

Jailza Lima Rodrigues

INFLUÊNCIA DA PRODUÇÃO DO FATOR INIBIDOR DA
MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) NA EVOLUÇÃO
DA INFECCÃO POR *Schistosoma mansoni* EM
CAMUNDONGOS

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Parasitologia
Belo Horizonte, MG – Brasil
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Jailza Lima Rodrigues

INFLUÊNCIA DA PRODUÇÃO DO FATOR INIBIDOR DA
MIGRAÇÃO DE MACRÓFAGOS (MIF) NA EVOLUÇÃO
DA INFECÇÃO 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 grau de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Imunoparasitologia

Orientação: Dra. Deborah Negrão-Corrêa

Depto. de Parasitologia - ICB/UFMG.

Belo Horizonte,
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2009

LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS

Imunologia de Helmintos - ICB/UFMG - Profa. Dra. Deborah Negrão-Corrêa;

Imunofarmacologia - ICB/UFMG - Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira;

Mecanismos gerais de infecções fúngicas - ICB/UFMG - Prof. Dr. Ary Corrêa.

Apoio: CNPQ.

*“De tudo ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando,
A certeza de que é preciso continuar e
A certeza de que podemos ser interrompidos
antes de terminar.*

*Fazer da interrupção um caminho novo,
Fazer da queda um passo de dança,
Do medo uma escola,
Do sonho uma ponte,
Da procura um encontro,
E assim terá valido a pena existir!”*

(Fernando Sabino)

AGRADECIMENTOS

À DEUS por conceder o dom da vida e por mais uma conquista.

À minha família que é o meu porto seguro, pelo acolhimento. Principalmente à minha mãe, Selma, pela dedicação e amor infinitos. Aos meus irmãos Adriana, Andréia e Leonardo, Janaína, Felipe, Camila e Rodrigo pela convivência e carinho. E também minha vovó, minhas tias, primos e sobrinhos.

Ao meu noivo Guilherme, grande amor da minha vida, pela longa convivência, pelo carinho, atenção, dedicação, admiração e por estar sempre presente em todos os momentos, e por me fazer entender o verdadeiro sentido da palavra amar. E também ao Sr. Walter, D. Diva, Nando e Laura, por serem minha segunda família.

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

Às alunas do Laboratório de Resposta Imunológica Induzida por Helminos Michelle, Emília, Ana, Maria, Florence, Daysemara, Cíntia e Karina, que me receberam de braços abertos assim que entrei no laboratório: pelo aprendizado, confiança, disponibilidade, imprescindível ajuda e convivências diárias. À Dri pelos ensinamentos, disponibilidade e amizade e à Fernanda pela segurança, amizade, companheirismo e dedicação.

À minha turma do mestrado Ariadna, Denílson, Diogo, Eduardo, Helen, Diana, Luciana, e Rízia, pela convivência agradável principalmente durante a obtenção dos créditos e à Paulinha pela ajuda, companhia, amizade, e momentos de descontração durante as disciplinas e no laboratório.

Aos colaboradores do GIDE Sr. Alberto, Batata, Zenir, Jéferson e principalmente ao Zé Carlos que foi um verdadeiro anjo da guarda; por proporcionarem toda a estrutura para a realização dos experimentos com muita dedicação e carinho.

Às minhas amigas Elizabete e Karina, que mesmo fora do laboratório foram importantes por saberem entender minhas ausências em fases difíceis.

Ao Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira e seus alunos pelas imprescindíveis ajudas e colaborações, especialmente ao Caio, Angélica, Cris, David, Márcia, Cristiano e Norine.

Ao Ary Corrêa e ao Léo pela disponibilidade e aprendizado.

Ao Gilmar e Elmo de CEBIO.

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

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

RESUMO

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante que afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo. A morbidade resultante da infecção por *Schistosoma mansoni* é predominantemente causada por reação do hospedeiro contra os antígenos dos ovos do parasito que são liberados no sistema porta e que ficam parcialmente retidos no fígado e intestino, desencadeando uma inflamação granulomatosa que pode evoluir para casos graves de fibrose hepática e hipertensão portal. A evolução da forma grave da esquistossomose é multifatorial e ainda não esclarecida, porém, estudos experimentais indicam que a indução e modulação da resposta imunológica durante a formação do granuloma é determinante no processo. A citocina MIF, *macrophage migration inhibitory factor*, é produzida por uma grande variedade de células e tecidos, desempenha um papel importante na indução do processo inflamatório, atuando na atração e ativação de linfócitos, macrófagos e eosinófilos, células essenciais na formação do granuloma esquistossomótico. Apesar de ter sido constatado que células presentes no granuloma esquistossomótico produzem e secretam MIF na esquistossomose, seu papel na evolução da doença ainda não é conhecido. Desta forma, este trabalho teve como objetivo analisar a participação desta citocina na evolução da esquistossomose murina através da análise comparativa da infecção por *S. mansoni* em camundongos Balb/c geneticamente deficientes na produção de MIF (MIF^{-/-}) e seus respectivos controles Balb/c não deficientes (WT). Camundongos de ambos os grupos experimentais foram infectados subcutaneamente, 25 cercárias/animal de *S. mansoni* da linhagem LE, e acompanhados durante 14 semanas sendo anotados os eventuais casos de óbito em cada grupo experimental. Animais de cada grupo experimental também foram necropsiados durante a fase aguda (8 semanas) e fase crônica (14 semanas) da infecção por *S. mansoni* para quantificação da carga parasitária e número de ovos do parasito retidos nos

tecidos ou eliminados nas fezes. Paralelamente, foram analisados parâmetros imunológicos, como resposta humoral e produção local de citocinas, e histopatológicos, como infiltração celular e deposição de colágeno no fígado e intestino dos animais necropsiados. A taxa de mortalidade induzida pela infecção por *S. mansoni* foi estatisticamente superior em camundongos MIF^{-/-} em comparação com os camundongos não deficientes. A avaliação parasitológica demonstrou que o número de vermes e a deposição de ovos no fígado e no intestino dos animais experimentalmente infectados de ambos os grupos experimentais foi estatisticamente semelhante, tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção. A análise das alterações imunológicas induzidas pela infecção por *S. mansoni* revelou diferenças importantes na resposta de camundongos MIF^{-/-}. Apesar de apresentar níveis semelhantes de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-17) e modulatórias (IL-10), estes animais apresentaram uma produção reduzida de citocinas do perfil Th2, especialmente IL-4, e aumento de IFN- γ no fígado em resposta à infecção pelo parasito. Paralelamente, camundongos MIF^{-/-} infectados por *S. mansoni* apresentaram menor indução de IgE sérica e o granuloma formado ao redor do ovo do parasito foi menor e apresentava menor infiltração de eosinófilos e macrófagos. A avaliação da deposição de colágeno no granuloma esquistossomótico, tanto na análise histopatológica como na quantificação de hidroxiprolina no fígado, indica uma quantidade diminuída de colágeno nos camundongos MIF^{-/-} em relação aos animais WT, especialmente na fase crônica da esquistossomose. Finalmente, foi possível quantificar um aumento significativo dos níveis séricos de ALT e AST em camundongos durante a fase crônica da infecção, sendo que o aumento de ALT foi significativamente maior em camundongos MIF^{-/-}, sugerindo maior lesão hepática nestes animais. Em conjunto, os dados apresentados indicam que MIF participa do recrutamento de eosinófilos e macrófagos e da indução da resposta do tipo 2 durante a formação do granuloma esquistossomótico, e que a

formação adequada do granuloma é importante na proteção do hospedeiro contra possíveis lesões hepáticas induzidas por antígenos do ovo do parasito.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a chronic and debilitating disease that affects over 200 million people worldwide. The pathology observed in *Schistosoma mansoni* chronically infected host is mainly associated with the intensity of the cellular-mediated granulomatous to parasite eggs that are laid in the portal venous system and subsequently retained in liver and intestine, which would lead to portal hypertension and consequently cause much of the morbidity and mortality associated with this disease. Although the evolution of severe schistosomiasis depends on multiples elements, the induction/regulation of immune response responsible for granuloma formation around the parasite eggs is essential in this process. The *migration inhibitory factor* (MIF) is a cytokine produced and expressed by variety cells that plays a central in the role in the control of the host inflammatory, through activation of lymphocytes, macrophage and eosinophils. Therefore, MIF would participate in granuloma formation and consequently in the evolution of the schistosomiasis. The aim of this experimental work is to evaluate the participation of MIF production in the *S.mansoni*-induced pathology in mice. Balb/c mice genetically deficient in MIF production (MIF^{-/-}) and non-deficient Balb/c mice (WT), were infected subcutaneously with 25 cercariae/mice and the mortality was observed. The parasite burden was evaluated by counting the total number of worms recovered after circulatory perfusion, eggs eliminated in feces and eggs retained in tissues. Cellular infiltration in liver and intestine were directly evaluated by histopathological analysis and indirectly quantified through enzymatic activity and hydroxyproline production. Moreover, hepatic function of infected animals was estimated by quantification of serum levels of AST and ALT. The infection with *S. mansoni* induced a significantly higher mortality rate in MIF^{-/-} mice than in non-deficient infected animals. Parasitological analysis showed that the number of adult worms and the number of eggs eliminated in host feces or retained in tissue are similar in WT and deficient mice. Therefore, the high mortality of MIF deficient mice was not

related with parasite burden. In contrast, the local production of type 2-cytokine, the cellular infiltration (especially macrophage and eosinophils) and hydroxyproline deposition was significantly higher in liver of non-deficient animals than MIF deficient infected mice. Moreover, *S. mansoni* infected MIF-deficient mice showed higher ALT activity in serum, suggesting deficiency in liver function. All together the results indicated that MIF is important to granuloma formation and host protection.

Este trabalho é dedicado à memória de Joaquim Castro dos Santos, Jairo Rodrigues Lima e Marco Antônio Morethson, pessoas importantes que fazem parte da minha história.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição Mundial da Esquistossomose.	23
Figura 2 - Prevalência da Esquistossomose no Brasil.	24
Figura 3 - Ciclo de evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i>	27
Figura 4 - Balanço da produção de citocinas Th1 e Th2 em infecção primária por <i>S. mansoni</i> em camundongos	32
Figura 5 - Organograma Experimental 1	64
Figura 6 - Orgnograma Experimental 2	65
Figura 7 - Fotomicrografias de cortes de tecido hepático de animais na fase aguda da infecção corados por <i>S. mansoni</i> Tricômico de Masson.....	96
Figura 8 - Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido hepático de camundongos durante a fase aguda da infecção por <i>S. mansoni</i>	97
Figura 9 - Fotomicrografia de cortes de tecido hepático na fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i> corados com hematoxilina-eosina.....	98
Figura 10 - Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos WT (A) e MIF ^{-/-} (B) infectados por <i>S. mansoni</i> com 14 semanas de infecção com 25 cercárias de <i>S. mansoni</i> e corados com Tricômico de Masson	99

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Número total de vermes recuperados pela técnica da perfusão na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni* em camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-}). 80
- Gráfico 2** - INúmero de ovos presentes nas fezes de camundongos, na fase aguda e na fase crônica, da infecção por *S. mansoni* em camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-}) 81
- Gráfico 3** - Número de ovos retidos no (A) pulmão, (B) baço, (C) fígado e (D) intestino na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni* em camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-})..... 82
- Gráfico 4** - Níveis de IgG2a parasito específico na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni* em camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-}) .. 83
- Gráfico 5** - Níveis de IgG1 parasito específico no soro de camundongos na infecção por *S. mansoni* em camundogos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-}) 84
- Gráfico 6** - Níveis de IgE total no soro de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-}) na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni* 85
- Gráfico 7** - Níveis de TNF- α no homogenato hepático de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-}) durante a fase aguda e fase crônica da infecção por *S. mansoni*..... 86
- Gráfico 8** - Níveis de IL-17 no homogenato hepático de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-})na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni*..... 86
- Gráfico 9** - Níveis de interferon- γ (IFN- γ) no homogenato hepático de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-}), na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni* 87
- Gráfico 10** - I Níveis de interleucina-10 (IL-10) no tecido hepático de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-}), durante a fase aguda e a fase crônica da infecção por *S. mansoni* 88
- Gráfico 11** - Níveis de interleucina-5 (IL-5) no fígado de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-}) na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni* 89
- Gráfico 12** - Níveis de interleucina-4 (IL-4) no tecido hepático de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-}), na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni* .. 90

Gráfico 13 - Níveis de interleucina-13 (IL-13) no fígado de camundongos B camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF ^{-/-}), na fase aguda e na fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	90
Gráfico 14 - Atividade de MPO no intestino de camundongos camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF ^{-/-}) na fase aguda (A) e na fase crônica (B) da infecção por <i>S. mansoni</i>	91
Gráfico 15 - Atividade de MPO no fígado de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF ^{-/-}) na fase aguda (A) e na fase crônica (B) da infecção por <i>S. mansoni</i>	92
Gráfico 16 - Atividade de EPO no intestino de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF ^{-/-}) durante as fases aguda (A) e crônica (B) da infecção por <i>S. mansoni</i>	93
Gráfico 17 - Atividade de EPO no fígado de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF ^{-/-}) durante as fases aguda (A) e crônica (B) da infecção por <i>S. mansoni</i>	93
Gráfico 18 - Atividade de NAG no intestino de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF ^{-/-}) na fase aguda (A) e na fase crônica (B) da infecção por <i>S. mansoni</i>	94
Gráfico 19 - Atividade de NAG no fígado camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF ^{-/-}) na fase aguda (A) e na fase crônica (B) da infecção por <i>S. mansoni</i>	95
Gráfico 20 - O conteúdo de hidroxiprolina no fígado de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF ^{-/-}), na fase aguda e na fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	100
Gráfico 21 - O nível de Aspartato aminotransferase (AST) foi medido como um indicador da lesão tecidual de c camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF ^{-/-}) na fase aguda e na fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	101
Gráfico 22 - O nível de Alanina aminotransferase (ALT) foi medido como um indicador da lesão tecidual de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF ^{-/-}) na fase aguda e na fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i>	102
Gráfico 23 - Comparação entre as curvas de sobrevivência de camundongos Balb/c (MIF ^{-/-}), e de camundongos Balb/c (WT) durante 14 semanas de infecção por <i>S. mansoni</i>	103

LISTA DE ABREVIATURAS

AAM	Macrófagos Alternativamente Ativados
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
APC	Células apresentadoras de antígeno
ARG-1	Arginase 1
AST	Aspartato aminotransferase
BSA	Albumina de soro bovino
CCR	Receptor de quimiocina do tipo CC
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
ConA	Concavalina A
CXCR	Receptor de quimiocina do tipo CXC
DCs	Células dendríticas
DTH	Reação de hipersensibilidade tardia
ELISA	Ensaio imuno-sorvente por enzima ligada (“ <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> ”)
EPM	Erro padrão da média
EPO	Peroxidase de Eosinófilos
ERK1/ERK2	Membros da família de proteínas kinases
FIZZ	Proteína expressa em macrófagos alternativamente ativados
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
Ig	Imunoglobulina
CAM-1	Molécula de adesão intercelular
iNOS	Óxido nítrico sintetase
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
JAB1	“JUN-activation domain-binding protein 1”
lyso-PS	Lyso-fosfatidilserine
LPS	Lipofosfossacarídeo de bactéria Gram negativa
MIF	“ <i>Macrophage Migration Inhibitory Factor</i> ”
MHC II	Complexo de histocompatibilidade do tipo II
RNA _m	RNA mensageiro
NAG	N-acetil-glicosaminidase
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
OPD	O-fenilodiamina
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico (“ <i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i> ”)
PBS	Salina tamponada (“ <i>phosphate buffered saline</i> ”)
PLA/A2	Fosfolipase citoplasmática
RPMI	Meio de cultura cuja fórmula foi criada no <i>Roswell Park Memorial Institute, NY</i>
SEA	Antígenos solúveis de ovo de <i>Schistosoma mansoni</i>
STAT4	Sinal transdutor e ativador de transcrição 4
STAT 6	Sinal transdutor e ativador de transcrição 6
SWAP	Antígenos solúveis de verme adulto
TGF- β	Fator de transformação de crescimento
TLR	Toll-like receptors
TNF- α	Fator de necrose tumoral

Th0	Células T CD4+ auxiliaadoras que liberam simultaneamente citocinas do tipo 1 e do tipo 2
Th1	Células T CD4+ auxiliaadoras do tipo 1
Th2	Células T CD4+ auxiliaadoras do tipo 2
Th17	Células T CD4+ auxiliaadoras do tipo 17
Treg	Células T CD4+ designadas Regulatórias
YM1	Membro da família da quitinase e expresso em macrófagos alternativamente ativados
WT	Selvagens " <i>Wild Type</i> "

SUMÁRIO

1. ASPECTOS GERAIS	19
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 A Esquistossomose	22
2.2 O ciclo evolutivo de <i>S. mansoni</i>	25
2.3 Formas clínicas da esquistossomose	28
2.4 Resposta imunológica induzida pela infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	31
2.5 Granuloma: Proteção versus Patologia	35
2.6 Papel das citocinas na formação e modulação do granuloma	38
2.7 Mecanismos de fibrose	45
2.8 Macrophage Migration Inhibitory Factor: MIF	48
4. OBJETIVOS	57
4.1 OBJETIVO GERAL.....	58
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	58
5. METODOLOGIA	60
5.1 Animais experimentais e infecção	61
5.2 Delineamento experimental	62
5.3 Necropsia dos animais utilizados	65
5.4 Avaliação da Infecção	67
5.4.1 Quantificação de ovos de <i>S. mansoni</i> eliminados nas fezes	67
5.4.2 Recuperação de vermes do Sistema Porta.....	67
5.4.3 Quantificação dos ovos retidos em tecidos do hospedeiro	68
5.5 Avaliação da resposta imunológica	68
5.5.1 Obtenção do soro	68
5.5.2 Dosagem de imunoglobulinas	69
5.5.3 Quantificação de citocinas.....	70
5.5.4 Infiltração celular no fígado e intestino	72
5.5.5 Avaliação da patologia	75
5.5.6 Histologia	77
5.5.7 Análise Estatística.....	78
6. RESULTADOS	79
6.1. Avaliação de parâmetros parasitológicos em camundongos WT e MIF ^{-/-} infectados por <i>S. mansoni</i>	80
6.2. Avaliação da resposta imunológica induzida pela infecção por <i>S. mansoni</i> em camundongos WT e MIF ^{-/-}	83
6.2.1 Resposta humoral.....	83
6.2.2 Produção de citocinas no fígado.....	85
6.2.3 Atividade enzimática como medida indireta do infiltrado celular no Fígado e no Intestino	91
6.3. Avaliação Patológica	95
7. DISCUSSÃO	104
8. CONCLUSÕES	119
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	122
10. ANEXO	162

1. ASPECTOS GERAIS

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante que afeta mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que as principais áreas de transmissão são localizadas em várias regiões da África e América Latina, inclusive no Brasil (WHO, 2002).

A esquistossomose humana apresenta uma forma aguda, geralmente assintomática, que na maioria dos pacientes evolui para a forma crônica leve, na qual os ovos do parasito são depositados em pequena quantidade nas ramificações terminais mais finas da veia porta, originando granulomas periovulares que parecem situados em pleno parênquima hepático e em várias fases de evolução para cicatrização (ANDRADE & PRATA, 1963; ANDRADE, 2008). Entretanto, em uma minoria de pacientes a esquistossomose pode evoluir para forma grave, caracterizada pela intensa deposição de ovos na região periportal, provocando expansão fibrosa sistematizada dos espaços porta, acompanhada de lesões destrutivas e obstrutivas do sistema da veia porta intra-hepático (ANDRADE, 2008). A intensidade da infecção e exposição à re-infecção (SANTOS *et al.*, 2000; ANDRADE, 2008) são fatores determinantes na evolução para forma grave da esquistossomose, entretanto, vários estudos indicam que a formação e modulação da resposta do hospedeiro contra os antígenos dos ovos do parasito que ficam retidos nos tecidos, principalmente intestino e fígado, tem papel fundamental nesse processo.

