff, G., Galli, S. J. & Lantz, C. S. (2006) Interleukin-3 and c-Kit/stem cell factor are required for normal eosinophil responses in mice infected with *Strongyloides venezuelensis*. *Laboratory investigation*, **86**, 987-996.
- King, C. L., Malhotra, I., Mungai, P., Wamachi, A., Kioko, J., Ouma, J. H., *et al.* (1998) B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. *The Journal of Immunology*, **160**, 3578-3584.
- Kita, H. & Gleich, G. J. (1996) Chemokines active on eosinophils: potential roles in allergic inflammation. *The Journal of experimental medicine*, **183**, 2421-2426.
- Koeffler, H., Billing, R., Levine, A. & Golde, D. (1980) Ia antigen is a differentiation marker on human eosinophils. *Blood*, **56**, 11-14.

Kolaczowska, E. & Kubes, P. (2013) Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, **13**, 159-175.

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

Kopf, M., Brombacher, F., Hodgkin, P. D., Ramsay, A. J., Milbourne, E. A., Dai, W. J., *et al.* (1996) IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5+ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. *Immunity*, **4**, 15-24.

Kurowska-Stolarska, M., Stolarski, B., Kewin, P., Murphy, G., Corrigan, C. J., Ying, S., *et al.* (2009) IL-33 amplifies the polarization of alternatively activated macrophages that contribute to airway inflammation. *The Journal of Immunology*, **183**, 6469-6477.

Lacerda, C. M., Freire, W., Melo, P. S. V. d., Lacerda, H. R. & 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. *The Keio journal of medicine*, **51**, 89-92.

Lacy, P. & Moqbel, R. (2000) Eosinophil cytokines. In *Human Eosinophils*, pp. 134-155. Karger Publishers.

Lambertucci, J., Jordan, P., Webbe, G. & Sturrock, R. (1993) *Schistosoma mansoni*: pathological and clinical aspects. *Human schistosomiasis.*, 195-235.

Lambertucci, J., Silva, L., Voietta, I. & Coura, J. (2005) Esquistossomose mansônica. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan*, 931-946.

Lee, J. J., Dimina, D., Macias, M. P., Ochkur, S. I., McGarry, M. P., O'Neill, K. R., *et al.* (2004) Defining a link with asthma in mice congenitally deficient in eosinophils. *Science*, **305**, 1773-1776.

Lenzi, H., Romanha, W. d. S., Machado, M., Mota, E. & Lenzi, J. (2008) Patologia Experimental com enfoque no granuloma esquistosomótico. *Coelho PMZ (Org), Lenzi HL (Org). Schistosoma mansoni & Esquistossomose: Uma visão multidisciplinar, Rio de Janeiro, Fiocruz*, 561-654.

Lenzi, H. L., Jurberg, A. D., Coelho, P. M. Z. & Lenzi, J. A. (2008) Migração e desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. *Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Fiocruz, Rio de Janeiro*, 85-145.

Lenzi, H. L., Kimmel, E., Schechtman, H., Pelajo-Machado, M., Romanha, W. S., Pacheco, R. G., *et al.* (1998) Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **93**, 141-151.

Lenzi, H. L., Lenzi, J. A., Kerr, I., Antunes, S. L. G., Mota, E. M. & Oliveira, D. N. (1991) Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **86**, 77-90.

- Levi-Schaffer, F., Garbuzenko, E., Rubin, A., Reich, R., Pickholz, D., Gillery, P., *et al.* (1999) Human eosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor β (TGF- β). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **96**, 9660-9665.
- Lucey, D. R., Nicholson-Weller, A. & Weller, P. F. (1989) Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**, 1348-1351.
- Lundy, S. K. & Lukacs, N. W. (2013) Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. *Frontiers in immunology*, **4**, 39.
- MacKenzie, J. R., Mattes, J., Dent, L. A. & Foster, P. S. (2001) Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4⁺ Th2 lymphocyte function. *The Journal of Immunology*, **167**, 3146-3155.
- Maizels, R. M. & Yazdanbakhsh, M. (2003) Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews Immunology*, **3**, 733-744.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. & Locati, M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, **25**, 677-686.
- Mata-Santos, H. A., Dutra, F. F., Rocha, C. C., Lino, F. G., Xavier, F. R., Chinalia, L. A., *et al.* (2014) Silymarin reduces profibrogenic cytokines and reverses hepatic fibrosis in chronic murine schistosomiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **58**, 2076-2083.
- Mei, J., Liu, Y., Dai, N., Hoffmann, C., Hudock, K. M., Zhang, P., *et al.* (2012) Cxcr2 and Cxcl5 regulate the IL-17/G-CSF axis and neutrophil homeostasis in mice. *The Journal of clinical investigation*, **122**, 974-986.
- Meleney, H. E., Sandground, J. H., Moore, D. V., Most, H. & Carney, B. H. (1953) The histopathology of experimental schistosomiasis. II. Bisexual infections with *S. mansoni*, *S. japonicum*, and *S. haematobium*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **2**, 883-913.
- Mentink-Kane, M. M., Cheever, A. W., Wilson, M. S., Madala, S. K., Beers, L. M., Ramalingam, T. R., *et al.* (2011) Accelerated and progressive and lethal liver fibrosis in mice that lack interleukin (IL)-10, IL-12p40, and IL-13R α 2. *Gastroenterology*, **141**, 2200-2209.
- Milan, E. & Keim, L. (2007) Esquistossomíase mansônica. In *Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias* (ed. by Tavares W & Marinho LAC), pp. 345-350. Atheneu, São Paulo.
- Ministério da Saúde, S. d. V. e. S., Departamento de Vigilância Epidemiológica. (2011) Esquistossomose 2010. In, portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=35752.
- Modena, C. M., dos Santos Lima, W. & Coelho, P. M. Z. (2008) Wild and domesticated animals as reservoirs of Schistosomiasis mansoni in Brazil. *Acta tropica*, **108**, 242-244.

- Montenegro, S. M., Miranda, P., Mahanty, S., Abath, F. G., Teixeira, K. M., Coutinho, E. M., *et al.* (1999) Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *Journal of Infectious Diseases*, **179**, 1502-1514.
- Montes, G. S. (1996) Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell biology international*, **20**, 15-27.
- Mosmann, T. (1992) T lymphocyte subsets, cytokines, and effector functions. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **664**, 89-92.
- Munitz, A. & Levi-Schaffer, F. (2004) Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. *Allergy*, **59**, 268-275.
- Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*, **6**, 173-182.
- Noben-Trauth, N., Hu-Li, J. & Paul, W. E. (2002) IL-4 secreted from individual naive CD4+ T cells acts in an autocrine manner to induce Th2 differentiation. *European journal of immunology*, **32**, 1428-1433.
- Noguchi, H., Kephart, G. M., Colby, T. V. & Gleich, G. J. (1992) Tissue eosinophilia and eosinophil degranulation in syndromes associated with fibrosis. *The American journal of pathology*, **140**, 521.
- Novato-Silva, E., Gazzinelli, G. & Colley, D. (1992) Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XVIII. Immunologic status of pregnant women and their neonates. *Scandinavian journal of immunology*, **35**, 429-437.
- Noya, O., Katz, N., Pointier, J. P., Theron, A. & de Noya, B. A. (2015) Schistosomiasis in America. In *Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean*, pp. 11-43. Springer.
- Padigel, U. M., Hess, J. A., Lee, J. J., Lok, J. B., Nolan, T. J., Schad, G. A., *et al.* (2007) Eosinophils act as antigen-presenting cells to induce immunity to *Strongyloides stercoralis* in mice. *Journal of Infectious Diseases*, **196**, 1844-1851.
- Paiva, L. A., Maya-Monteiro, C. M., Bandeira-Melo, C., Silva, P. M., El-Cheikh, M. C., Teodoro, A. J., *et al.* (2010) Interplay of cysteinyl leukotrienes and TGF- β in the activation of hepatic stellate cells from *Schistosoma mansoni* granulomas. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, **1801**, 1341-1348.
- Palm, N. W., Rosenstein, R. K. & Medzhitov, R. (2012) Allergic host defences. *Nature*, **484**, 465-472.
- Paraense, W. L. (2001) The schistosome vectors in the Americas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **96**, 7-16.
- Pearce, E. & MacDonald, A. (2002) The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology*, **2**, 499-511.