Antígenos secretados/excretados pelos ovos de *S. mansoni* retidos nos tecidos do hospedeiro induzem uma reação celular, denominada de granuloma periovular, que é mediada por células T CD4+. A formação e modulação do granuloma, o desenvolvimento da fibrose hepática e do grau de morbidade, depende marcadamente da produção de citocinas. Neste sentido, estudos experimentais têm demonstrado a importância da produção de TNF- α e conseqüente aumento da expressão de ICAM-1 para a migração inicial de células para o sítio

de retenção dos ovos (AMIRI *et al.*, 1992; JOSEPH & BOROS, 1993). Ficou estabelecido a importância da produção de IL-4 e IL-10 na fase de modulação da resposta do tipo 1 e polarização da resposta do tipo 2, essencial na formação do granuloma e contenção da lesão hepática provocada por antígenos do ovo do parasito (HOFFMANN *et al.*, 2000), e finalmente o papel pró-fibrótico da produção de IL-13 (CHIARIMONT *et al.*, 1999; WYNN, 2004). Estudos recentes também indicam o papel fundamental de macrófagos alternativamente ativados e de eosinófilos na formação e modulação do granuloma (HERBERT *et al.*, 1999), sugerindo que mediadores responsáveis pelo recrutamento destas células, como é o caso de *macrophage migration inhibitory factor* - MIF possam estar envolvidos na evolução da forma grave da esquistossomose. Descoberta há aproximadamente 40 anos (DAVID *et al.*, 1966), MIF é uma citocina produzida por uma grande variedade de células em diferentes tecidos do organismo, que age como uma citocina pró-inflamatória clássica promovendo ativação de macrófagos (CALANDRA *et al.*, 1994), eosinófilos (BOZZA *et al.*, 2008) e células T (BACHER *et al.*, 1996). A estimulação de macrófagos com MIF induz a secreção de TNF- α , por sua vez, TNF- α estimula a secreção de MIF (CALANDRA & ROGER, 2003). Alguns estudos demonstraram que a deficiência de MIF afeta patologias de perfil Th2, como é o caso de modelos experimentais de asma e rinite alérgica, reduzindo a infiltração de eosinófilos, a secreção de muco, e a indução de hiperreatividade brônquica (ROSSI *et al.*, 1998; MIZUE *et al.*, 2005). Apesar da confirmação da produção de MIF durante infecção por *Schistosoma mansoni* (BOROS *et al.*, 1973; 1975), ainda não ficou totalmente esclarecida a participação desta citocina na resposta imunológica induzida durante a infecção e no desenvolvimento da patologia por *S. mansoni*, que será o foco deste trabalho experimental.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Esquistossomose

A esquistossomose é a doença causada por vermes do gênero *Schistosoma* Weiland 1858, que pertencem ao Filo Platyhelminthes, Classe Trematoda, subclasse Digenea e Família Schistosomatidae. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a doença ocorre em 76 países e territórios da Ásia, África e América sendo estimado que 207 milhões de pessoas encontram-se infectadas. Outro dado alarmante para o controle da esquistossomose é que aproximadamente 600 milhões de pessoas vivem em áreas de risco de transmissão de doença, e, de acordo com estimativas prévias, a esquistossomose causa uma perda anual de 1,7 a 4,5 milhões de DALYs (*disability adjusted life years*) (WHO, 2002). Sendo, por isso, um considerável problema de saúde pública (GRYSEELS *et al.*, 2006).

Dentre as espécies capazes de infectar o homem, cinco delas: *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852), *Schistosoma mansoni* Sambon 1907, *Schistosoma japonicum* Katsurada 1904, *Schistosoma intercalatum* Fisher 1934, e *Schistosoma mekongi*, Voge, Bruckner & Bruce, 1978, são mais prevalentes e representam a quase totalidade dos casos de esquistossomose humana na atualidade. Conforme ilustrado na **figura 1**, estas diferentes espécies de *Schistosoma* apresentam distribuição variada em torno do globo: *S. japonicum* apresenta-se restrito ao Extremo Oriente, incluindo a China e as Filipinas; *S. mekongi* está limitado a algumas áreas do sudeste da Ásia; *Schistosoma haematobium* é a espécie com ampla dispersão na África e no Oriente Médio; *Schistosoma intercalatum* encontrado na África e *S. mansoni* presente na África, sendo a única espécie que infecta o homem na América Latina (WHO, 2002).

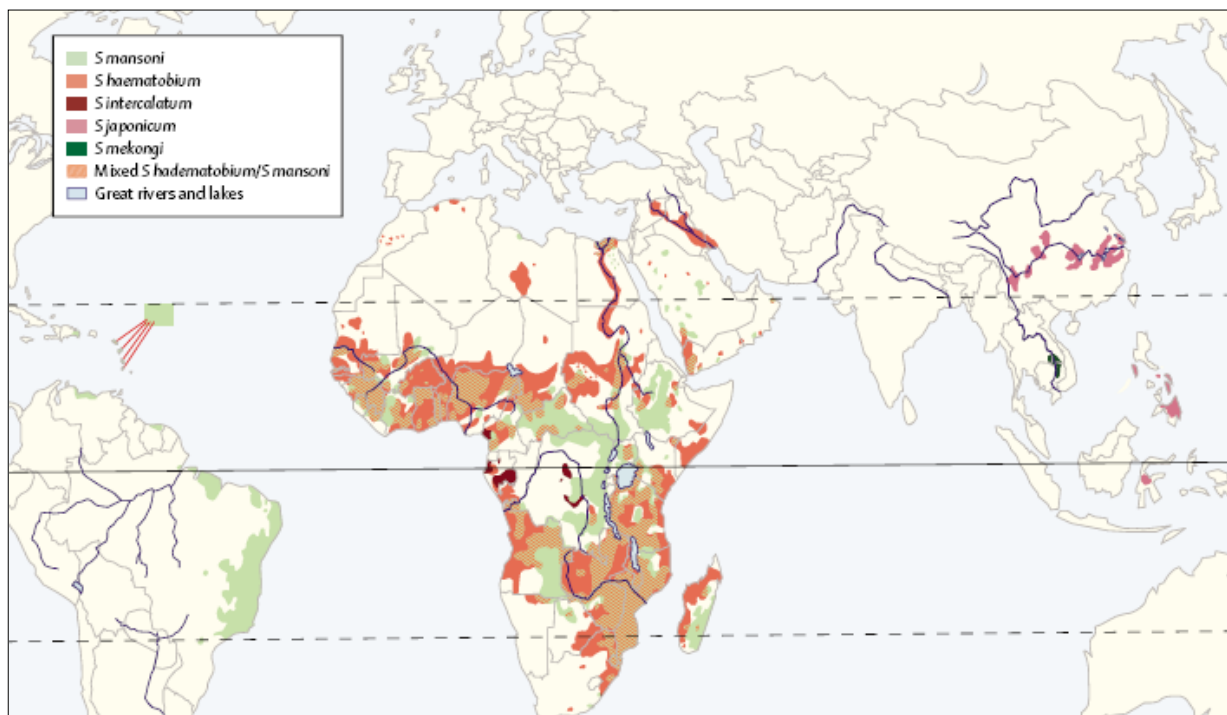


Figura 1: Distribuição mundial de espécies de *Schistosoma*: *S. mansoni*: África, Brasil, Suriname, Venezuela, Caribe, Egito, Península Arábica; *S. haematobium*: África, Egito, Sudão, Península Arábica; *S. japonicum*: China, algumas outras nas Filipinas e alguns pontos na Indonésia; *S. mekongi*: Laos e Camboja; *S. intercalatum*: oeste e centro da África. (Fonte: GRYSEELS *et al.*, 2006)

A espécie *S. mansoni* é o agente da esquistossomose mansoni ou moléstia de Pirajá da Silva, única das infecções causadas pelo gênero *Schistosoma* que é endêmica no Brasil. As principais áreas de transmissão são localizadas nos Estados de Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Pernambuco e Alagoas (AMARAL & PORTO, 1994). Tem sido estimado que 4 a 6 milhões de pessoas estejam infectadas por *S. mansoni* no Brasil, sendo que os Estados de Minas Gerais e Bahia concentram 70% destes casos (DRUMMOND *et al.*, 2006). Após a implementação de medidas de controle da esquistossomose, baseada principalmente na utilização de quimioterápicos mais eficazes como a oxamniquine, a prevalência da infecção no Brasil teve uma grande redução, passando de 23,3 % em 1977 para índices estimados de 6,0 % em 2004-2005 (BARBOSA *et al.*, 2008). Apesar da prevalência geral da

esquistossomose na população brasileira não parecer elevada, levantamentos nacionais (AMARAL & PORTO 1994, COURA & AMARAL 2004) demonstram a existência de áreas endêmicas onde a prevalência da esquistossomose supera 15% (**figura 2**), bem como novos focos de transmissão que evidenciam a expansão da esquistossomose no Brasil.

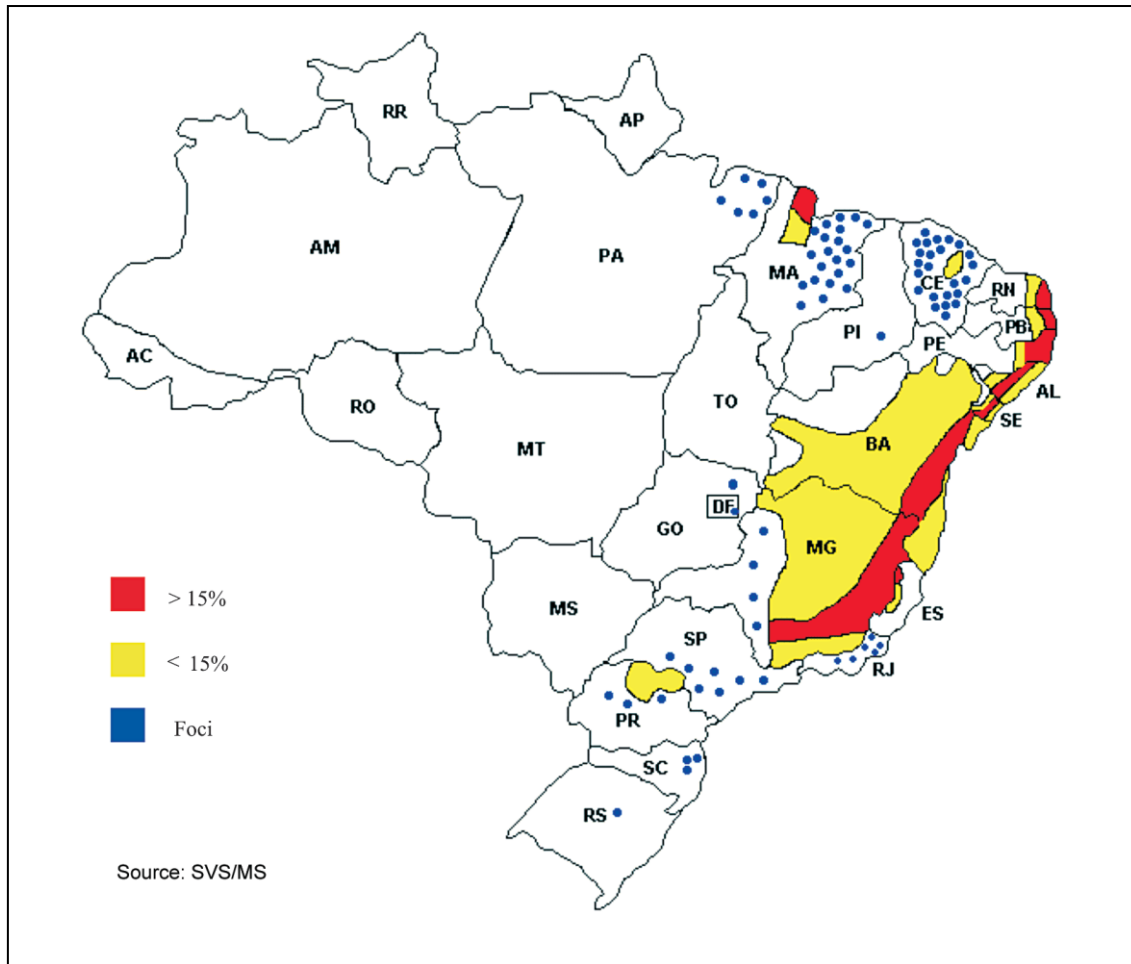


Figura 2: Prevalência da esquistossomose no Brasil (DRUMMOND *et al.*, 2006).

No Estado de Minas Gerais a prevalência da esquistossomose é de cerca de 7% (KATZ & PEIXOTO, 2000). Estudos realizados indicaram que a esquistossomose é prevalente em 519 dos 853 municípios do estado, atingindo um milhão de pessoas em uma área de 300.000 Km² (KATZ, 1998). Dados recentes do Ministério da Saúde (2007) mostram que no ano de 2006 foram registrados 106.989 casos de esquistossomose no Brasil. Destes casos, 75.575

foram confirmados na região Nordeste. Na região Sudeste foram registradas 30.787 ocorrências, sendo que 26.463 registros ocorreram em Minas Gerais.

2.2 O ciclo evolutivo de S. mansoni

Para seu desenvolvimento, *S. mansoni* necessita de um hospedeiro definitivo, que incluem humanos e outros mamíferos (MODENA *et al.*, 2008), e um hospedeiro intermediário, que são algumas espécies do gênero *Biomphalaria*. Dentre as espécies de mamíferos que são encontradas naturalmente infectadas no Brasil, o homem tem sido considerado, até o momento, a única espécie epidemiologicamente associada à transmissão deste parasito (GRYSEELS *et al.*, 2006). No entanto, existem trabalhos demonstrando que outros mamíferos podem ser fonte de infecção. Um estudo na região de Sumidouro no Rio de Janeiro demonstrou que roedores do gênero *Nectomys* são altamente susceptíveis à infecção por *S. mansoni*. Estes roedores podem ter importância na dinâmica da transmissão de algumas áreas, podendo ser considerados reservatórios silvestres dessa doença humana em algumas condições específicas (GENTILE *et al.*, 2006).

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

que, liberadas no ambiente aquático, são infectantes ao homem. Condições como iluminação e temperatura da água exercem influência sobre essa liberação da cercária (BOGEA *et al.*, 1996; WOLMARANS *et al.*, 2002). Populações de caramujos, densidade de cercárias, e padrão de contato humano com a água sofrem fortes variações temporais e espaciais, resultando em uma distribuição focal da infecção em países e regiões. As cercárias infectam o hospedeiro definitivo por penetração ativa através da pele ou mucosa quando este entra em contato com águas infestadas. Durante este processo, as cercárias perdem a cauda sofrem modificações estruturais, fisiológicas e bioquímicas e se transformam em esquistossômulos (CURWEN & WILSON, 2003; WHITFIELD *et al.*, 2003). Os esquistossômulos adaptam-se às condições fisiológicas do meio interno do hospedeiro, migram pelo tecido subcutâneo e alcançam o sistema circulatório. Através da corrente sanguínea e/ou linfática, os esquistossômulos atingem o ventrículo direito e são levados, via artéria pulmonar aos pulmões. Dos pulmões migram aos vasos intra-hepáticos, preferencialmente, via circulação passiva, pela aorta para o sistema porta-hepático através da veia porta, ou circulando sistemicamente por vários órgãos antes de atingirem artérias que derivam no sistema porta-hepático (LENZI *et al.*, 2008a). Entretanto, também se admite que parte dos esquistossômulos possa atingir os vasos intra-hepáticos migrando ativamente através da veia cava e artéria hepática, ou ainda, por migração transdiafragmática (LENZI *et al.*, 2008a). Nos ramos do seio porta-hepático os esquistossômulos completam seu desenvolvimento, tornam-se vermes adultos, diferenciando-se em machos e fêmeas. Em camundongos *Swiss Webster*, experimentalmente infectados, são observados vermes acasalados nas veias portais do hilo hepático a partir do 25º dia após a penetração e a postura de ovos tem início entre o 30º e o 35º dias após infecção (LENZI *et al.*, 2008 a). O número de ovos produzidos diariamente pela fêmea de *S. mansoni* varia de acordo com a espécie do hospedeiro e da linhagem do parasito, entretanto, a maioria dos estudos indicam a produção de 150-400 ovos/fêmea/dia

(LENZI, *et al.*, 2008 a). Do total de ovos eliminados pelo parasito, apenas 40 % são capazes de atravessar o endotélio, a membrana basal do vaso, a mucosa intestinal e alcançar a luz intestinal sendo eliminado nas fezes (PEARCE & MACDONALD, 2002). Grande parte dos ovos produzidos pelas fêmeas do *S. mansoni* ficam retidos na mucosa intestinal e quando não deixam os vasos, são carreadas pelo fluxo sanguíneo e se acumulam principalmente no fígado, onde se tornam alvo da resposta imune do hospedeiro (BOROS & WARREN, 1970; WARREN, 1982).

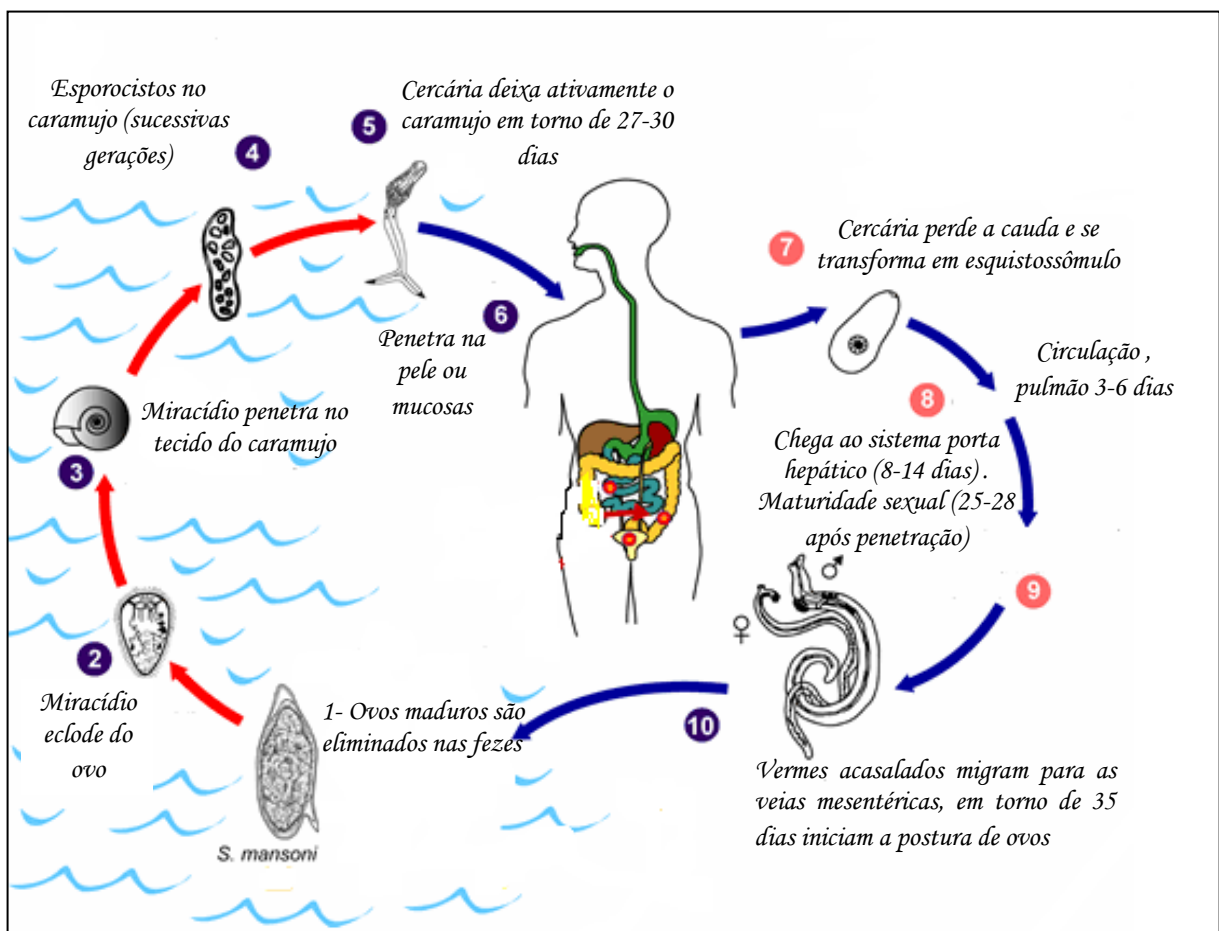


Figura 3: Ciclo evolutivo de *S. mansoni*. Disponível em <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/html/schistosomiasis.html> (modificado CDC).

2.3 Formas clínicas da esquistossomose

A infecção humana por *S. mansoni*, apesar da gravidade das lesões esquistossomóticas, costuma ser assintomática ou oligossintomática, mas a evolução das fases graves da doença é observada em cerca de 4 a 10 % dos pacientes (BICA *et al.*, 2000; CARVALHO & ANDRADE, 2005).

A fase aguda da esquistossomose ou febre de *Katayama* pode ser dividida em fase pré-postural, que compreende a fase de migração e desenvolvimento dos vermes, e fase pós-postural (HYAT *et al.*, 1979). Os sintomas clínicos da fase aguda da esquistossomose são freqüentemente relatados em pessoas não previamente expostas ao parasito, como turistas, imigrantes e outras pessoas que acidentalmente são expostas à infecção primária (CALDAS *et al.*, 2008; RASO *et al.*, 1986; ZUIDEMA 1981; KING *et al.*, 1998). Em populações residentes em áreas endêmicas, o indivíduo infectado geralmente apresenta um quadro clínico assintomático nesta fase da infecção (BINA & PRATA, 2003; CALDAS *et al.*, 2008). A sintomatologia da fase aguda da esquistossomose é associada a uma resposta de hipersensibilidade sistêmica contra a migração do verme e o início da oviposição, ocorrendo em poucas semanas a meses após a infecção primária com a disseminação massiva de granulomas especialmente no fígado, pulmão, pâncreas e linfonodos (LAMBERTUCCI, 1993; BOTTIEAU *et al.*, 2006; CALDAS *et al.*, 2008). As manifestações clínicas da forma sintomática são diversificadas e com sinais e sintomas inespecíficos, como prostração, febre, calafrios, urticárias, diarreia, anorexia, emagrecimento e esplenomegalia em combinação com leucocitose e eosinofilia (GAZZINELLI *et al.*, 1985). Sintomas abdominais também podem ocorrer mais tardiamente nesta fase, causados principalmente pela migração e posicionamento dos vermes maduros (GRYSEELS *et al.*, 2006). A maioria dos pacientes se recupera espontaneamente, porém, alguns desenvolvem doença mais séria e persistente com perda de peso, dispnéia, diarreia, dor abdominal difusa, hepatomegalia. Complicações neurológicas,

pulmonares, cardíacas, hepáticas ou intestinais podem ocorrer nesta fase (BOROS, 1989). Em casos mais raros, hepatite aguda com necrose focal e enterocolites são observadas (RASO, 1986; CALDAS *et al.*, 2008).

A esquistossomose é de fato uma doença crônica, com uma tendência a exibir um padrão bipolar, com cerca de 90% de formas leves, em que os pacientes se apresentam muitas vezes assintomáticos ou com queixas vagas, geralmente discretas e inespecíficas; e de 4% a 10% de formas graves ou avançadas. Muito da sintomatologia observada na fase crônica da esquistossomose é atribuída à resposta imune contra os ovos do parasito acumulados nos tecidos (WYNN *et al.*, 2004; WILSON *et al.*, 2007). A esquistossomose crônica pode ser classificada clinicamente em formas intestinal, hepatointestinal e a forma mais grave da doença denominada de forma hepatoesplênica (BOGLIOLO, 1958; PRATA & BINA, 1968; ANDRADE, 2004). Na esquistossomose humana, a maioria dos pacientes apresenta a forma intestinal podendo ser assintomáticos, ou apresentar sintomas abdominais, como dor local, diarreia intermitente e fezes sanguinolentas, além de fadiga e cefaléia. Essas manifestações clínicas podem estar associadas à inflamação e a fibrose do intestino (DUNNE & PEARCE, 1999). Alguns autores sugerem a não existência de uma forma intestinal pura, pois o acometimento do fígado é freqüente em todas as formas anátomo-clínicas da esquistossomose, mesmo aquelas em que o fígado não é o eixo das manifestações principais da doença (RASO & PEDROSO, 1987). Na forma hepatointestinal observa-se, além da presença de sintomas intestinais, a presença de sintomas associados às lesões hepáticas. Nos pacientes que apresentam a forma intestinal ou hepato-intestinal da esquistossomose, os granulomas periovulares se formam isoladamente nas ramificações terminais mais finas da veia porta, dando a impressão de estarem situados em pleno parênquima hepático. Outra característica freqüente nos pacientes com forma leve da esquistossomose (intestinal e

hepatointestinal) é que os granulomas aparecem em pequeno número e em várias fases de evolução para cicatrização (ANDRADE & PRATA, 1963; ANDRADE, 2008).

Com o acúmulo de ovos nos tecidos, a esquistossomose pode evoluir para forma grave. A forma grave da esquistossomose primeiramente descrita por PRATA & ANDRADE (1963) é caracterizada morfológicamente pela fibrose hepática periportal, dita *pipestem*, descrita por SYMMERS (1904). Esta alteração é caracterizada pela deposição e acúmulo de ovos do parasito na região periportal, provocando expansão fibrosa sistematizada dos espaços porta acompanhada de lesões destrutivas e obstrutivas do sistema da veia porta intra-hepático (ANDRADE, 2008). Desta forma, a fibrose periportal, é geralmente associada a sinais de hipertensão, com alterações congestivas e obstrutivas de ramos intra-hepáticos e ao longo da parede da veia porta, que dificultam a perfusão sanguínea do órgão, resultando em aumento considerável do baço e do fígado (LAMBERTUCCI, 1993). O baço aumenta por incremento do leito vascular, congestão da polpa vermelha e/ou hiperplasia do parênquima (FREITAS *et al.*, 1999; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2002). A circulação colateral aumenta devido à formação de anastomoses que tentam diminuir o fluxo sanguíneo, desviando-o de áreas de elevada pressão (LACERDA *et al.*, 2002). Com frequência, varizes gástricas e esofagianas podem se romper com perdas significativas de sangue, percebida pela hematêmese e melena, sendo a principal causa de óbitos em humanos (KHEIR *et al.*, 1999).

Os fatores que levam alguns indivíduos a desenvolverem a forma grave da doença ainda não foram claramente estabelecidos e este conhecimento poderá ser primordial para o desenvolvimento de métodos eficientes para o controle dessas formas graves da esquistossomose. Fatores múltiplos podem estar envolvidos no desenvolvimento de formas graves (ABATH *et al.*, 2006). Alguns pesquisadores concordam que fatores genéticos e imunológicos (CHEEVER *et al.*, 1987; DESSEIN *et al.*, 1999; DUNNE & PEARCE, 1999 BUTTERWORTH *et al.*, 1985), intensidade da infecção e exposição à re-infecção

(ANDRADE, 2008) estejam associados à evolução da forma grave da esquistossomose. Apesar da carga parasitária e a exposição às re-infecções estarem entre as principais causas da evolução para forma grave (BINA & PRATA, 2003; CARVALHO e ANDRADE, 2005), estes fatores não explicam completamente a evolução da esquistossomose.

A relação entre as manifestações clínicas da esquistossomose em populações humanas e a intensidade da infecção não apontam sempre uma correlação positiva, visto que a doença hepatoesplênica ocorre geralmente após o pico da carga parasitária (FALLON *et al.*, 2000). A própria intensidade da infecção depende de vários fatores epidemiológicos, como a prevalência da infecção na área, a frequência e a intensidade do contato com água contaminada (GAZZINELLI *et al.*, 2001), além dos fatores inerentes ao hospedeiro. Nos últimos anos, um grande número de evidências experimentais indicam que a capacidade do hospedeiro de induzir e modular o processo inflamatório em resposta à liberação de antígenos do ovo do parasito também sejam fatores determinantes na evolução da forma hepatoesplênica da esquistossomose (WYNN *et al.*, 1994; FALLON, 2000; PEARCE *et al.*, 2004).

2.4 Resposta imunológica induzida pela infecção por Schistosoma mansoni

A resposta imunológica induzida por *S. mansoni* em seu hospedeiro vertebrado está intimamente envolvida no desenvolvimento de muitas das alterações patológicas que acompanham a infecção (CARVALHO *et al.*, 2008). O estudo detalhado da resposta imunológica induzida por *S. mansoni* tem sido realizado em modelos experimentais, geralmente utilizando-se camundongos como hospedeiro vertebrado (PEARCE & MACDONALD, 2002; STADECKER *et al.*, 2004; PEARCE *et al.*, 2004), uma vez que estes são animais altamente susceptíveis à infecção e são animais de fácil manutenção em

condições laboratoriais. Conforme ilustrado na **figura 4**, dados obtidos com infecção experimental de camundongos mostram que a resposta imunológica induzida por *S. mansoni* nas diferentes fases da infecção.

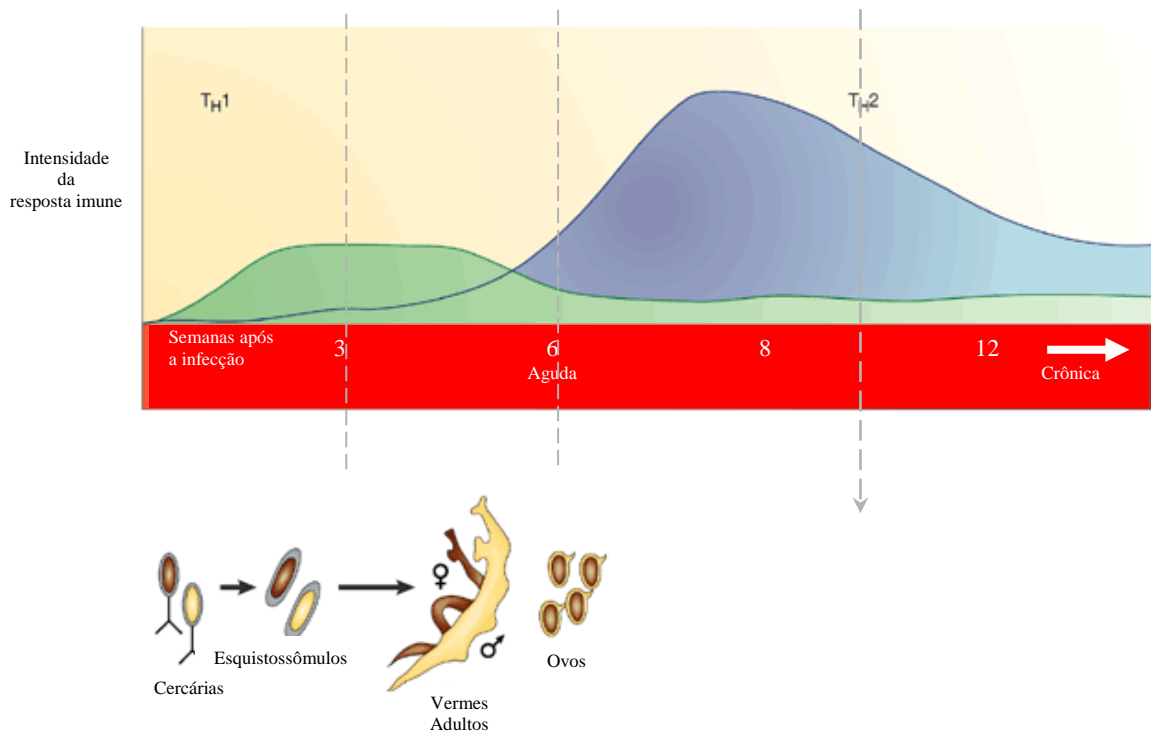


Figura 4. Balanço da produção de citocinas Th1 e Th2 em infecção primária por *S. mansoni* em camundongos (modificado de PEARCE & MACDONALD, 2002).

Durante a migração dos esquistossômulos, diferenciação e maturação dos vermes adultos, período entre a 3ª e a 5ª semana após a infecção em camundongos, os autores relatam uma resposta com predomínio de células CD4+ Th1 (VELLA & PEARCE, 1992; PEARCE *et al.*, 1991; WYNN, *et al.*, 1998; HOFFMANN, *et al.*, 2000; PEARCE & MACDONALD, 2002; STADECKER, *et al.*, 2004) e consequente produção de interferon-gama (IFN- γ), interleucina-2 (IL-2) e IL-12 (DUNNE & PEARCE, 1999; STADECKER, 1998). Ainda não estão estabelecidos os mediadores imunológicos da patogênese da forma aguda, nem a que antígenos esta resposta está dirigida. No entanto, há estudos indicando a importância dos

antígenos de esquistossômulos como prováveis mediadores (SILVA *et al.*, 2008; HIATT *et al.*, 1979; CAPRON & DESSAINT, 1985; BUTTERWORTH *et al.*, 1994).

No período de cinco a seis semanas, etapa marcada pelo início da produção de ovos, ocorre uma mudança no perfil de citocinas circulantes (**figura 4**), sendo observado aumento de produção de citocinas do tipo Th2, incluindo IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, eosinofilia e produção de IgE (CHEEVER *et al.*, 2000; PEARCE & MACDONALD, 2002; PEARCE, *et al.*, 2004). Vários autores demonstraram que antígenos secretados/excretados pelo ovo do parasito (SEA) são responsáveis pela indução da resposta Th2 nessa fase (PEARCE, *et al.*, 1991; STADECKER *et al.*, 1998; PEARCE & MACDONALD, 2002; MAIZELS & YAZDANBAKHSH, 2003; PEARCE, *et al.*, 2004). A produção de IL-4 é considerada fator crucial para o desenvolvimento da resposta do tipo-2 (HSIH *et al.*, 1992; KOPF *et al.*, 1993; SWAIN *et al.*, 1990) e, juntamente com IL-10, também está envolvida no controle da resposta Th1 predominante na fase inicial da infecção por *S. mansoni* (PEARCE & MACDONALD, 2002; HESSE *et al.*, 2004).

A produção de citocinas do tipo-2 é fundamental para o desenvolvimento da reação celular, denominada de granuloma, que envolve os ovos de *S. mansoni* retidos nos tecidos do hospedeiro. Os granulomas são estruturas compactas e organizadas, compostos por células migrantes, especialmente macrófagos, eosinófilos, linfócitos T-CD4⁺, que juntamente com células dos órgãos afetados, dispõem-se em meio a componentes de uma matriz extracelular heterôgenea, formando uma estrutura esférica que se organiza ao redor do ovo do parasito (BOROS & WARREN, 1970; LENZI, 1991 LENZI *et al.*, 2008). A formação do granuloma envolve interações dinâmicas e intrincadas entre célula-célula e célula-matriz, que sofrem profundas modificações no decorrer da infecção. Na fase inicial denominada fase pré-granulomatosa, as células migrantes, predominantemente macrófagos, linfócitos e eosinófilos começam a arranjar-se desordenadamente na proximidade dos ovos, formando agregados

celulares. Na fase madura do granuloma, chamada exudativa-produtiva, existe uma grande riqueza celular, compreendendo células migrantes e locais (fibroblastos e miofibroblastos) dispostas de maneira mais organizada, caracterizada por 3 camadas distintas: central (com predomínio de macrófagos) a camada medial (com fibras arranjadas concêntrica) e a camada periférica (com riqueza celular e fibras reticulares frouxamente dispostas) (WEINSTOCK & BOROS, 1983; LENZI *et al.*, 1998; LENZI *et al.*, 2008 b). Nessa fase, por volta de 8 semanas após a infecção, a resposta Th2 se torna altamente polarizada e bem estabelecida (CHEEVER *et al.*, 2000; PEARCE *et al.*, 2004; STADECKER *et al.*, 2004). A produção local aumentada de IL-4 e IL-13 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumenta a expressão de MHC-II e CD23 em monócitos/macrófagos e células B (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1993), auxiliando na amplificação da resposta Th2 e na infiltração de outros tipos celulares. Os macrófagos presentes no granuloma se tornam alongados, freqüentemente fusiformes e se dispõem radialmente de forma concêntrica em torno do ovo, ficando justapostos uns aos outros, formando interdigitações entre membranas que favorecem o encontro entre eles. O citoplasma se torna abundante, e adquirem aspecto de células epitelióides. Simultaneamente, os macrófagos fundem-se uns aos outros originando células gigantes multinucleadas (PEREIRA & BOGLILO, 2000). Estudos recentes demonstram que macrófagos ativado na presença de citocinas do tipo 2 (macrófagos alternativamente ativado) em conjunto com os fibroblastos são os principais produtores de colágeno, o que caracteriza a fase produtiva fibrótica do granuloma (LENZI *et al.*, 1998 b; ANTHONY *et al.*, 2007).

Nas semanas subseqüentes, ocorre uma gradual regulação da função das células T CD4⁺ e da imunopatologia, num processo denominado imunomodulação. Os granulomas que se formam em torno do ovo tornam-se gradativamente menores (ANDRADE & WARREN 1964). A modulação do granuloma na fase crônica é geralmente acompanhada por uma

redução da produção de citocinas do tipo 2, sendo que células do baço de animais infectados na fase crônica quando re-estimuladas *in vitro* produzem um padrão misto de citocinas. O processo de modulação da resposta granulomatosa na fase crônica da esquistossomose tem sido associado com um prognóstico benigno da doença (PEARCE & MACDONALD, 2002). Desta forma, estudos que esclareçam os mecanismos envolvidos na formação e modulação do granuloma podem gerar novas estratégias de tratamento ou mesmo ferramentas que permitam identificar na população infectada alterações que indiquem um prognóstico maligno da esquistossomose.

2.5 Granuloma: Proteção versus Patologia

Para muitos autores, a formação do granuloma constitui um importante mecanismo de defesa do hospedeiro, pois é capaz de seqüestrar toxinas secretadas pelo ovo do parasito retido no tecido, protegendo-o da lesão hepática mais intensa e aguda. Por outro lado, o estabelecimento de uma resposta do tipo Th2 no curso da doença é de fundamental importância para prevenir um quadro agudo que pode ser letal, marcado pela predominância de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (MACDONALD *et al.*, 2002; PEARCE & MACDONALD, 2002). A importância deste mecanismo é demonstrada em vários estudos. Animais imunossuprimidos ou atímicos desenvolveram resposta granulomatosa diminuída ao redor do ovo de *S. mansoni*, composta principalmente por macrófagos imaturos, com presença de necrose liquefativa no fígado e no pulmão, com intensa destruição do parênquima tecidual, liberação de enzimas hepáticas e morte (AMSDEN *et al.*, 1980). Infecções em camundongos tolerizados contra antígenos de ovos do parasito não desenvolvem granuloma, mas apresentaram lesões hepáticas graves (FALLON & DUNNE, 1999; DUNNE & DOENHOFF, 1983). Algumas linhas de pesquisa independentes, têm associado a patologia da esquistossomose crônica com a persistência de um estado pró-inflamatório marcado pelo

aumento de citocinas tipo Th1 como IFN- γ , TNF- α , à deficiência de citocinas anti-inflamatórias Th2 como IL-4 e IL-10 (BRUNET *et al.*, 1997; HOFFMANN *et al.*, 2000; RUTITZKKY *et al.*, 2001), em células B (HERNANDEZ *et al.*, 1997) e em macrófagos alternativamente ativados (HERBERT *et al.*, 2004). Em camundongos geneticamente deficientes na produção de IL-4, ou em camundongos deficientes para IL-4 e IL-13, a infecção por *S. mansoni* resultou em aumento de mortalidade e morbidade dos animais, que foram atribuídas ao aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ , TNF- α e NO (BRUNET *et al.*, 1997; FALLON *et al.*, 2000; CHIARIMONTE *et al.*, 1999; JANKOVIC, *et al.*, 1999). Mais recentemente, trabalhos experimentais sugerem que o não estabelecimento de uma resposta de perfil 2 após a ovoposição pode resultar em uma exacerbada inflamação granulomatosa, mediada por Th17 e Th1, que pode provocar intensas e extensas injúrias no parênquima hepático, podendo resultar em morte do hospedeiro (STADECKER *et al.*, 2004).