- Pearce, E. J., M Kane, C., Sun, J., J Taylor, J., McKee, A. S. & Cervi, L. (2004) Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological reviews*, **201**, 117-126.
- Pearce, E. J. & MacDonald, A. S. (2002) The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol*, **2**, 499-511.
- Pearce, E. J. & Sher, A. (1991) Functional dichotomy in the CD4+ T cell response to *Schistosoma mansoni*. *Experimental parasitology*, **73**, 110-116.
- Pearlman, E., Kroeze, W. K., Hazlett, F., Chen, S., Mawhorter, S., Boom, W. H., *et al.* (1993) *Brugia malayi*: acquired resistance to microfilariae in BALB/c mice correlates with local Th2 responses. *Experimental parasitology*, **76**, 200-208.
- Pease, J. E. & Williams, T. J. (2006) Chemokines and their receptors in allergic disease. *Journal of allergy and clinical immunology*, **118**, 305-318.
- Pedras-Vasconcelos, J. A. & Pearce, E. J. (1996) Type 1 CD8+ T cell responses during infection with the helminth *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Immunology*, **157**, 3046-3053.
- Pellegrino, J. & Katz, N. (1968) Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *Advances in parasitology*, **6**, 233-290.
- Pereira, F. E. L., Bogliolo, L. & Brasileiro-Filho, G. (2000) Inflamações. *Patologia. 2nd., cap7, p112.*
- Perrin, P. & Phillips, S. (1988) The molecular basis of granuloma formation in schistosomiasis. I. AT cell-derived suppressor effector factor. *The Journal of Immunology*, **141**, 1714-1719.
- Pesce, J., Kaviratne, M., Ramalingam, T. R., Thompson, R. W., Urban, J. F., Cheever, A. W., *et al.* (2006) The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *The Journal of clinical investigation*, **116**, 2044-2055.
- Prata, A. & Bina, J. (1968) Development of the hepatosplenic form of schistosomiasis.(A study of 20 patients observed during a 5 year period.). *Gazeta Médica da Bahia*, **68**, 49-60.
- Radonjic-Hösli, S. & Simon, H.-U. (2014) Eosinophils. In *History of Allergy*, pp. 193-204. Karger Publishers.
- Rankin, A. L., Mumm, J. B., Murphy, E., Turner, S., Yu, N., McClanahan, T. K., *et al.* (2010) IL-33 induces IL-13–dependent cutaneous fibrosis. *The journal of immunology*, **184**, 1526-1535.
- Raso, P., Pedroso, E. R. P. & Neves, J. (1986) Patologia da forma aguda, toxêmica, da esquistossomose mansoni. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, **19**, 45-55.
- Reddy, G. K. & Enwemeka, C. S. (1996) A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clinical biochemistry*, **29**, 225-229.

- Reiman, R. M., Thompson, R. W., Feng, C. G., Hari, D., Knight, R., Cheever, A. W., *et al.* (2006) Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infection and immunity*, **74**, 1471-1479.
- Ross, A. G. P., Bartley, P. B., Sleight, A. C., Olds, G. R., Li, Y., Williams, G. M., *et al.* (2002) Schistosomiasis. *New England Journal of Medicine*, **346**, 1212-1220.
- Rothenberg, M. E. (2009) Biology and treatment of eosinophilic esophagitis. *Gastroenterology*, **137**, 1238-1249.
- Rothenberg, M. E. & Hogan, S. P. (2006) The eosinophil. *Immunology*, **24**, 147.
- Rotman, H. L., Yutanawiboonchai, W., Brigandi, R. A., Leon, O., Gleich, G. J., Nolan, T. J., *et al.* (1996) Strongyloides stercoralis: eosinophil-dependent immune-mediated killing of third stage larvae in BALB/cByJ mice. *Experimental parasitology*, **82**, 267-278.
- Rutitzky, L. I., Mirkin, G. A. & Stadecker, M. J. (2003) Apoptosis by neglect of CD4+ Th cells in granulomas: a novel effector mechanism involved in the control of egg-induced immunopathology in murine schistosomiasis. *The Journal of Immunology*, **171**, 1859-1867.
- Rutitzky, L. I. & Stadecker, M. J. (2011) Exacerbated egg-induced immunopathology in murine Schistosoma mansoni infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN- γ . *European journal of immunology*, **41**, 2677-2687.
- Sabin, E. A. & Pearce, E. J. (1995) Early IL-4 production by non-CD4+ cells at the site of antigen deposition predicts the development of a T helper 2 cell response to Schistosoma mansoni eggs. *The Journal of Immunology*, **155**, 4844-4853.
- Santulli-Marotto, S., Boakye, K., Lacy, E., Wu, S.-J., Luongo, J., Kavalkovich, K., *et al.* (2013) Engagement of two distinct binding domains on CCL17 is required for signaling through CCR4 and establishment of localized inflammatory conditions in the lung. *PloS one*, **8**, e81465.
- Sasaki, O., Sugaya, H., Ishida, K. & Yoshimura, K. (1993) Ablation of eosinophils with anti-IL-5 antibody enhances the survival of intracranial worms of Angiostrongylus cantonensis in the mouse. *Parasite immunology*, **15**, 349-354.
- Schwartz, C., Oeser, K., da Costa, C. P., Layland, L. E. & Voehringer, D. (2014) T Cell-Derived IL-4/IL-13 Protects Mice against Fatal Schistosoma mansoni Infection Independently of Basophils. *The Journal of Immunology*, **193**, 3590-3599.
- Schwartz, M. & Baruch, K. (2014) The resolution of neuroinflammation in neurodegeneration: leukocyte recruitment via the choroid plexus. *The EMBO journal*, **33**, 7-22.
- Scott, P., Pearce, E., Cheever, A. W., Coffman, R. L. & Sher, A. (1989) Role of Cytokines and CD4+ T-Cell Subsets in the Regulation of Parasite Immunity and Disease. *Immunological reviews*, **112**, 161-182.
- Scrivo, R., Di Franco, M., Spadaro, A. & Valesini, G. (2007) The immunology of rheumatoid arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1108**, 312-322.

- Seki, T., Kumagai, T., Kwansa-Bentum, B., Furushima-Shimogawara, R., Anyan, W. K., Miyazawa, Y., *et al.* (2012) Interleukin-4 (IL-4) and IL-13 suppress excessive neutrophil infiltration and hepatocyte damage during acute murine schistosomiasis japonica. *Infection and immunity*, **80**, 159-168.
- Shamri, R., Xenakis, J. J. & Spencer, L. A. (2011) Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell and tissue research*, **343**, 57-83.
- Shi, H.-Z. (2004) Eosinophils function as antigen-presenting cells. *Journal of leukocyte biology*, **76**, 520-527.
- Shi, H.-Z., Humbles, A., Gerard, C., Jin, Z. & Weller, P. F. (2000) Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. *The Journal of clinical investigation*, **105**, 945-953.
- Silva, L. M., Oliveira, S. A., Ribeiro-dos-Santos, R., Andrade, Z. A. & Soares, M. B. (2004) Comparison of immune responses of *Schistosoma mansoni*-infected mice with distinct chronic forms of the disease. *Acta tropica*, **91**, 189-196.
- Silva, R. R., Silva, J. R. M., Faerstein, N. F., Lenzi, H. L. & Rey, L. (1992) Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni* parasitological aspects. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **87**, 271-276.
- Silveira-Lemos, D., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O. A., Oliveira, L. F. A., Costa-Silva, M. F., Matoso, L. F., *et al.* (2008) Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta tropica*, **108**, 150-159.
- Silveira, M. R., Nunes, K. P., Cara, D. C., Souza, D. G., Corrêa, A., Teixeira, M. M., *et al.* (2002) Infection with *Strongyloides venezuelensis* induces transient airway eosinophilic inflammation, an increase in immunoglobulin E, and hyperresponsiveness in rats. *Infection and immunity*, **70**, 6263-6272.
- Siqueira-Batista, R., Ramos Júnior, A., Farinazzo, R. & Fonseca, M. (1998) O *Schistosoma mansoni*. *Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB & Ramos Júnior AN. Esquistossomose Mansoni. São Paulo, Grupo Editorial Moreira Jr.*
- Siqueira, L. M. V., Gomes, L. I., Oliveira, E., Oliveira, E. R. d., Oliveira, Á. A. d., Enk, M. J., *et al.* (2015) Evaluation of parasitological and molecular techniques for the diagnosis and assessment of cure of schistosomiasis mansoni in a low transmission area. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **110**, 209-214.
- Souza, F., Vitorino, R. R., Costa, A., Faria-Junior, F., Santana, L. & Gomes, A. P. (2011) Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Rev Bras Clin Med São Paulo*, **9**, 300-307.
- Stadecker, M. J. & Hernandez, H. J. (1998) The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. *Parasite immunology*, **20**, 217-221.
- Strath, M., Warren, D. J. & Sanderson, C. J. (1985) Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *Journal of immunological methods*, **83**, 209-215.