O estabelecimento da resposta Th2 também é importante na eliminação dos ovos. A fim de atingirem o lúmen do intestino e serem conseqüentemente liberados pelas fezes, os ovos de *S. mansoni* também dependem do estabelecimento de uma reação granulomatosa, mediada por linfócitos T, para atravessar o endotélio, a membrana basal e o epitélio do intestino, onde são liberados (PEARCE & MACDONALD, 2002). A influência da resposta imune adquirida na excreção de ovos foi demonstrada tanto em humanos quanto em camundongos (DOENHOFF *et al.*, 1997). KARANJA *et al.*, (1997) demonstraram haver uma correlação entre reduzida excreção de ovos e a baixa contagem de linfócitos T CD4⁺ em pacientes portadores da imunodeficiência humana (HIV). Em modelos experimentais, os estudos realizados com camundongos deficientes em linfócitos T e B apresentaram excreção de ovos de *S. mansoni* nas fezes reduzida (AMIRI *et al.*, 1992; OZAKI *et al.*, 1997) ou retardada (CHEEVER, *et al.*, 1999). Conforme discutido, os ovos que não são eliminados nas fezes ficam retidos no intestino do hospedeiro ou, quando não deixam os vasos, são carregados pelo

fluxo sanguíneo e se acumulam principalmente no fígado, e o aumento da retenção de ovos nos tecidos é um dos fatores que podem determinar a evolução dos quadros graves da doença. Por isso, a inflamação intestinal, ao facilitar a eliminação dos ovos do parasito, também atua como um mecanismo de proteção do hospedeiro.

Apesar da importância da formação do granuloma para a proteção do hospedeiro contra injúrias maiores que o parasito poderia ocasionar aos tecidos, a resposta inflamatória formada ao redor dos ovos disseminados do parasito é fator determinante no desenvolvimento da patologia durante a fase crônica da esquistossomose. Citocinas produzidas por células Th2, como IL-13, podem ser responsáveis por mediar certos aspectos da patologia associada à esquistossomose crônica (WYNN & CHEEVER, 1995), como progressão da fibrose hepática e a hepatoesplenomegalia (CHEEVER *et al.*, 1987; HOFFMANN *et al.*, 1998; De JESUS *et al.*, 2004). Conforme discutido anteriormente, IL-13 produzida durante a evolução do granuloma estimula macrófagos a produzir colágeno, importante para a contenção dos

antígenos de ovo e para a remodelação tecidual (WYNN, 2004) e conseqüentemente ser responsável pelo desenvolvimento da fibrose hepática, hipertensão portal, e formas graves da doença. Experimentos realizados em camundongos deficientes para IL-13 demonstraram que estes não desenvolveram fibrose intensa que normalmente ocorre durante a infecção por *S. mansoni*, resultando em maior sobrevivência do hospedeiro (FALLON *et al.*, 2000). Recentemente, a ativação via IL-21/IL-21R foi relacionada com a promoção da fibrose na esquistossomose por induzir o desenvolvimento de células Th2 (PESCE *et al.*, 2006) e aumentar a expressão de receptores de IL-4 e IL-13 nos macrófagos, contribuindo com a ativação alternativa e conseqüentemente com o processo de fibrose (HESSE *et al.*, 2001).

Apesar de na fase crônica da infecção a resposta a novos ovos depositados ser diminuída, as lesões teciduais são acumulativas, sendo determinadas pela habilidade do hospedeiro de controlar o número de vermes adultos, de inibir a fecundidade dos mesmos e,

finalmente, de destruir os ovos retidos e reparar as lesões teciduais sem gerar acúmulo exacerbado de colágeno (CHEEVER *et al.*, 2002). Portanto, a indução de uma resposta Th2 intensa e/ou prolongada e não modulada pelo hospedeiro pode ter conseqüências patológicas graves para o hospedeiro infectado por *S. mansoni*, especialmente durante a fase crônica da infecção.

Neste sentido, estudos realizados em humanos e em modelos experimentais têm demonstrado que citocinas são importantes componentes na formação e na modulação da resposta granulomatosa contra antígenos do parasito (CALDAS *et al.*, 2008; MONTENEGRO, *et al.*, 1999), podendo ser determinantes na evolução da esquistossomose grave.

2.6 Papel das citocinas na formação e modulação do granuloma

A importância das citocinas Th2 foi experimentalmente demonstrada pela grande redução no tamanho do granuloma em camundongos geneticamente deficientes em Stat 6 (sinal transdutor e ativador de transcrição 6), essencial para o desenvolvimento da resposta Th-2, e em animais tratados com anti-IL-4 (KAPLAN *et al.*, 1998) e infectados por *S. mansoni*. Em contraste, a infecção por *S. mansoni* em camundongos geneticamente deficientes em Stat 4 (sinal transdutor e ativador de transcrição 4), fator intracelular indispensável para desencadear a resposta Th-1, não reduz o tamanho do granuloma (MACKENZIE *et al.*, 1999). Na formação do granuloma, a principal fonte de IL-4 são células T CD4⁺ diferenciadas em Th2 que são ativadas e recrutadas para o fígado e intestino, principais locais de deposição de ovos do parasito. Entretanto, a ativação e diferenciação das células Th2 dependem da presença de IL-4 e a origem inicial da citocina necessária para induzir o desenvolvimento da resposta Th2 não está claramente estabelecida. Trabalhos experimentais têm mostrado que o reconhecimento de lipídios e carboidratos derivados do

parasito por células do sistema inato é determinante na indução da resposta Th2 na esquistossomose (PEARCE *et al.*, 2004; THOMAS, *et al.*, 2003; PERONA-WRIGHT *et al.*, 2006), especialmente lacto-N-fucopentaose III (LNFPIII) encontrado em glicoproteínas do SEA (OKANO *et al.*, 1999, 2001; THOMAS *et al.*, 2003). Receptores de lectinas do tipo C (VAN DIE *et al.*, 2003) e receptores do tipo Toll, como TLR-2 e TLR-4 (VAN DER KLEIJ *et al.*, 2002; GOODBRIDGE *et al.*, 2004), expressos na superfície de células dendríticas (DCs) ou outras células do sistema inato podem estar envolvidas no reconhecimento destes glicoconjugados e lipídeos secretados pelo ovo do parasito. O reconhecimento de padrões moleculares destes antígenos pelas DCs induz um processo alternativo de maturação e ativação destas células, que resulta na ausência de produção de IL-12 (MACDONALD *et al.*, 2001; PERONA-WRIGHT *et al.*, 2006). As células dendríticas que foram ativadas por antígenos de helmintos seriam APCs determinantes no processo de diferenciação de linfócitos Th2.

Outras células não linfocitárias, como eosinófilos e mastócitos, também podem ter um papel crucial na diferenciação da resposta Th2 na esquistossomose. Há relatos de que uma glicoproteína que compõe o SEA, a IPSE (*IL-4 inducing principal S. mansoni eggs*), possa estimular a secreção de IL-4 por basófilos humanos (SCHARAMM *et al.*, 2003). Uma segunda proteína homóloga a proteína de mamíferos, TCTP (*translationally controlled tumor protein*), também ativa a liberação de histamina por basófilos, sugerindo uma ativação direta deste tipo celular que também é capaz de produzir IL-4 (RAO *et al.*, 2002). Trabalhos realizados por SABIN *et al* (1995,1996) sugerem que antígenos do ovo de *S. mansoni* podem também estimular eosinófilos a produzir IL-4, sendo esta uma das principais fontes da citocina no início da infecção. Finalmente, alguns autores (COFFMAN, 1997) sugerem que durante a ativação do linfócito pode haver produção de IL-4 autócrina que seria determinante para a diferenciação desta célula em Th2.

Conforme discutido anteriormente, a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ do tipo 2 e migração para o tecido é essencial para o desenvolvimento da reação granulomatosa, que envolve os ovos de *S. mansoni*. As células teciduais juntamente com células Th2 que migraram para o local de deposição do ovo do parasito produzem citocinas e quimionas que irão promover infiltração, expansão e ativação de outras populações celulares, que determinam a formação e modulação do granuloma. Células do fígado (ou do endotélio) de animais infectados com *S. mansoni* expressam níveis aumentados de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1), direcionando células para o local da inflamação (AMIRI *et al.*, 1992). O aumento de expressão de ICAM-1 pode ser regulado por TNF- α , citocina que é induzida durante a infecção por *S. mansoni* em modelos experimentais quanto em humanos (AMIRI, *et al.*, 1992; HASSEB *et al.*, 2001), especialmente durante a maturação e ovoposição do verme (HASSEB *et al.*, 2001). Trabalhos experimentais mostram que macrófagos produzem TNF- α quando estimulados com SEA, e a neutralização desta citocina resultou na redução do tamanho do granuloma hepático em camundongos infectados com *S. mansoni* (JOSEPH & BOROS, 1993; LUKACS *et al.*, 1994), confirmando seu papel no recrutamento das células durante a formação do granuloma ao redor do ovo (AMIRI *et al.*, 1992; JOSEPH & BOROS, 1993; CHEEVER *et al.*, 1999; BRUNET *et al.*, 1997; BOGLIOLO, 2000).

Na presença de citocinas Th2, macrófagos são ativados de maneira alternativa em comparação à ativação clássica em um ambiente de citocinas Th1. Originalmente descritos como macrófagos ativados por IL-4 como oposição à clássica combinação de IFN- γ e LPS, macrófagos alternativamente ativados (AAM), são também referidos como células M2, (MARTINEZ, *et al.*, 2008). Podem ser distinguidos pela alta expressão de arginase-1 (ARG1), IL-4 receptor α (IL-4R α), receptor de manose (CD206) e a ausência da expressão de óxido nítrico sintetase induzida iNOS (ANTHONY *et al.*, 2007). Elevados níveis de IL-4 e IL-13 e IL-21 (PESCE *et al.*, 2006) reprimem a síntese de iNOS *in vitro* em populações de

macrófagos e estimulam a expressão de ARG1 e de duas novas proteínas YM1 (*closely related soluble chitinase-like lectins*), que é uma fator quimiotático para eosinófilos (FALCONE *et al.*, 2001) e FIZZ1 (*resistin-like secreted protein*) que podem estar envolvidas com a imunidade anti-helmíntica, já que atuam na degradação de quitina presente em larvas e ovos de helmintos (MAIZELS *et al.*, 2004; ANTHONY *et al.*, 2007). ARG-1 tem como substrato a L-arginina (substrato em comum com a iNOS) resultando em L-ornitina que é convertida em prolina pela ornitina-aminotransferase. Prolina é um aminoácido essencial envolvido na produção de colágeno e, por isso, no desenvolvimento de fibrose (PEARCE & MACDONALD, 2002; GORDON, 2003). Desta forma, AAM podem participar da reparação tecidual, resistência à infecção, na produção e deposição de colágeno no tecido (ANTHONY *et al.*, 2007).

Mais recentemente, têm sido identificadas novas subpopulações de células T que podem estar associadas à evolução do granuloma em modelos experimentais e, conseqüentemente, influenciam na gravidade da patologia causada por *S. mansoni* nestes animais. Populações de células T que produzem citocinas da família IL-17, denominadas de Th17, possuem características pró-inflamatórias podendo participar da evolução de doenças inflamatórias crônicas e doenças auto-imunes (CUA *et al.*, 2003). Recentemente foi demonstrado que a diferenciação de células T virgens em Th17 é induzida na presença de IL-23, TGF- β e IL-6, (LAURENCE & O' SHEA, 2007). Na esquistossomose, foi verificada produção elevada de IL-17 por células do granuloma e do linfonodo de camundongos infectados, especialmente em linhagem que desenvolve uma resposta imune mais intensa e uma patologia mais exacerbada (RUTITZKY & STADECKER, 2006). As células Th17 ativadas, além de produzir IL-17 A e IL-17 F, também produzem outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-6, IL-8 (KOLLS & LINDEN, 2004), mas não IFN- γ . A possível participação de Th17 no agravamento da patologia hepática provocada pelo

granuloma de *S. mansoni* foi sugerida pela observação de que animais tratados com anticorpos neutralizantes anti-IL-17 apresentaram uma inibição da inflamação granulomatosa hepática e conseqüente melhora na patologia. Um possível mecanismo pelo qual células Th17 possam agravar a patologia é através do recrutamento de granulócitos, os quais no caso da esquistossomose podem incluir os eosinófilos (RUTITZKY & STADECKER, 2006). O papel da resposta Th17 na esquistossomose humana ainda não foi esclarecido.

Níveis de IL-10 aumentam com a progressão da esquistossomose e acredita-se que esta citocina anti-inflamatória exerça importante função no desenvolvimento do granuloma periovular na esquistossomose. Há evidências de que a produção de IL-10 durante a fase aguda da esquistossomose atue, juntamente com IL-4, na polarização da resposta do tipo 2, agindo na modulação da resposta do tipo 1, que está aumentada durante o desenvolvimento dos vermes. IL-10 regula a resposta imune por alguns mecanismos distintos, como inibição da expressão de moléculas co-estimulatórias, como MHC classe II, em macrófagos e células dendríticas e inibindo a produção de citocinas como IL-12, TNF- α , IFN- γ e diminuição da reatividade celular antígeno-específica (FIORENTINO, *et al.*, 1991; DE WALL MALEFYT *et al.*, 1991). Com o intuito de caracterizar melhor o papel de IL-10 durante a infecção por *S. mansoni*, camundongos geneticamente deficientes de IL-10 foram infectados, sendo verificado o desenvolvimento de uma resposta imunológica não polarizada, com co-dominância entre Th1 e Th2 e elevada produção de citocinas, que resultou em aumento da morbidade da doença (HOFFMAN *et al.*, 2000). Consistentemente, estudos realizados em animais duplamente deficientes demonstraram que, na ausência tanto de IL-10 quanto de IL-4, a infecção por *S. mansoni* induz uma resposta Th1 polarizada, que resulta em aumento da hepatotoxicidade que é letal ainda durante a fase aguda (HOFFMANN *et al.*, 2000). Por outro lado, em camundongos duplamente deficientes em IL-10 e IL-12, a infecção por *S. mansoni* induziu uma excessiva resposta do tipo Th2, com grande mortalidade na fase crônica da

doença (WYNN *et al.*, 1997; HOFFMANN *et al.*, 2000). Portanto, IL-10 não atua somente como um potente inibidor da expressão da resposta Th1, mas também da resposta Th2 que é predominante durante a fase crônica da infecção, prevenindo o desenvolvimento de patologias associadas a ambas excessivas respostas Th1 e Th2 (WYNN *et al.*, 1997; MONTENEGRO *et al.*, 1999; PEARCE & MACDONALD, 2002).

Apesar de IL-10 ter sido inicialmente considerada citocina Th2, trabalhos recentes indicam que IL-10 é principalmente produzida por sub-populações de células T designadas de regulatórias, Treg, (HESSE *et al.*, 2004). Foi demonstrado que IL-10 pode ter origem de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ de ocorrência natural, mas também de células T ativadas na presença de IL-10 produzidas por células do sistema imune inato (HESSE *et al.*, 2004; MAILZELS *et al.*, 2004). Na esquistossomose já foi demonstrado que a fração lipídica presente em alguns componentes liberados do verme e do ovo de *S. mansoni*, como lysofosfatidilserine, (lyso-PS) são reconhecidos por células dendríticas, que uma vez ativadas, induzem a diferenciação de células T regulatórias (MCGUIRK *et al.*, 2002; MAHNKE *et al.*, 2003). Trabalhos recentes sugerem que células Treg também podem funcionar através de um mecanismo independente de IL-10, ainda não elucidado (TAYLOR *et al.*, 2006).

Outros mecanismos imunomoduladores também podem participar da modulação do granuloma na fase crônica. Na esquistossomose, o receptor IL-13R α 2 solúvel é um inibidor efetivo de IL-13, atuando na modulação da deposição de colágeno durante a esquistossomose (CHIARIMONT *et al.*, 2003; HESSE *et al.*, 2004; WYNN, 2004). O receptor solúvel IL-13R α 2 atua seqüestrando IL-13 antes da sua ligação com o seu receptor expresso na superfície celular de células que compõem o granuloma (como macrófagos), diminuindo a ativação destas células, que no caso de macrófagos resultará em menor produção de colágeno. Como a própria IL-13 induz a expressão de seu receptor, um mecanismo de *feedback* parece atuar

dentro dos limites da resposta Th2 para regular potenciais danos relacionados com o processo de fibrose.

Outros eventos têm sido propostos para explicar a modulação que ocorre na infecção crônica, envolvendo a participação de células B (JANKOVIC *et al.*, 1998; MACDONALD *et al.*, 2002), células T CD8+ (PEDRAS-VASCONCELOS & PEARCE 1996), anticorpos anti-idiotipos (MONTESANO *et al.*, 2002) e eventos apoptóticos (RUTITZKY *et al.*, 2003). Nessa fase, a gravidade da doença tem sido associada ao processo imunopatológico que leva ao desenvolvimento de fibrose em consequência de um processo de reação granulomatosa contra ovos do parasito embolizados em vasos do fígado (BOGLIOLO, 1958; RASO & NEVES, 1965).

O desenvolvimento da resposta imunológica induzida pela infecção por *S. mansoni*, bem como os mecanismos de imunorregulação discutidos até o momento, foram amplamente baseados em dados obtidos com infecções experimentais realizadas principalmente em camundongos. Embora exista uma variabilidade de perfis de resposta imune em humanos, uma resposta mista Th1 e Th2, com uma predominância de citocinas Th1 são observadas geralmente em pacientes na fase aguda (MONTENEGRO, *et al.*, 1999; ABATH *et al.*, 2006; CALDAS *et al.*, 2008). Em contraste, indivíduos com a forma crônica assintomática apresentam perfil misto de resposta contra SEA e SWAP, tanto Th1 quanto Th2 (CORRÊA- OLIVEIRA *et al.*, 1998; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2008), com ligeiro predomínio de perfil Th2 (ARAÚJO *et al.*, 2004; PEARCE & MACDONALD, 2002). Sugerindo que a resposta do tipo 2 em humanos possa ser protetora ao hospedeiro (ARAÚJO *et al.*, 1996; BRUNET *et al.*, 1997). Semelhante ao verificado em camundongos, em pacientes com esquistossomose crônica assintomática foi verificado aumento da produção de IL-10 por células mononucleadas do sangue periférico, sendo esta citocina associada com a

regulação da resposta imune e controle da morbidade nesses pacientes (ARAÚJO *et al.*, 1996; MALAQUIAS *et al.*, 1997; MONTENEGRO *et al.*, 1999).