- Strauss-Ayali, D., Conrad, S. M. & Mosser, D. M. (2007) Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *Journal of leukocyte biology*, **82**, 244-252.
- Sugaya, H., Aoki, M., Yoshida, T., Takatsu, K. & Yoshimura, K. (1997) Eosinophilia and intracranial worm recovery in interleukin-5 transgenic and interleukin-5 receptor α chain-knockout mice infected with *Angiostrongylus cantonensis*. *Parasitology research*, **83**, 583-590.
- Swartz, J. M., Dyer, K. D., Cheever, A. W., Ramalingam, T., Pesnicak, L., Domachowske, J. B., *et al.* (2006) *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*, **108**, 2420-2427.
- Tiggelman, A. M., Boers, W., Linthorst, C., Brand, H. S., Sala, M. & Chamuleau, R. A. (1995) Interleukin-6 production by human liver (myo) fibroblasts in culture. Evidence for a regulatory role of LPS, IL- 1β and TNF α . *Journal of hepatology*, **23**, 295-306.
- Todt, J., Whitfield, J., Ivard, S. & Boros, D. (2000) Down-Regulation of Interleukin-12, Interleukin-12R Expression/Activity Mediates the Switch from Th1 to Th2 Granuloma Response during Murine Schistosomiasis *Mansoni*. *Scandinavian journal of immunology*, **52**, 385-392.
- Turner, J. D., Narang, P., Coles, M. C. & Mountford, A. P. (2012) Blood flukes exploit Peyer's Patch lymphoid tissue to facilitate transmission from the mammalian host. *PLoS Pathog*, **8**, e1003063.
- Valadares, T., Coelho, P., Pellegrino, J. & Sampaio, I. (1981) *Schistosoma mansoni*: comparacao da oviposicao entre as cepas LE'(Belo Horizonte), SP (Sao Paulo) e ST (Liberia) em camundongos. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **23**, 1-5.
- Valenzuela, A. & Garrido, A. (1993) Biochemical bases of the pharmacological action of the flavonoid silymarin and of its structural isomer silibinin. *Biological research*, **27**, 105-112.
- Van Der Werf, M. J., de Vlas, S. J., Brooker, S., Looman, C. W., Nagelkerke, N. J., Habbema, J. D. F., *et al.* (2003) Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta tropica*, **86**, 125-139.
- Vannella, K. M., Barron, L., Borthwick, L. A., Kindrachuk, K. N., Narasimhan, P. B., Hart, K. M., *et al.* (2014) Incomplete Deletion of IL-4R α by LysM Cre Reveals Distinct Subsets of M2 Macrophages Controlling Inflammation and Fibrosis in Chronic Schistosomiasis. *PLoS Pathog*, **10**, e1004372.
- Vannella, K. M., Ramalingam, T. R., Borthwick, L. A., Barron, L., Hart, K. M., Thompson, R. W., *et al.* (2016) Combinatorial targeting of TSLP, IL-25, and IL-33 in type 2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *Science translational medicine*, **8**, 337ra365-337ra365.
- Vella, A. T. & Pearce, E. (1992) CD4⁺ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. *The Journal of Immunology*, **148**, 2283-2290.
- Voehringer, D., Shinkai, K. & Locksley, R. M. (2004) Type 2 immunity reflects orchestrated recruitment of cells committed to IL-4 production. *Immunity*, **20**, 267-277.