No entanto, o perfil de citocinas em pacientes com hepatoesplenomegalia é muito variável (ABATH *et al.*, 2006). Alguns estudos mostram que pacientes com hepatoesplenomegalia apresentam proeminente resposta Th2 em resposta a SEA e a antígenos solúveis de verme adulto, SWAP (MONTENEGRO *et al.*, 1999; SILVERIA *et al.*, 2004). Entretanto, apesar de estudos de infecções experimentais que associam a resposta Th2 com o desenvolvimento de fibrose (PEARCE & MACDONALD, 2002; PEARCE *et al.*, 2004), em humanos há estudos mostrando que a doença grave na fase crônica pode ser caracterizada por um predomínio de citocinas de perfil Th1 (BAHIA-OLIVEIRA, 1992; MWATHA *et al.*, 1998; ABATH *et al.*, 2006; BOOTH *et al.*, 2004). Por exemplo, constatou-se uma marcada produção de IFN- γ , mas não de IL-4 e IL-5 na estimulação de células de pacientes com doença grave (MONTENEGRO, 1999). O aumento do nível de TNF- α também foi associado à hepatoesplenomegalia (ZWINGERBERGER, 1990) e à fibrose (BOOTH *et al.*, 2004) em pacientes infectados por *S. mansoni*. Embora existam evidências experimentais do papel da IL-13 (DE JESUS *et al.*, 2004) na progressão da fibrose hepática e de IL-17 (RUTITZKY & STADECKER, 2006) na intensificação da inflamação do granuloma durante a infecção por *S. mansoni*, ainda não está claro a participação destas citocinas na evolução das formas graves da esquistossomose em humanos (ABATH *et al.*, 2006; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2008).

2.7 Mecanismos de fibrose

A fibrose crônica de qualquer natureza tem em comum um fator irritante e persistente que sustenta a produção de fatores de crescimento, enzimas proteolíticas, fatores angiogênicos e citocinas fibrogênicas que estimulam a deposição de elementos conectivos teciduais que

progressivamente remodelam a arquitetura tecidual normal (WYNN, 2007). A intensidade e extensão da fibrose hepática são elementos associados à gravidade da esquistossomose crônica, sendo que a deposição de colágeno no tecido é induzida durante a formação do granuloma ao redor do ovo do parasito (BOGLIOLO, 1958; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2008). Na gênese da patologia associada à esquistossomose mansoni, a formação do granuloma hepático e a fibrose hepática periportal apresentam-se como principais componentes da morbidade. Dessa forma, as diferentes células que compõem o granuloma periovular e as citocinas produzidas neste ambiente são elementos determinantes na produção de colágeno, sendo que IL-4, IL-5 e IL-13 podem ser consideradas as mais importantes citocinas pró-fibróticas (DE JESUS *et al.*, 2004).

Tem sido demonstrado que eosinófilos podem ter um papel importante na reparação, remodelação e no desenvolvimento de fibrose tecidual pós-inflamatória em diferentes patologias, pois proteases e citocinas secretadas durante a degranulação de eosinófilos teciduais são associadas a algumas síndromes fibróticas. Tem sido bem documentado, que no sítio inflamatório, os eosinófilos ativados são fontes importantes de citocinas fibrogênicas, como TGF- β e IL-13 potentes mediadores pró-fibróticos e que em cultura estimulam a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (NOGUCHI *et al.*, 1992; SILVEIRA-LEMOS *et al.*, 2008; LEVI-SCHAFFER *et al.*, 2004). A diferenciação, ativação e o recrutamento de eosinófilos para o sítio inflamatório são processos altamente dependentes da produção de IL-5 (SHER *et al.*, 1990). Especificamente na esquistossomose, animais geneticamente deficientes na produção de IL-5 não apresentaram diferenças no estabelecimento da infecção, porém o tamanho médio dos granulomas nesses camundongos foi significativamente reduzido, tanto na fase aguda como na fase crônica. Resultando em fibrose hepática atenuada em comparação com animais infectados não deficientes,

provavelmente refletindo a ausência de eosinófilos na reação periovular (REIMAN *et al.*, 2006).

Estudos têm indicado que macrófagos e fibroblastos são as principais células efetoras envolvidas na patogênese da fibrose. Apesar de as células T CD4⁺ serem essenciais neste processo, a sua principal contribuição pode ser o controle, ativação e recrutamento destas células (HESSE *et al.*, 2000). Similar a IL-4, a produção de IL-13 aumenta no granuloma, auxiliando na amplificação da resposta Th2 e na infiltração de outros tipos celulares. A produção de IL-13 também está envolvida na evolução da resposta granulomatosa, apesar de estudos recentes revelarem que esta citocina não é essencial para o estabelecimento da resposta Th2 (FALLON *et al.*, 2000; CHIARIMONTE *et al.*, 1999). Entretanto, outros estudos têm demonstrado que IL-13 é o principal mediador da fibrose (CHIARAMONTE *et al.*, 1999, 2001, 2003; WYNN, 2004). A IL-13 através da indução da produção de prolina por macrófagos e fibroblastos, substância envolvida na síntese de colágeno, está diretamente relacionada ao desenvolvimento da fibrose na esquistossomose (CHIARIMONT *et al.*, 1999; HESSE *et al.*, 2001). A deposição de ovos no fígado promove o desenvolvimento da resposta Th2, a qual estimula o aumento do número de AAM nos granulomas. Estudos utilizando camundongos *knockout* confirmaram que a expressão de ARG1 está associada com atividades de IL-4, IL-13 e STAT-6 (HESSE *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 2007) e no desenvolvimento de uma resposta Th2 (HERBERT *et al.*, 2004). Além disso, a infecção por *S. mansoni* nesses animais induziu uma resposta do tipo Th1 com níveis aumentados de iNOS, os quais foram associados com a formação de granulomas menores mas com alta mortalidade do hospedeiro (HERBERT *et al.*, 2004). Evidenciando uma forte ligação entre atividade de ARG-1 e o desenvolvimento de fibrose na esquistossomose e a existência de uma função parácrina de AAM na estimulação da síntese colágeno por fibroblastos. Fibroblastos também expressam altos níveis de ARG-1 quando estimulados por citocinas do tipo 2 (WITTE *et al.*, 2002;

WYNN, 2004). Adicionalmente, AMIRI *et al.*, (1992) relata que TNF- α pode estar também envolvida no processo de formação da fibrose através do recrutamento e estimulação de fibroblastos.

Portanto, os macrófagos podem desempenhar um papel duplo durante a infecção por *S. mansoni*: como uma célula inflamatória inicial, participa no seqüestro de antígenos do ovo e na formação e desenvolvimento do granuloma; e mais tarde, adota um papel anti-inflamatório durante a infecção crônica, suprimindo indiretamente a função de outras células, diminuindo o tamanho do granuloma e a inflamação, tendo participação na reparação tecidual e no processo de fibrose (WILSON *et al.*, 2006). Por isso, citocinas que atuam diretamente nessas células podem ser importantes na regulação e formação do granuloma.

2.8 Macrophage Migration Inhibitory Factor: MIF

MIF foi uma das primeiras citocinas a ser descoberta, como um mediador solúvel, ou citocina, produzida por linfócitos ativados que inibiam a migração randômica de macrófagos *in vitro* (DAVID *et al.*, 1966; BLOOM & BENNETT, 1996). MIF é liberada sistemicamente pela glândula Pituitária e localmente por células como macrófagos, células T e eosinófilos (BERNHAGEN *et al.*, 1993; CALANDRA *et al.*, 1994; BACHER *et al.*, 1996; ROOSI *et al.*, 1998). Primeiramente as células T foram identificadas como principal fonte dessa citocina no sistema imunológico. No entanto, várias células como monócitos, macrófagos, células dendríticas, células B, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e basófilos também produzem e secretam MIF (LUE *et al.*, 2002). A produção de MIF foi detectada no timo, baço, linfonodos, sangue e medula óssea. Atualmente, foi demonstrado que uma grande variedade de células em diferentes tecidos também pode produzir MIF, entre elas: fibroblastos, células do parênquima de vários órgãos como pele (queratinócitos, glândulas sebáceas, folículos pilosos, e células endoteliais), fígado (produzida pelas células de *kupfer*, hepatócitos e células

endoteliais), cérebro (córtex, hipotálamo, cerebelo, células da glia), rim (células epiteliais, células endoteliais) entre outras (CALANDRA & ROGER *et al.*, 2003), geralmente a produção dessa citocina está associada a órgãos ricos em macrófagos locais (CALANDRA *et al.*, 1994). MIF também é expressa por células e tecidos do hospedeiro que estão em contato direto com o ambiente, tal como o pulmão (macrófagos e células epiteliais), trato gastrointestinal (células epiteliais no esôfago, estômago, intestino) e genito-urinário. Em vista da presença de MIF em células não associadas com o mecanismo de defesa do organismo, sugere-se que essa citocina possa ter função fisiológica (CALANDRA & ROGER, 2003).

Outra característica que indica uma função biológica relevante de MIF é o fato de essa citocina ter sido identificada nos mais diversos grupos de organismos, desde invertebrados até o homem. A proteína seqüenciada em diferentes espécies de mamíferos mostra uma homologia superior a 90%, entretanto, animais geneticamente deficientes na produção de MIF são saudáveis sem aparente deficiência (BOZZA *et al.*, 1999; CALANDRA & ROGER 2003). Diferentemente da maioria das citocinas, MIF já se encontra pré-formada e armazenada no interior de vesículas celulares, sendo prontamente secretada após o estímulo (CALANDRA & ROGER, 2003).

Acredita-se que a atuação de MIF sobre células alvo dependa da ligação desta citocina a algum receptor expresso na superfície celular de vários tipos celulares, resultando na transcrição de sinais intracelulares. MIF ativa sinais extracelulares regulados por Kinase1, ERK1/ERK2 membros da família de proteínas kinases (MAP-quinases) reguladas por mitógenos, que induzem proliferação celular e ativação de elementos pró-inflamatórios (LUE *et al.*, 2002). O receptor de MIF ainda não foi completamente caracterizado. Sabe-se que a proteína pode ligar-se ao domínio extracelular de CD74 (cadeia protéica invariável que compõe o complexo MHC de classe II). Entretanto, a proteína CD74, expressa na membrana celular, não possui um domínio citoplasmático capaz de transmitir sinal de ativação

intracelular, podendo representar apenas uma proteína de ancoragem da citocina à membrana celular (LENG *et al.* 2000). Recentemente, BERNHAGEN *et al.* (2007) descreveram que MIF liga-se com alta afinidade aos receptores de quimiocina CXCR2 e CXCR4, (receptores das quimiocinas CXCL1 a CXCL7 e CXCL12, respectivamente) formando um complexo com CD74 em algumas células. A ligação MIF/CXCR2/CD74 foi capaz de ativar células mononucleares, induzir a quimiotaxia destas células para o sítio de produção de MIF e mantê-las no local de produção da citocina, sendo que essa rota de ativação está envolvida na inflamação observada em modelos experimentais de arterosclerose. Tem sido demonstrado que MIF apresenta ao menos duas atividades enzimáticas ou catalíticas com atividades tautomerase e oxidoredutase (LUE *et al.*, 2002). A seqüência amino-terminal residual de prolina presente a estrutura de MIF é importante para a atividade catalítica. No entanto, ainda não está claro se uma atividade enzimática funcional de MIF é requerida para a realização de suas funções biológicas.

MIF atua como uma citocina pró-inflamatória promovendo a ativação do sistema inato, sendo que suas funções mais críticas giram, principalmente, em torno da ativação e regulação de macrófagos que além de alvo é uma importante fonte de MIF *in vivo* (CALANDRA *et al.*, 1994) e da resposta imunológica adaptativa, através da ativação de linfócitos T e B (BACHER *et al.*, 1996). Estudos evidenciam que MIF direta ou indiretamente promove a expressão ou produção de moléculas pró-inflamatórias, incluindo citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8 (CALANDRA *et al.*, 1994; CALANDRA *et al.*, 1995; BACHER 1997; DONNELLY *et al.*, 1997). Moléculas pró-inflamatórias como TNF- α e IFN- γ também induzem a produção de MIF por macrófagos. A estimulação de macrófagos com MIF também induz a secreção de TNF- α , sugerindo que essas duas citocinas possam agir juntas em *feedbacks* estimulatórios mútuos pró-inflamatórios (CALANDRA *et al.*, 1994). MIF também participa do desenvolvimento e nas fases efetoras da resposta adaptativa celular e humoral, incluindo DTH

(hipersensibilidade do tipo tardia) e a produção de anticorpos (BACHER *et al.*, 1997; BERNHAGEN *et al.*, 1996). Dados na literatura mostram que MIF está relacionada a atividades anti-apoptóticas (MITCHELL *et al.*, 2002) e participa da resposta contra bactérias (BOZZA *et al.*, 1999), bem como na patogênese de muitas doenças auto-imunes e inflamatórias (DENKIGER *et al.*, 2004) e no balanço Th1/Th2 durante o processo inflamatório (SABROE *et al.*, 2000).

Um fato interessante em relação à atividade de MIF é que esta citocina, em condições de alta concentração, pode ter efeito anti-inflamatório (KLEEMANN *et al.* 2000). Segundo esses autores, em concentrações plasmáticas elevadas, MIF pode ser endocitada por células do local e interagir intracelularmente com JAB1 (*JUN-activation domain-binding protein 1*). Essa associação MIF/JAB1 bloqueia a ativação do fator de transcrição que seria responsável pela ativação da expressão de genes com atividade pró-inflamatória (AP-1), resultando em modulação do processo, sugerindo seu papel no desenvolvimento e regulação da resposta inflamatória aguda e crônica.

Numerosos estudos indicam a participação de MIF em doenças atópicas. Pacientes asmáticos têm concentrações aumentadas de MIF em fluido do lavado broncoalveolar e soro (ROSSI *et al.*, 1998). Indução de RNAm dessa citocina tem sido observado em células Th2 ativadas (BACHER *et al.*, 1996) e eosinófilos possuem a proteína MIF pré-formada em seus grânulos citoplasmáticos, sendo secretada em grandes quantidades quando a célula é estimulada (ROSSI *et al.*, 1998). Alguns estudos demonstraram que a deficiência de MIF afeta patologias de perfil Th2, reduzindo a infiltração de eosinófilos, a secreção de muco e o aumento da hiperreatividade brônquica em modelos experimentais de asma e rinite alérgica (ROSSI *et al.*, 1998; MIZUE *et al.*, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2007; NAKAMURU *et al.*, 2005).

MIF também está envolvida na patogenia induzida por infecções parasitárias, como leishmaniose e malária, atuando na eliminação de parasitos intracelulares via indução de síntese de TNF- α . Especificamente, foi detectada produção de MIF por linfócitos de camundongos infectados com *Leishmania major*, sendo que a administração da proteína recombinante em animais infectados resulta em ativação de macrófagos e redução da gravidade ou morbidade da infecção (JUTTNER *et al.*, 1998). Também existe relato de que a fagocitose de eritrócitos infectados com *Plasmodium chabaudi* induz a liberação de MIF (MARTINEY, 2000), entretanto não fica esclarecida a importância funcional dessa citocina nesse modelo experimental.

Em algumas helmintoses, como na infecção experimental em camundongos por *Schistosoma japonicum* tem sido relatado uma ineficiência no controle de formas adultas do parasito na ausência de MIF, através da administração de anticorpos IgG anti-MIF (STAVITSKY *et al.*, 2003). Ficou também demonstrado que camundongos geneticamente deficientes na produção de MIF foram mais susceptíveis a *Taenia crassiceps* em comparação com camundongos não deficientes na produção da citocina (RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2003).

Em alguns helmintos, como *Brugia malayi*, *Wuchereria bancrofti*, *Onchocerca volvulus* (PASTRANA *et al.*, 1998), *Trichinella spiralis* (TAN *et al.*, 2001) e *Ancylostoma ceylanicum* (CHAO *et al.*, 2007), foram identificadas proteínas com grande homologia a MIF produzida por células de mamíferos. A secreção dessa proteína por helmintos pode auxiliar a polarização da resposta Th-2, modulando respostas inflamatórias do tipo 1. Infecções crônicas por helmintos são tipicamente associadas a uma resposta predominantemente com perfil Th2 nos quais macrófagos alternativamente são proeminentes. Ainda não está totalmente claro o papel de MIF homóloga, mas os trabalhos até o momento indicam a participação na polarização da resposta do tipo 2 (PRIETRO-LAFUENTE *et al.*, 2009).

Durante a infecção experimental em camundongos por *S. mansoni*, BOROS *et al.*, (1975) detectaram a produção de MIF por células do baço de animais infectados e re-estimulados *in vitro* por SEA. Os autores mostraram que a produção de MIF apresentou maior aumento após 8 semanas de infecção, seguido de progressivo decréscimo entre 12 – 16 semanas de infecção e atingindo níveis muito baixos na vigésima semana de infecção. Os autores também relatam que a produção de MIF por células do baço de animais infectados foi completamente suprimida em altas concentrações de SEA, sugerindo que neste modelo a intensidade do estímulo pode ser determinante. Esta citocina pode estar diretamente relacionada com a formação do granuloma hepático, pois estudos que compararam a composição do granuloma em animais infectados demonstraram que diferentemente do intestino que quase não apresentaram ou demonstraram pouca atividade de MIF, no fígado, a produção *in vitro* dessa citocina foi detectada sob estimulação com SEA (WEINSTOCK *et al.*, 1983).

Tais evidências apontam que essa citocina possa estar envolvida no desenvolvimento do processo inflamatório e da patologia que ocorre na infecção por *S. mansoni*. Porém, ainda não é claro o mecanismo de atuação e seus efeitos no desenvolvimento da infecção. Conforme anteriormente apresentado, MIF pode atuar na atração e ativação de macrófagos para o sítio inflamatório (FALCONE *et al.*, 2001; BERNHAGEN *et al.*, 2007; MAIZELS *et al.*, 2009), células que desempenham importantes funções na formação e evolução do granuloma esquistossomótico. Recentemente, MAGALHÃES *et al.*, (2008) demonstraram que camundongos geneticamente deficientes na produção de MIF apresentam uma grande deficiência na diferenciação e sobrevivência de eosinófilos, bem como na migração desse tipo celular para o granuloma esquistossomótico, resultando em granulomas de tamanho reduzido durante a fase aguda da infecção o que interferir no desenvolvimento da patologia durante a infecção por *S. mansoni*.

Apesar da provável importância de MIF no desenvolvimento da reação granulomatosa induzida pelo ovo de *S. mansoni*, e conseqüentemente na evolução da patologia associada a essa infecção, poucos estudos têm sido realizados com essa citocina. Assim, no presente trabalho, pretende-se utilizar animais geneticamente deficientes na produção de MIF para verificar experimentalmente o envolvimento desta citocina na evolução da esquistossomose em camundongos experimentalmente infectados.

3. JUSTIFICATIVA

A determinação da evolução dos quadros graves da esquistossomose humana é complexa e multi-fatorial, sendo que carga parasitária, exposição freqüente à re-infecções e a capacidade do hospedeiro de induzir e modular a reação celular ao redor dos ovos retidos nos tecidos são fatores fundamentais nesse processo. A citocina denominada de MIF (fator inibidor da migração de macrófagos) é produzida por muitos tipos de células e participa da indução e regulação da resposta imunológica induzida contra bactérias (BOZZA *et al.*, 1999), bem como na patogênese de doenças inflamatórias crônicas de caráter auto-imune (DENKIGER *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que a deficiência de MIF afeta patologias de perfil Th2, reduzindo a infiltração de eosinófilos no sítio de reação, diminuindo a produção de muco e hiperreatividade brônquica em modelos experimentais de asma e rinite alérgica (ROSSI *et al.*, 1998; MIZUE *et al.*, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2007; NAKAMURU *et al.*, 2005). Estudos (MIZUE *et al.*, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2009) demonstram que essa citocina atua diretamente na quimiotaxia e ativação de eosinófilos e macrófagos, dois tipos celulares de fundamental importância na formação do granuloma esquistossomótico. Apesar de ter sido constatado que células presentes no granuloma esquistossomótico produzem e secretam MIF durante a infecção por *S. mansoni*, e que sua ausência altera a composição celular do granuloma na fase aguda da infecção, seu papel na evolução e modulação do granuloma é praticamente desconhecido. Dessa forma, o presente estudo pretende avaliar a importância da produção de fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) na evolução da esquistossomose experimental, principalmente no desenvolvimento do granuloma tecidual.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Neste trabalho pretende-se avaliar a participação da produção do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) no desenvolvimento do granuloma e na evolução da esquistossomose em camundongos experimentalmente infectados.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar e comparar a curva de sobrevivência de camundongos Balb/c não deficientes (WT) e camundongos Balb/c geneticamente deficientes na produção de MIF (MIF^{-/-}) durante 14 semanas da infecção com *Schistosoma mansoni*;
- Quantificar o número de vermes recuperadas na perfusão de camundongos WT e MIF^{-/-} infectados com *Schistosoma mansoni*, na 8^a semana de infecção, representativa da fase aguda, e na 14^a semana de infecção, representativa da fase crônica da infecção;
- Quantificar o número de ovos recuperados no pulmão, baço, fígado, intestino e fezes de camundongos WT e MIF^{-/-} infectados com *Schistosoma mansoni*, na 8^a semana e na 14^a semana de infecção;
- Quantificar a resposta humoral através da análise dos níveis séricos de IgG1 e IgG2a parasito específicas e da quantificação de IgE total em camundongos WT e MIF^{-/-} infectados com *Schistosoma mansoni*, durante as fases aguda;

- Quantificar as citocinas (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α) produzidas no parênquima hepático de camundongos WT e MIF^{-/-} infectados com *Schistosoma mansoni*, na 8^a e na 14^a semanas de infecção;
- Quantificar a infiltração celular no fígado e no intestino de camundongos WT e MIF^{-/-} infectados com *Schistosoma mansoni*, na 8^a e na 14^a semanas de infecção;
- Analisar e quantificar as alterações histopatológicas hepáticas induzidas pela infecção com *Schistosoma mansoni* em camundongos WT e MIF^{-/-}, na 8^a semana de infecção e na 14^a semana de infecção.

5. METODOLOGIA

5.1 Animais experimentais e infecção

Para a realização deste experimento foram utilizados camundongos Balb/c não deficientes (WT) provenientes do CEBIO-ICB-UFMG e camundongos Balb/c geneticamente deficientes na produção de MIF (MIF^{-/-}), manipulados por BOZZA, *et al.* (1999) que foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira, colaborador neste projeto de pesquisa. Os animais são mantidos no biotério do laboratório de esquistossomose do Departamento de Parasitologia, ICB, UFMG.

Todos os animais utilizados para realização desse trabalho foram mantidos em gaiolas apropriadas e alimentados com ração granulada para camundongos (Labina, fabricado por Cargill Nutrição Animal Ltda, São Paulo, Brasil) e água potável *ad libitum*. Os procedimentos experimentais receberam aprovação do Comitê de Ética Animal (CETEA-UFMG) sob protocolo de número 158/08 (em anexo).

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

Para obtenção de antígenos solúveis (SEA) do parasito utilizados para estimulação celular, ovos de *S. mansoni* foram obtidos a partir do fígado dos camundongos após 45-50 dias da infecção por *S. mansoni*, rotineiramente utilizados no laboratório de Esquistossomose,

conforme metodologia inicialmente descrita por PELLEGRINO e KATZ (1968). Sucintamente, fígados de animais infectados foram coletados, picotados e homogeneizados em salina concentrada (1,7 % de NaCl) por 5 min, à temperatura ambiente. A seguir foi permitida a decantação do homogenato a 4°C por 1h, para decantação dos ovos e sedimentos maiores. O sobrenadante foi descartado e o procedimento foi repetido até a obtenção de um sobrenadante limpo. Então o precipitado contendo ovos foi retirado e utilizado para obtenção de SEA conforme descrito por DUNNE *et al.*, (1992). Para tanto, a solução salina 1,7% contendo ovos foi filtrada de modo seqüencial em membranas de porosidade 0,297 mm e 0,105 mm e o material recuperado foi centrifugado (200 x g por 5 min a 4°C) em vários tubos de polipropileno de 50 ml. A cada centrifugação o sobrenadante foi desprezado e os sedimentos reunidos gradativamente, com aspiração e descarte do muco presente da parte superior. Durante todo o processamento, os tubos foram mantidos em gelo para evitar eclosão de miracídios e, ao final, após certificar a limpeza do material, os ovos foram ressuspensos em 1 mL de PBS (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂ HPO₄.7H₂O 4,3mM, KH₂PO₄ 1,4 mM) e transferidos para um tubo de vidro acoplado a um homogeneizador tipo Virtiz[®]. Os ovos foram triturados por cerca de 40 min sob banho de gelo. A destruição completa dos ovos foi confirmada após um exame ao microscópio óptico. O homogenato foi então transferido para tubos de 1,5 ml e centrifugados a 3 000 x g por 1 h e o sobrenadante foi recolhido, filtrado em membrana esterilizante de 0,22 µm e as proteínas solúveis foram quantificadas através da técnica de LOWRY *et al.*, (1951), e então aliqüotadas e armazenadas a -20°C até ser usado para estimulação celular.

5.2 Delineamento experimental

Rotineiramente antes do início do experimento, todos os animais utilizados foram submetidos ao tratamento oral com 4 mg/Kg de Ivermectina (Laboratório Chemitec Agro –

Veterinária, São Paulo, Brasil) por sete dias consecutivos (KLEMENT *et al.*, 1996) e com 75 mg/Kg em dose única de Cestox[®] (MERCK). No 10º dia após o final do tratamento os camundongos fêmeas entre 6 a 8 semanas foram aleatoriamente separados nos diferentes grupos experimentais e infectados por *S. mansoni*, conforme descrito anteriormente.

Para a análise de parâmetros parasitológicos e curva de sobrevivência foram utilizados 30 camundongos WT e 30 camundongos MIF^{-/-} que foram infectados por *S. mansoni*. Os animais foram acompanhados durante 14 semanas e os eventuais casos de óbito foram anotados em cada grupo experimental. Para avaliação de parâmetros parasitológicos, 10 animais de cada grupo experimental (WT e MIF^{-/-}) foram sacrificados e necropsiados na fase aguda (8 semanas de infecção) e o restante na fase crônica (14 semanas de infecção). Conforme ilustrado na **figura 5**, que ilustra o Organograma Experimental 1, para cada animal foi quantificado o número de vermes recuperados do sistema circulatório após perfusão sanguínea, o número de ovos do parasito retidos nos tecidos, através da digestão de fígado, baço, pulmão e intestino, e o número de ovos eliminados nas fezes.

Outro grupo de animais foi utilizado para análise de parâmetros imunológicos e análise histopatológica, pois a perfusão e digestão de órgãos inviabilizam sua utilização para outros fins. Para estes experimentos foram utilizados 30 camundongos WT e 30 camundongos MIF^{-/-}, sendo que 10 animais de cada grupo foram mantidos não infectados, 10 foram sacrificados e necropsiados durante a fase aguda e 10 na fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Conforme ilustrado na **figura 6**, de cada animal foram recolhidas amostras de fígado e intestino para análise histopatológica, para quantificação de atividade enzimática de peroxidase de eosinófilo (EPO), mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglicosaminidase (NAG). Amostras do fígado de cada animal também foram recolhidas e congeladas para quantificação de hidroxiprolina e para quantificação de citocinas. O baço foi retirado para cultivo de células e o sobrenadante utilizado para quantificação de citocinas. De cada animal também foram

recolhidas fezes para quantificação dos ovos do parasito e o soro para avaliar a produção de anticorpos e avaliação da atividade enzimática hepática. Cada experimento foi repetido 2 ou 3 vezes, sendo que nos resultados estão especificados o número de animais utilizados.

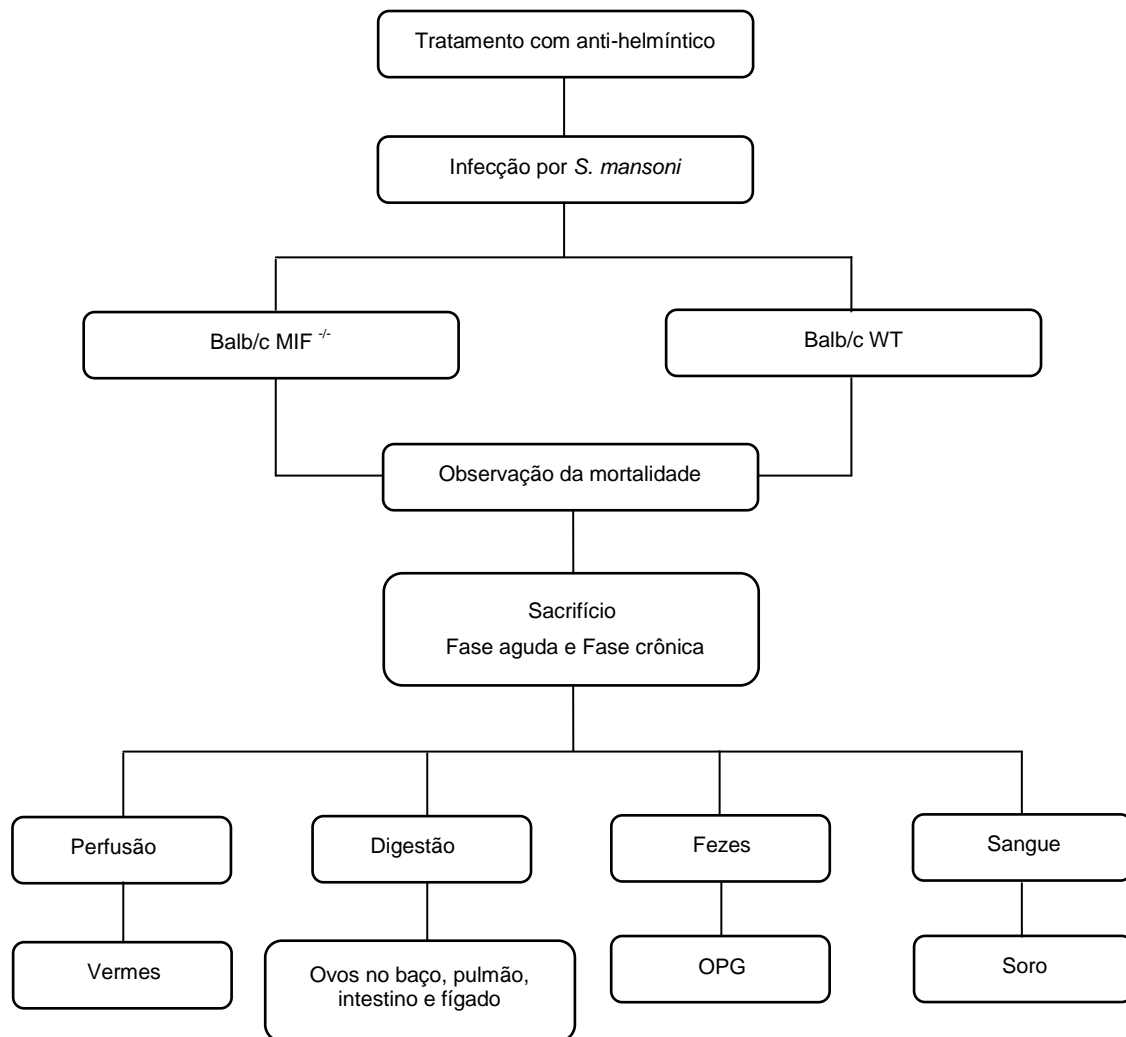


Figura 5. Organograma experimental 1.

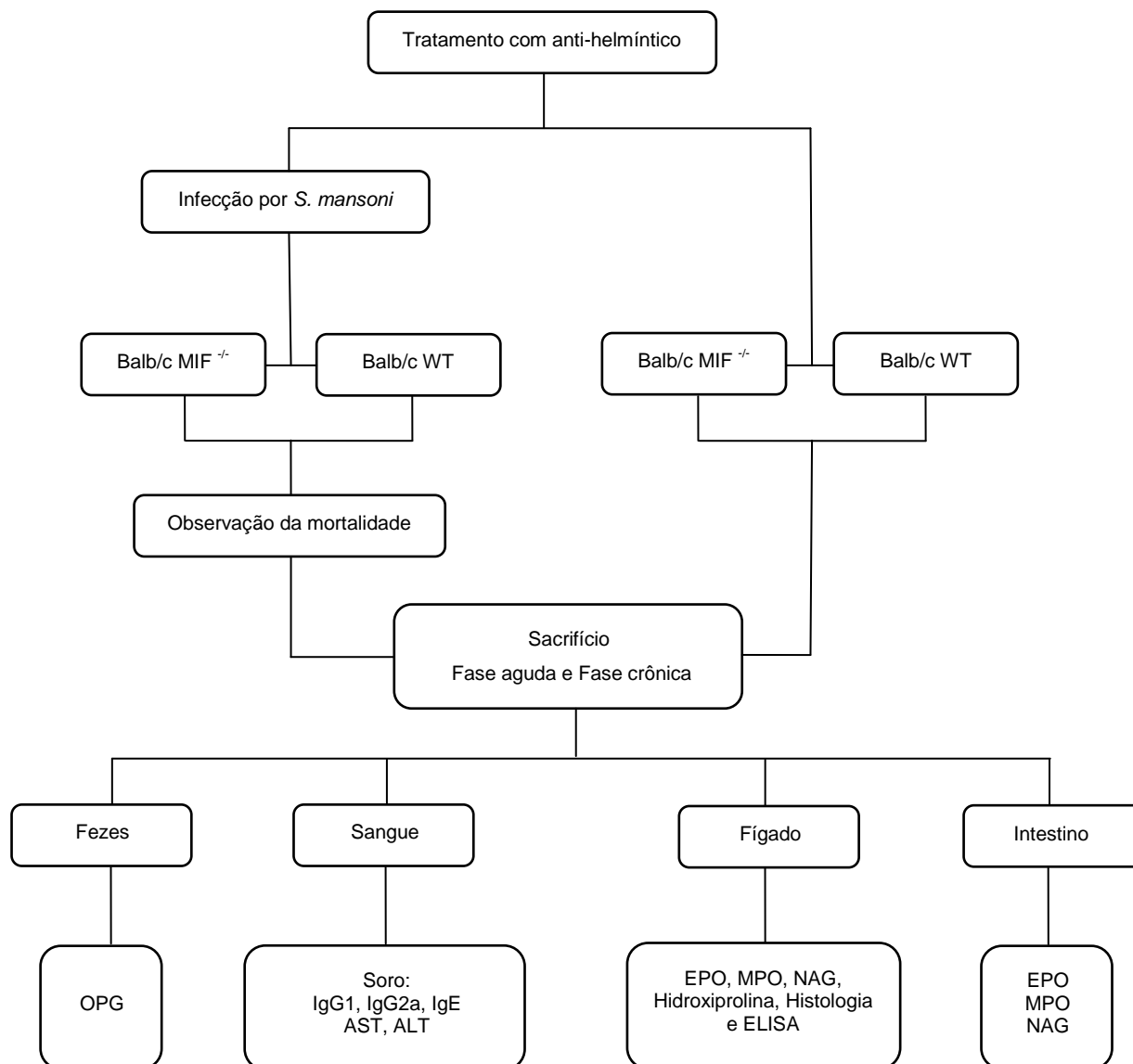


Figura 6. Organograma experimental 2.

5.3 Necropsia dos animais utilizados

Cada animal foi anestesiado intraperitonealmente com Ketamina/Xilazina (150 mg/Kg de Dopalen – Sespo Indústria e comércio Ltda, Jacareí - SP - Br + 10 mg/Kg de

Kensol – Laboratórios köing S.A. – Avellaneda - Argentina). Após estarem anestesiados, a coleta de sangue dos animais pelo plexo braquial foi realizada e, logo em seguida, foram sacrificados por deslocamento cervical e necropsiados para quantificação da carga parasitária e avaliação das alterações imunológicas e patológicas.

Para avaliação da carga parasitária os animais foram inicialmente submetidos à perfusão sanguínea. Este procedimento induz a destruição do arcabouço tecidual e impede que os tecidos de animais submetidos à perfusão sejam utilizados para a avaliação de parâmetros imunológicos e histopatológicos. Desta forma, grupos separados de animais foram utilizados para a avaliação de parâmetros parasitológicos e imunológicos e histopatológicos conforme detalhado anteriormente. Para confirmar a uniformidade das amostras quanto à infecção, a coleta de fezes e sangue foi realizada em todos os animais destinados a avaliação imunológica. Para a determinação do infiltrado celular, histologia e determinação do teor tecidual de hidroxiprolina, o fígado e o intestino foram divididos, sendo que a mesma secção de cada órgão foi empregada para o mesmo ensaio. O Intestino delgado destes animais foi removido através da secção do duodeno do animal na sua porção proximal e com uma segunda secção na sua porção distal, próxima ao ceco. O órgão foi então dividido em três partes iguais. A primeira porção foi destinada à realização do ensaio para a determinação de EPO e MPO, e a segunda e a terceira partes para dosagem de NAG e hidroxiprolina, respectivamente. De forma semelhante o fígado foi dividido, sendo que o lobo quadrado foi destinado à determinação da atividade de EPO, MPO e obtenção de citocinas *in situ*; o lobo direito para a determinação do teor hepático de hidroxiprolina, e lobo esquerdo dividido em duas partes, sendo uma destas partes destinada à realização do ensaio da atividade de NAG e a outra parte para a histologia.

5.4 Avaliação da Infecção

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

Os animais foram colocados em caixas individuais na noite anterior ao sacrifício (8 e 14 semanas após a infecção por *S. mansoni*). Pela manhã do dia seguinte, as fezes foram recolhidas, pesadas, homogeneizadas em formol tamponado 10% e mantidas nesta solução a 4°C até o dia de contagem. Para a contagem duas alíquotas de 100 µl da suspensão de fezes foram colocadas em lâminas de vidro e observadas por completo ao microscópio óptico. Todos os ovos presentes nas alíquotas foram contados e extrapolados para o número total de ovos na amostra. O número de ovos foi expresso por grama de fezes.

5.4.2 Recuperação de vermes do Sistema Porta

Os animais foram sacrificados e necropsiados e as vísceras expostas para a visualização do sistema porta. Após ligadura do reto, a veia porta foi então seccionada na região de fusão de seus aferentes mesentéricos. Uma agulha acoplada a uma bomba de perfusão (Automatic Pippeting Brewer Machine, modelo 60453, B.D.) foi introduzida na aorta torácica. Utilizou-se solução salina (0,85%) para perfusão da circulação sanguínea do animal, sendo que o líquido contendo os vermes que extravasam pela veia porta rompida de cada animal foi recolhido em um béquer individual. A perfusão foi repetida com a agulha introduzida no seio hepático. O material recolhido de cada animal foi decantado por 30 minutos. O sobrenadante foi então descartado, e o procedimento repetido várias vezes até que o sobrenadante se apresentasse completamente límpido. Os vermes presentes em cada frasco foram contados e diferenciados em machos, fêmeas e casais com o auxílio de uma lupa (PELLEGRINO & SIQUEIRA, 1956; VALADARES *et al.*, 1981).

5.4.3 Quantificação dos ovos retidos em tecidos do hospedeiro

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

5.5 Avaliação da resposta imunológica

Conforme detalhado no delineamento experimental, os animais que sofreram perfusão não puderam ser utilizados para análises imunológicas e histopatológicas. Para a confirmação da infecção dos animais destinados a avaliação imunológica e patológica, foi realizado exame de fezes como descrito anteriormente. Além disso, a observação macroscópica da presença de granulomas no fígado e intestino também foi realizada.

5.5.1 Obtenção do soro

Após a anestesia, o sangue foi retirado através do plexo braquial. O sangue recolhido permaneceu em temperatura ambiente até coagular e posteriormente foi mantido a 4 °C, por

cerca de 12 h, para retração do coágulo. Após a formação e retração do coágulo, o sangue foi centrifugado (1500 x g a 4 °C por 10 minutos) o soro retirado, aliquoteado e mantido a – 20 °C. Com o soro coletado dos animais nos dias de sacrifício foram realizados ensaios imunoenzimáticos (ELISA) para avaliar a presença de IgG1, IgG2a parasito específicas, IgE total e a avaliação da função hepática através da quantificação dos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT).