- Von Lichtenberg, F., Erickson, D. & Sadun, E. (1973) Comparative histopathology of schistosome granulomas in the hamster. *The American journal of pathology*, **72**, 149.
- Wang, Y.-H., Angkasekwinai, P., Lu, N., Voo, K. S., Arima, K., Hanabuchi, S., *et al.* (2007) IL-25 augments type 2 immune responses by enhancing the expansion and functions of TSLP-DC-activated Th2 memory cells. *The Journal of experimental medicine*, **204**, 1837-1847.
- Warren, K. S. (1982) The secret of the immunopathogenesis of schistosomiasis: in vivo models. *Immunological Reviews*, **61**, 189-213.
- Weerakoon, K. G., Gobert, G. N., Cai, P. & McManus, D. P. (2015) Advances in the diagnosis of human schistosomiasis. *Clinical microbiology reviews*, **28**, 939-967.
- Weinstock, J. & Boros, D. (1983a) Modulation of granulomatous hypersensitivity. VI. T lymphocyte subsets influence mast cell density in liver granulomas of *Schistosoma mansoni*-infected mice. *The Journal of Immunology*, **131**, 959-961.
- Weinstock, J. & Boros, D. (1983b) Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with *Schistosomiasis mansoni*. *The Journal of Immunology*, **130**, 418-422.
- Whitfield, P., Bartlett, A., Khammo, N. & Clothier, R. (2003) Age-dependent survival and infectivity of *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology*, **127**, 29-35.
- WHO. (1993) *The control of schistosomiasis: Second report of the WHO expert committee*.
- WHO. (2002) *Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee*. World Health Organization.
- WHO. (2014) *A global brief on vector-borne diseases*. World Health Organization.
- WHO. (2015) Schistosomiasis: Situation and trends. In. World Health Organization, http://www.who.int/gho/neglected_diseases/schistosomiasis/en.
- Wilson, M. S., Cheever, A. W., White, S. D., Thompson, R. W. & Wynn, T. A. (2011) IL-10 blocks the development of resistance to re-infection with *Schistosoma mansoni*. *PLoS Pathog*, **7**, e1002171.
- Wilson, M. S., Mentink-Kane, M. M., Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Thompson, R. & Wynn, T. A. (2007) Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology and cell biology*, **85**, 148-154.
- Wilson, S., Jones, F., Fofana, H., Landoure, A., Kimani, G., Mwatha, J., *et al.* (2013) A late IL-33 response after exposure to *Schistosoma haematobium* antigen is associated with an up-regulation of IL-13 in human eosinophils. *Parasite immunology*, **35**, 224-228.
- Wolmarans, C., De Kock, K., Strauss, H. & Bornman, M. (2002) Daily emergence of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* cercariae from naturally infected snails under field conditions. *Journal of helminthology*, **76**, 273-277.

Wynn, T. A. & Barron, L. (2010) Macrophages: master regulators of inflammation and fibrosis. In *Proceedings of the Seminars in liver disease*, pp. 245-257. © Thieme Medical Publishers.

Wynn, T. A. & Cheever, A. W. (1995) Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current opinion in immunology*, **7**, 505-511.

Wynn, T. A., Cheever, A. W., Williams, M. E., Hieny, S., Caspar, P., Kühn, R., *et al.* (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*, **160**, 4473-4480.

Wynn, T. A., Morawetz, R., Scharon-Kersten, T., Hieny, S., Morse, H., Kühn, R., *et al.* (1997) Analysis of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell 1- and T helper cell 2-type cytokine responses in vivo. *The Journal of Immunology*, **159**, 5014-5023.

Wynn, T. A., Thompson, R. W., Cheever, A. W. & Mentink-Kane, M. M. (2004) Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological reviews*, **201**, 156-167.

Yoshida, K. & Matsuzaki, K. (2012) Differential regulation of TGF- β /Smad signaling in hepatic stellate cells between acute and chronic liver injuries. *Frontiers in physiology*, **3**, 53.

Yu, C., Cantor, A. B., Yang, H., Browne, C., Wells, R. A., Fujiwara, Y., *et al.* (2002) Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage in vivo. *The Journal of experimental medicine*, **195**, 1387-1395.

Zimmermann, N. & Rothenberg, M. E. (2003) Receptor internalization is required for eotaxin-induced responses in human eosinophils. *Journal of allergy and clinical immunology*, **111**, 97-105.

Zuidema, P. (1981) The Katayama syndrome; an outbreak in Dutch tourists to the Omo National Park, Ethiopia. *Tropical and geographical medicine*, **33**, 30-35.

ANEXO 1 – Parecer Consubstanciado do CEUA

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)



UFMG

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 Negrao-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 Negrao-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