5.5.2 Dosagem de imunoglobulinas

Para medir a concentração de IgE total no soro dos animais infectados por *S. mansoni* e dos animais não infectados, foi utilizado um kit comercialmente disponível no mercado (Bethyl Laboratories Inc, Montgomery, TX). De acordo com as instruções do fabricante, placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nunc International, Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com anticorpo purificado anti-IgE de camundongo. Após bloqueio da placa com Tampão Tris NaCl (Tris 50 mM, NaCl 0,14M) contendo BSA 1%, as amostras de soro obtidas dos animais experimentais diluídas 1:200 e amostras com concentrações conhecidas de IgE purificada para curva padrão foram aplicadas à placa e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Após a aplicação das amostras e da curva padrão foi adicionado à placa o anticorpo de detecção (anti-IgE de camundongos, obtida de cabra, conjugada a HRP) e em seguida foi feita a aplicação do substrato (4mm OPD, contendo peróxido de hidrogênio em Tampão Citrato - ácido cítrico 34,7 mM, Na₂HPO₄ 66,7 mM pH 5). A reação foi interrompida com 4N H₂SO₄ e a leitura realizada em leitor de microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) no comprimento de 492 nm. A concentração de IgE nas amostras foi calculada pela interpolação do resultado da leitura de absorbância das amostras na curva padrão, a sensibilidade do teste é de aproximadamente 4 ng/mL.

A presença de IgG, ou seus subtipos IgG1 e IgG2a, reativas à antígeno solúvel do ovo de *S. mansoni* também foi estimada nos soros coletados dos animais experimentais. Utilizando-se placas de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nunc International, Rochester, NY, USA) sensibilizadas com 100 µL antígeno solúvel de SEA (10 µg/mL) diluído em tampão 0,1M de Carbonato-Bicarbonato (Na_2CO_3 0,5 M, NaHCO_3 0,5M, pH 9,6). Após a sensibilização da placa e entre cada etapa de incubação as placas foram lavadas 5 vezes com tampão fosfato (PBS – 13,7 mM de NaCl, 0,27 mM de KCl, 0,14 mM de KH_2SO_4 e 0,43 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) contendo 0,05 % de Tween₂₀. Posteriormente foi feito o bloqueio das placas com tampão fosfato contendo 1% de BSA por 1 h a temperatura ambiente seguido da aplicação das amostras de soro diluídas em PBS contendo Tween₂₀ (0,5%) acrescido de 0,1% BSA. Para detecção de IgG1, IgG2a as amostras de soro foram diluídas na proporção de 1:100. Após a aplicação do soro, adicionou-se o anticorpo de detecção anti-IgG1 (Goat anti Mouse IgG1 affinity purified, Bethyl, Lot. A90-105A-14), anti-IgG2a (Goat anti Mouse IgG2a affinity purified, Bethyl, Lot. A90-107A-18) diluídos em PBS na proporção de 1:1000 para IgG1 e IgG2a. Para detecção de IgG1 e IgG2a foi adicionado anticorpo anti-Ig de cabra conjugado à peroxidase (1:5000). A revelação da cor foi feita pela adição de substrato (4mM OPD, contendo peróxido de hidrogênio em 0,05 M Tampão Citrato pH 5) a reação foi interrompida após 30 min com 4N H_2SO_4 e a leitura realizada em leitor de micro-placas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) a 492 nm.

5.5.3 Quantificação de citocinas

As concentrações das citocinas IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α , foram estimadas em homogenato de fígado recuperados de camundongos infectados e não infectados de ambos os grupos experimentais.

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

A medida da concentração de citocinas no homogenato de fígado e no sobrenadante de cultura de baço foi realizada através da técnica de ELISA Sanduíche, utilizando kits comercialmente disponíveis para quantificar IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ , TNF- α de camundongos (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN), seguindo as instruções do fabricante. Conforme detalhado por NEGRÃO-CORRÊA, *et al.*, (2004), sensibilizou-se uma placa de 96 poços (Nunc Maxisorp, Nalgel Nunc International, Rochester, NY, USA) com 100 μ l/poço de PBS contendo concentração adequada do anticorpo de captura, anti-citocina de interesse. Esta solução permaneceu em contato com a placa *overnight* e, após este período, a placa foi lavada 3 vezes com PBS contendo 0,05% Tween 20. Logo em seguida, adicionou-se 200 μ l/poço de PBS contendo 1% de albumina de soro bovino- (BSA - Sigma) e incubou-se por 2h em temperatura ambiente. Após lavagem da placa, 100 μ l/ poço de PBS contendo a citocina recombinante de interesse em concentrações conhecidas e as amostras de sobrenadante de cultura ou homogenato de tecido, diluídas 1:3 em PBS contendo 0,1 % BSA foram adicionados à placa que permaneceu incubada *overnight*. Após novo ciclo de lavagem, adicionou-se à placa PBS contendo o anticorpo de detecção conjugado à biotina na concentração definida pelo fabricante e a placa foi incubada por 2 h em temperatura ambiente. Posteriormente, após a lavagem, foi adicionada à placa, 100 μ l/ poço de PBS/BSA 0,1%

contendo Streptoavidina conjugada à peroxidase (diluído 1: 2000). Após 30 min, a placa foi lavada e a reação revelada pela adição de tampão citrato contendo o substrato (4mM OPD, H₂O₂ em 0,05 M de tampão citrato, pH 5). A reação foi interrompida com H₂SO₄ 4N. O produto da oxidação do OPD foi então detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) no comprimento de onda 492nm. Para inferir a quantidade de citocinas presente na amostra, interpola-se o resultado da leitura de absorvância das amostras com a curva padrão gerada pela diluição seriada de quantidades conhecidas de citocinas. Sendo a sensibilidade do teste de IL-4, de IL-17 e TNF- α 15,62 pg/ml, dos testes de IL-5, IL-10 e IFN- γ a sensibilidade é de 31,25 pg/ml e do teste de IL-13, 62,5 pg/ml.

5.5.4 Infiltração celular no fígado e intestino

Amostras de fígado e intestino recuperadas de camundongos WT e MIF^{-/-} infectados e não infectados, com 8 e 14 semanas de infecção com *S. mansoni*, foram utilizadas para estimar indiretamente a infiltração/atividade de macrófagos, eosinófilos e neutrófilos através de atividade enzimática, detalhadamente descritos:

5.5.4.1 Determinação da atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG)

A atividade da enzima N-acetilglicosaminidase reflete o número de macrófagos que migram para um dado órgão (GREEN *et al*, 1980) e é amplamente utilizada para estimar a infiltração de macrófagos em amostras de tecidos. 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 esquerdo do fígado e a secção medial do intestino 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 3000 g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi então descartado e eventuais eritrócitos foram lisados pela adição de solução hipotônica 1,5 ml de NaCl 0,2% e após 30 segundos, a osmolaridade foi restabelecida pela adição de 1,5 ml de NaCl 1,6% + glicose 5%. As amostras foram mais uma vez centrifugadas (3000 x g a 4°C por 10 min) e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensão 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 300 x g e o sobrenadante utilizado para o ensaio enzimático que se procedeu como descrito a seguir: Adicionou-se um volume de 100 µl a uma placa de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA), em duplicata. Acrescentou-se o substrato (p-nitrofenil-N-acetil-β-glicosamina) diluído em tampão citrato/fosfato (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄ 0,1 M, pH 4,5) na concentração de 0,767 g/ml e a placa foi incubada a 37° C por 10 minutos. O produto final foi gerado pela adição de 100 µl de tampão glicina (Glicina 0,8 M, NaCl 0,8 M e NaOH 0,8 M pH 10,6). A absorbância foi quantificada em leitor de ELISA (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) em comprimento de onda igual a 400 nm.

5.5.4.2 Determinação da atividade de Peroxidase de Eosinófilos (EPO)

Este ensaio é conduzido como descrito por STRAH *et al.*, (1985) e detalhado em SILVEIRA *et al.*, (2002), como uma forma indireta de medir a eosinofilia tecidual induzida pelo parasito. Foram pesados 100 mg do lobo quadrado do fígado e da secção mais proximal de intestino, que foram processados em um homogeneizador de tecidos (Power General 125; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA), com a solução de extração de citocinas (0,5 % Tween 20; 0,5% BSA-Sigma; 0,1 mM de fluoreto de fenilmetilsufonila, 0,1mM de cloreto benzetônico, 10 mM de EDTA e 20 UI de aprotinina). O sobrenadante foi armazenado para dosagem de citocinas como detalhado anteriormente, e o *pellet* utilizado para quantificação de EPO e MPO. Eventuais eritrócitos foram lisados pela adição de 1,5 ml de salina 0,2% seguida de 1,5

ml de salina 1,6% + glicose 5% ao *pellet*. As amostras foram homogeneizadas e o homogenato dividido em 2 (uma parte para EPO e outra para o ensaio de MPO - que será descrito no próximo item).

As amostras destinadas a quantificação de EPO foram centrifugadas a 3000 x g a 4°C e o sobrenadante foi desprezado. O *pellet* foi re-suspenso em 950 µl de PBS contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB - Sigma). As amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas a 3000 x g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi utilizado no ensaio enzimático, que foi feito da seguinte maneira: 75 µl de cada amostra ou somente diluente (branco) foram adicionados a placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) juntamente com 75 µl da solução do substrato (tampão tris-HCL pH 8,0 contendo 1,5 mM o-fenilenodiamina-OPD e 6,6 mM de H₂O₂). Após o desenvolvimento de cor a reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 4N. A absorbância foi lida a 492 nm em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland).

5.4.3 Quantificação da Mieloperoxidase (MPO)

A quantificação de mieloperoxidase foi utilizada como medida indireta da infiltração e/ou ativação de neutrófilos no fígado e no intestino. O ensaio foi conduzido conforme descrito por BAILEY (1988) e detalhado por BARCELOS *et al.* (2005). O tecido foi processado como descrito anteriormente. As amostras destinadas ao ensaio de MPO, foram centrifugadas (3000 x g a 4°C por 10 min) o sobrenadante foi desprezado e a ressuspensão final do *pellet* foi feita em 200 µl de tampão fosfato (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 0,015 M NaEDTA, pH 4,7). A solução foi homogeneizada e centrifugada (3000 g por 10 minutos a 4°C). O *pellet* foi homogeneizado novamente em tampão (0,05 M NaPO₄ pH 5,4) acrescido de 0,5 % HTAB), seguido de três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido. Após tal procedimento, a solução foi centrifugada por 15 minutos a 3000 x g e a 4°C

e o sobrenadante utilizado para realização do método colorimétrico da seguinte maneira: 25 µL da amostra foram acrescentados a placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) contendo 25 µL de substrato (3,3' - 5,5' - tetramethylbenzine – TMB diluído em dimetilsulfóxido – DMSO na concentração final de 1,6 mM). Em seguida, foi feita a incubação a 37 °C por 5 min. Após esse período, foram adicionados 100µl da solução contendo H₂O₂ 0,5 mM diluído em tampão fosfato (0,05 M de Na₃PO₄, pH 5,4 contendo 0,5% de HTAB) após nova incubação a 37 °C por 5 min. A reação foi interrompida pela adição de 50 µl de H₂SO₄ 1M e quantificada através da absorbância em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland) em comprimento de onda 450nm.

5.5.5 Avaliação da patologia

5.5.5.1 Determinação do teor tecidual de Hidroxiprolina

Fragmentos de 100 mg de fígado e intestino 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 em salina (0,9% NaCl) e liofilizado. O ensaio foi conduzido com 20 mg do liofilizado, que foi submetido a hidrólise alcalina em 300 µl de salina (0,2% NaCl) mais 75 µl NaOH 10 M e autoclavadas a 120°C por 20 minutos. A uma alíquota de 50 µl do hidrolisado foram adicionados 450 µl do reagente oxidante de cloramina T (cloramina T 0,056 M, *n*-propanol 10% em tampão acetato/citrato pH 6,5) e incubou-se por 20 minutos para que a oxidação se processasse. Uma curva padrão com a maior concentração de 400 µg de hidroxiprolina foi preparada da mesma maneira. A reação colorimétrica foi iniciada pela adição do reagente de Ehrlich (*p*-dimetilaminobenzaldeído 1 M diluído em *n*-propanol/ácido perclórico 2:1 v/v). As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 1500 x g a 4°C. Uma alíquota de 200 µl do sobrenadante foi transferida para placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc.

USA) e foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda de 550 nm em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland).

5.5.5.2 Quantificação da atividade de AST e ALT

Para avaliação da atividade hepática, níveis de aspartato aminotransferase (AST) também chamada de transaminase glutâmico oxalacética (TGO) foram quantificados. Para tal, utilizou-se o teste colorimétrico da Bioclin seguindo as instruções do fabricante. Inicialmente preparou-se a curva de calibração com quantidades conhecidas da proteína. Para a determinação da atividade enzimática nas amostras, 50 µl do substrato (tampão Fosfato, 0,1 mmol/L pH 7,4, ácido L aspártico, 0,153 mol/L, ácido alfa cetoglutárico 2 mmol/L e azida sódica 7,7 mmol/L) foram adicionados a tubos de polipropileno de 2,0 ml e incubados a 37 °C por 3 minutos. Acrescentou-se 20 µl de soro foi homogeneizada e incubada a 37°C por 30 minutos. Logo em seguida 50µl do reagente de cor (2,4-dinitrofenilhidrazina 1,0 mM e ácido clorídrico 1,0 M) foram colocados na mistura que foi homogeneizada e deixada em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Passado este tempo acrescentou-se 500 µl de Hidróxido de sódio 0,4N, homogeneizou-se por inversão e a solução ficou em repouso por 5 minutos. A curva de calibração e as amostras (200 µl) foram transferidas para placas de 96 poços (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) e realizada a leitura da absorbância em comprimento de onda de 505 nm, em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland).

A quantificação dos níveis de alanina aminotransferase (ALT), ou alanina transaminase, também conhecida como transaminase glutâmico pirúvica (TGP) também foi realizada empregando-se o método de teste colorimétrico da Bioclin e seguindo-se as instruções do fabricante. Inicialmente preparou-se a curva de calibração com quantidades conhecidas da proteína. Para a determinação da atividade enzimática nas amostras, 50 µl do substrato de

ALT (tampão Fosfato, 0,1 mmol/L pH 7,4, L-alanina 0,2 mol/L, ácido alfa cetoglutárico 2 mmol/L e azida sódica 7,7 mmol/L), foram adicionados em tubos de 2,0 ml e incubados a 37 °C por 3 minutos. Transcorrido este tempo, 50 µl de soro foram adicionados aos tubos e incubou-se a 37 °C por 30 minutos. Após este período, acrescentou-se 50µl do reagente de cor (2,4-dinitrofenilhidrazina 1,0 mM e ácido clorídrico 1,0 M) e deixou-se em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Passado este tempo, acrescentou-se 500 µl de Hidróxido de sódio 0,4N à solução que permaneceu em repouso por 5 minutos. A curva de calibração e as amostras (200µl) foram transferidas para placas (Plate Flat Bottom – SARSTEDT, Inc. USA) e a leitura foi realizada em comprimento de onda de 505 nm em leitor para microplacas (Status-Labsystems Multiskan RC, Helsinki, Finland).

5.5.6 Histologia

Fragmnetos do lobo esquerdo de fígado de animais WT e MIF^{-/-} infectados por *S. mansoni* foi cuidadosamente retirada e lavada em solução salina 0.85%, pH 7.2 a 37°C e fixada em formalina tamponada. Todo o material fixado em formalina foi lavado por 3 h em água corrente, 48 horas após a fixação e então colocado em álcool 70%. Posteriormente, todo o material passou por uma desidratação progressiva em séries crescentes de álcool (70° GL a absoluto), clarificado em xilol e embebido em parafina. A seguir foram realizados cortes de 4µm de espessura, que foram desparafinados, hidratados e corados com Hematoxilina-eosina ou pela coloração de Tricômico de Masson. As lâminas preparadas de secções do fígado foram analisadas ao microscópio óptico para observação das lesões, o infiltrado inflamatório e a deposição de colágeno.

5.5.7 Análise Estatística

Foi realizada análise de dispersão de dados para verificar a adequabilidade do uso de um teste paramétrico. Os dados foram analisados no programa Prisma 4.0 por meio da análise de variância (ANOVA one way) seguida pelo teste de Newman-Keuls, que realiza a comparação entre todos os grupos entre si. Os resultados foram expressos como média e erro padrão da média (EPM). O intervalo de confiança foi fixado em 95% e as diferenças foram consideradas significativas para $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Avaliação de parâmetros parasitológicos em camundongos WT e MIF^{-/-} infectados por *S. mansoni*

Das 25 cercárias injetadas por camundongo, foram recuperados em média $10,48 \pm 0,9$ vermes nos camundongos MIF^{-/-} e $10,50 \pm 0,8$ em camundongos WT na 8ª semana da infecção por *S. mansoni*. Na 14ª semana após a infecção, observou-se uma diminuição significativa de vermes em ambos os grupos, sendo encontrada uma média $4,6 \pm 0,5$ vermes adultos em camundongos WT, e $5,8 \pm 0,5$ nos camundongos MIF^{-/-}. A diminuição foi observada em ambos os grupos experimentais, mas novamente não houve diferença significativa na recuperação de vermes entre os diferentes grupos (**Gráfico 1**).

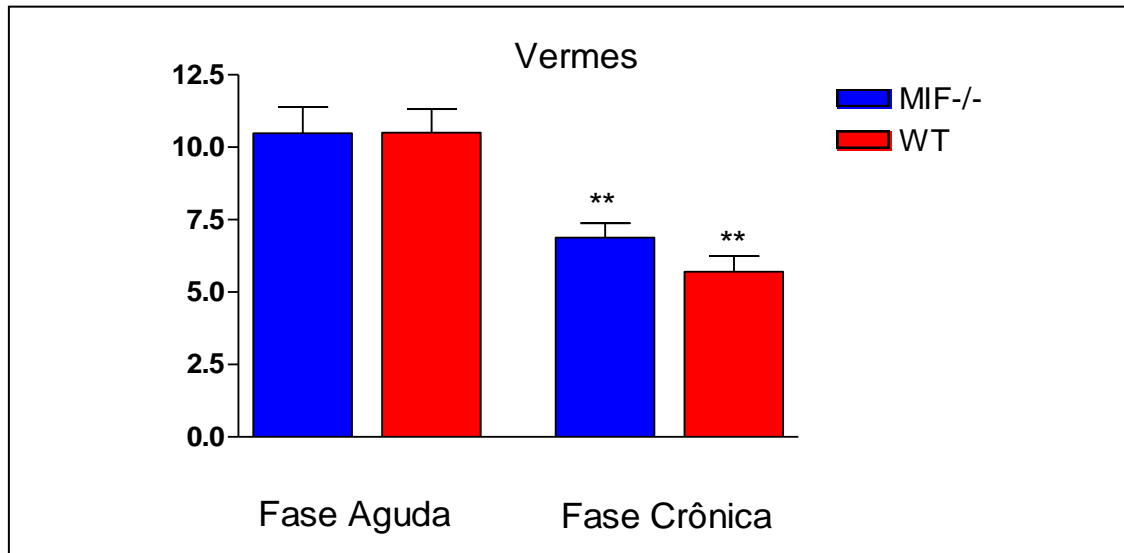


Gráfico 1. Número total de vermes recuperados pela técnica da perfusão, na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni* em camundongos WT e MIF^{-/-}. O número total de vermes foi estimado após perfusão sanguínea realizada com 8 (fase aguda) e 14 (fase crônica) semanas da infecção subcutânea com 25 cercárias/camundongo. Os valores representam a média \pm EPM de vermes recuperados de camundongos infectados WT (fase aguda, n=26; fase crônica, n=20) e MIF^{-/-} (fase aguda, n=26; fase crônica, n=17) de 3 experimentos independentes. ** representa $p < 0,05$ (ANOVA post-test Newman-Keuls).

Também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos experimentais quanto à eliminação de ovos pelas fezes na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni* (**Gráfico 2**). Foram quantificados em média $467 \pm 78,6$ ovos/g de fezes nos camundongos WT e $510 \pm 77,4$ ovos/g de fezes em camundongos MIF^{-/-} na fase aguda; e $338 \pm 92,7$ ovos/g e $327 \pm 57,4$ ovos/g de fezes na fase crônica nos animais MIF^{-/-} e WT, respectivamente. Apesar de haver uma diminuição do número de ovos eliminados nas fezes na fase crônica em ambos os grupos experimentais, essa diferença não foi significativa em comparação com a eliminação estimada de ovos nas fezes na fase aguda da infecção.

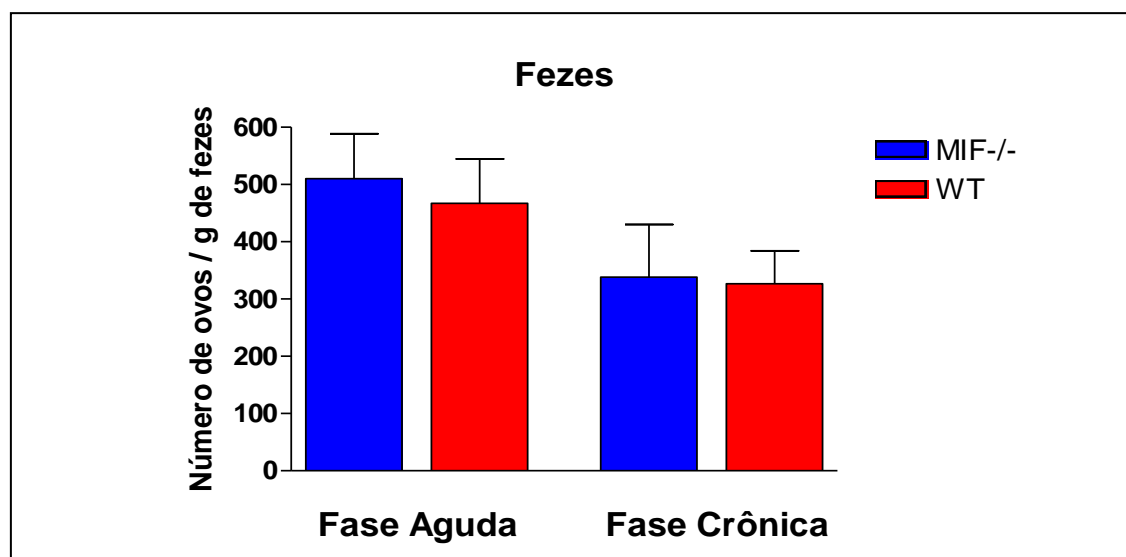


Gráfico 2. Número de ovos presentes nas fezes de camundongos, na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni* em camundongos WT e MIF^{-/-}. Os valores representam a média ± EPM de ovos do parasito eliminados por g de fezes de camundongos WT (fase aguda, n=23; fase crônica, n=20) e de camundongos MIF^{-/-} (fase aguda, n=24; fase crônica, n=17) infectados subcutaneamente com 25 cercárias/camundongo. Resultados de 3 experimentos independentes. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

Como esperado, a quantificação dos ovos retidos no pulmão, baço, intestino e fígado de camundongos infectados por *S. mansoni* revelou um aumento no número de ovos acumulados nos diferentes tecidos do hospedeiro na fase crônica em relação à fase aguda da infecção (**Gráfico 3**). Esse aumento da deposição tecidual de ovos ocorreu de maneira semelhante em ambos os grupos experimentais, ou seja, tanto nos camundongos WT como em MIF^{-/-}.

Comparando o acúmulo de ovos nos tecidos dos camundongos durante a fase aguda, não foi detectada diferença estatística entre os animais WT e MIF^{-/-}. Na fase crônica da infecção o número de ovos recuperados no baço e intestino dos animais MIF^{-/-} foi relativamente maior que em camundongos WT, porém sem diferença estatística. Também não foi detectada diferença no número de ovos retidos no fígado ou pulmão destes animais na fase crônica da infecção por *S. mansoni*.

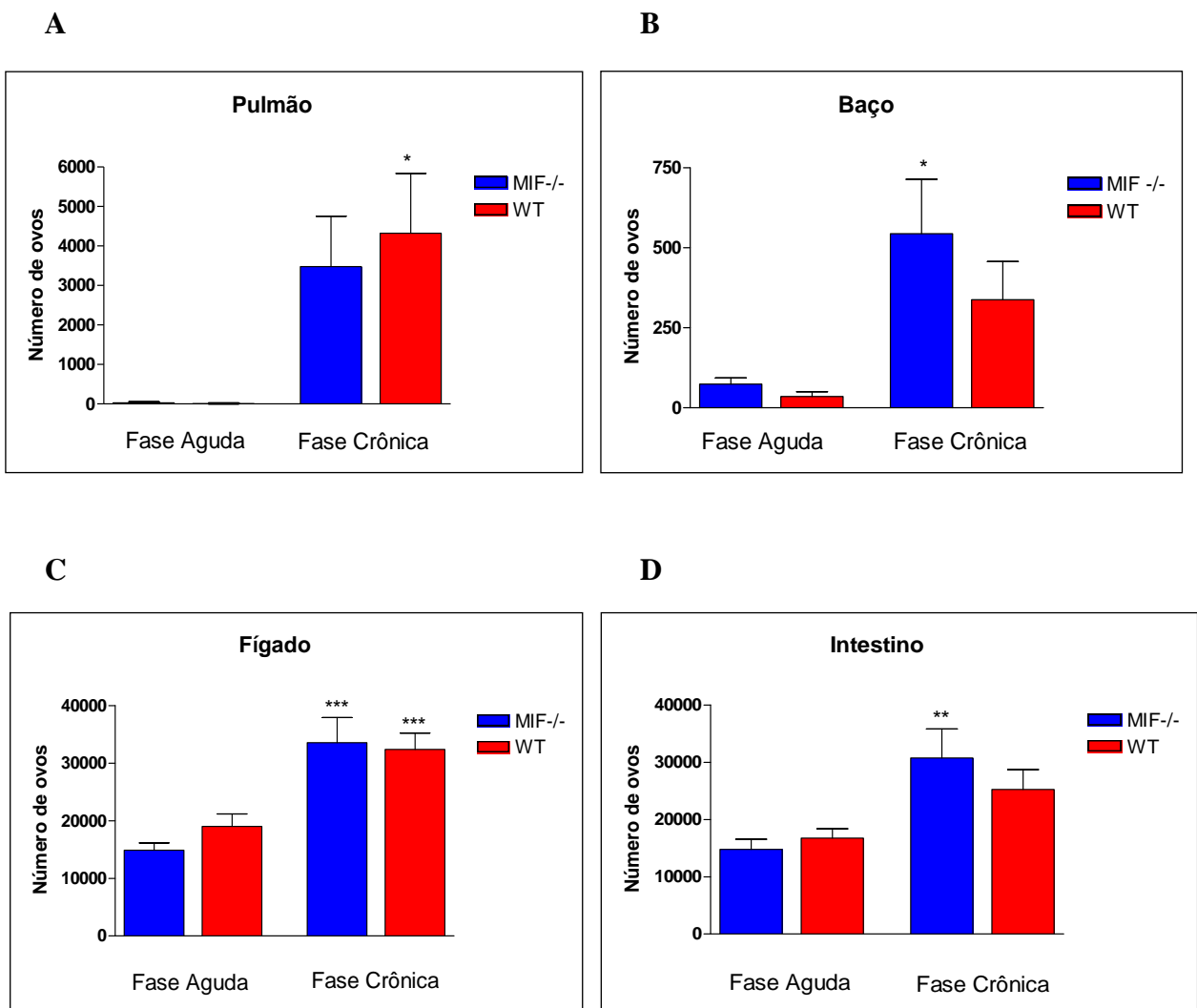


Gráfico 3. Número de ovos retidos no (A) pulmão, (B) baço, (C) fígado e (D) intestino na fase aguda e fase crônica da infecção por *S. mansoni* em camundongos WT e MIF^{-/-}. Os valores representam a média ± EPM de ovos de *S. mansoni* quantificados após digestão completa com KOH 5% de cada órgão de camundongos infectados com 25 cercárias/animal. MIF^{-/-} (fase aguda, n=24; fase crônica, n=17), WT (fase aguda, n=23; fase crônica, n=20). * representa p < 0,05, **p < 0,01 e *** p < 0,001 na comparação entre o número de ovos quantificados entre a fase aguda e fase crônica da infecção por *S. mansoni* em camundongos com o mesmo genótipo. Resultados de 3 experimentos independentes. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

6.2. Avaliação da resposta imunológica induzida pela infecção por *S. mansoni* em camundongos WT e MIF^{-/-}

6.2.1 Resposta humoral

Para a avaliação da resposta humoral foram verificados níveis de IgG2a, IgG1 reativos à antígenos de SEA e a concentração de IgE total no soro de camundongos infectados e não infectados na fase aguda e a fase crônica da infecção por *S. mansoni*. A produção de IgG2a reativa ao SEA nos camundongos MIF^{-/-} e WT, durante a infecção por *S. mansoni*, está representada no **gráfico 4**. Os dados mostram baixa reatividade de IgG2a durante a infecção por *S. mansoni*, não sendo observada uma elevação estatística de IgG2a parasito-reativa na fase aguda da infecção, em ambos os grupos experimentais. Na fase crônica, houve aumento de IgG2a reativa ao SEA, e este aumento foi estatisticamente maior nos camundongos não deficientes (WT).

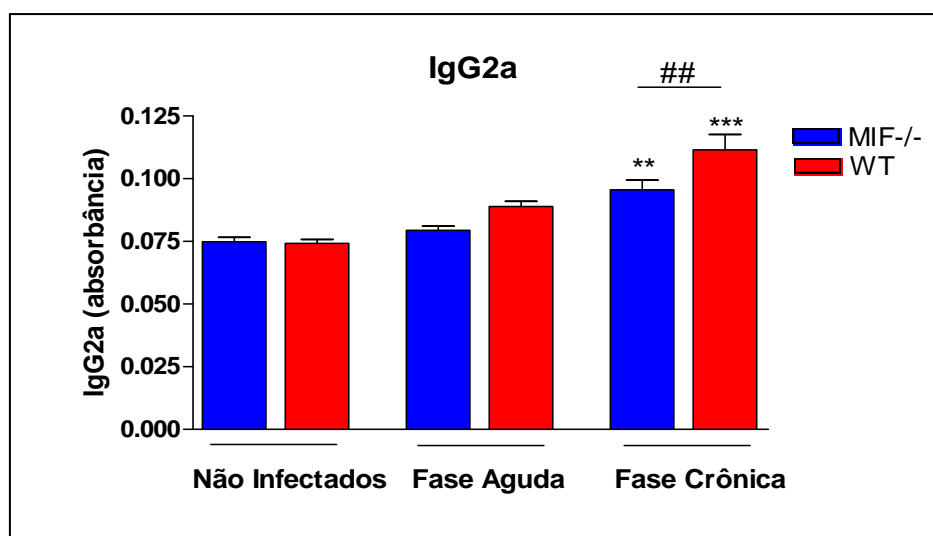


Gráfico 4. Níveis séricos de IgG2a reativa à antígenos solúveis do ovo do parasito (SEA) durante a infecção por *S. mansoni* em camundongos WT e MIF^{-/-}. Os valores representam a média ± EPM da absorbância obtida pela técnica de ELISA no soro de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e de camundongos Balb/c (WT) não infectados e infectados por *S. mansoni*, na fase aguda e na fase crônica da infecção (n= 28 animais/grupo). ** representa p < 0,01 e *** p < 0,001 na comparação entre infectados e não infectados do mesmo grupo experimental e ## representa p < 0,01 na comparação entre WT e MIF^{-/-} durante a fase crônica da infecção. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

Em relação à produção de IgG1 (**gráfico 5**), a infecção por *S. mansoni* induziu aumento estatístico nos níveis séricos de IgG1 reativos ao SEA, sendo que o aumento foi maior na fase aguda que na fase crônica da infecção. Entretanto, não houve diferença estatística nos níveis de IgG1 reativos detectados nos camundongos MIF^{-/-} e WT, tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção.

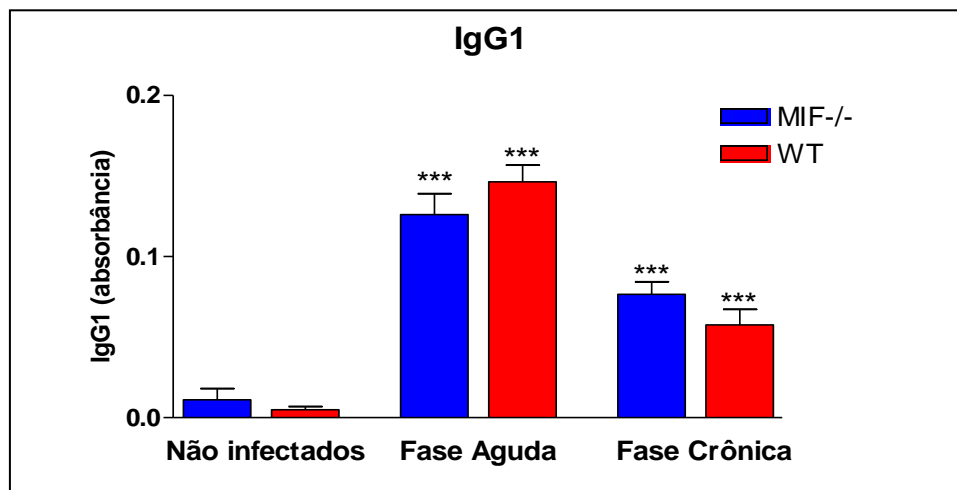


Gráfico 5. Níveis séricos de IgG1 reativa a antígenos solúveis do ovo do parasito (SEA) durante a infecção por *S. mansoni* em camundongos WT e MIF^{-/-}. Os valores representam a média ± EPM da absorbância obtida pela técnica de ELISA no soro de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e de camundongos Balb/c (WT) não infectados e infectados por *S. mansoni*, na fase aguda e na fase crônica da infecção (n= 28 animais/grupo). *** representa p < 0,001 na comparação entre infectados e não infectados entre animais do mesmo grupo experimental. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

A infecção por *S. mansoni* induziu um aumento significativo na concentração sérica de IgE total, especialmente durante a fase aguda da infecção, nos animais MIF^{-/-} e WT (**gráfico 6**). Entretanto, o aumento dos níveis séricos de IgE foi estatisticamente superior no grupo de animais WT em relação ao MIF^{-/-}, tanto na 8^a quanto 14^a semana após a infecção.

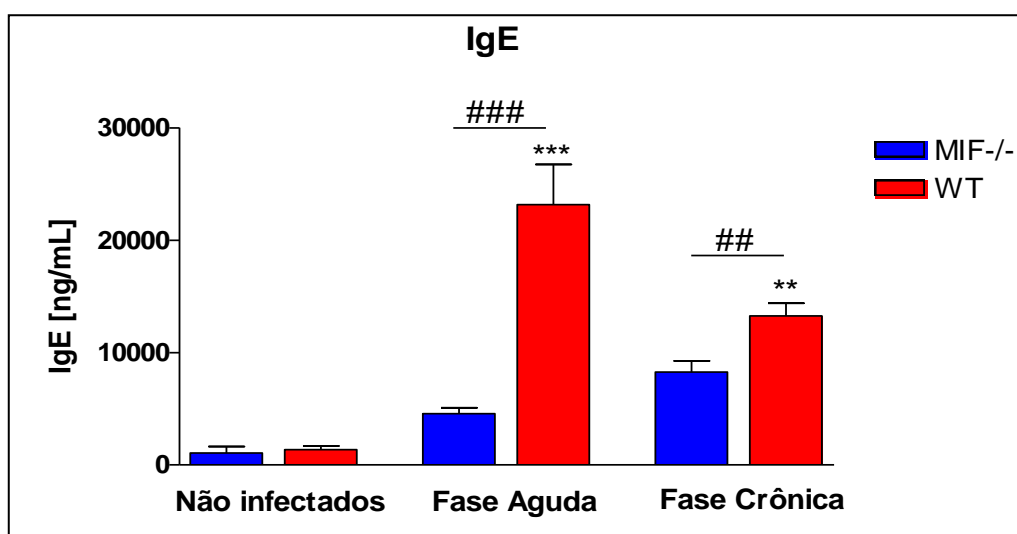


Gráfico 6. Níveis de IgE total no soro de camundongos Balb/c (WT) e Balb/c (MIF^{-/-}) na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de IgE estimada pela técnica de ELISA em soro de camundongos não infectados e infectados subcutaneamente com 25 cercarias/animal e necropsiados após 8 (fase aguda) ou 14 (fase crônica) semanas da infecção (n= 25 animais/grupo obtidos em 3 experimentos independentes). ** representa $p < 0,01$, e *** $p < 0,001$ em relação à concentração de IgE dos animais não infectados do mesmo genótipo e ## representa $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ na comparação entre camundongos deficientes e não deficientes na produção de MIF no mesmo período de infecção. Análise ANOVA post-teste Newman-Keuls.

6.2.2 Produção de citocinas no fígado

A quantificação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-17, no homogenato hepático de camundongos Balb/c WT e MIF^{-/-}, na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni* está representada nos **gráficos 7 e 8**, respectivamente. Apesar de ter sido quantificado níveis superiores de TNF- α no homogenato de fígado obtido de animais infectados, tanto na fase aguda como na fase crônica, esses valores não foram estatisticamente maiores que o nível dessa citocina detectado em animais não infectados. Também não foram detectadas diferenças estatísticas nos níveis de TNF- α no fígado de camundongos MIF^{-/-} e WT (**gráfico 7**).

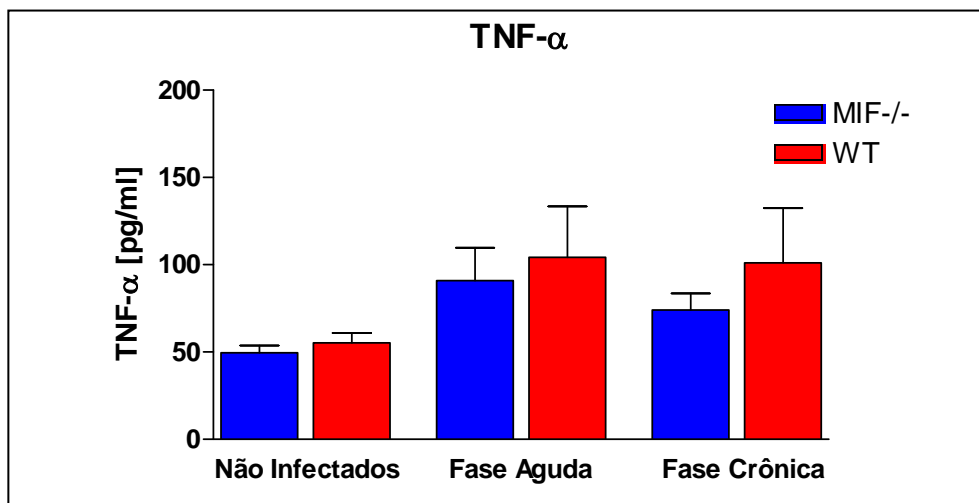


Gráfico 7. Níveis de TNF- α no homogenato hepático de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e de camundongos Balb/c (WT) durante a infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de TNF- α estimada pela técnica de ELISA no homogenato hepático de camundongos não infectados e infectados subcutaneamente com 25 cercarias/animal e necropsiados após 8 (fase aguda) ou 14 (fase crônica) semanas da infecção (n= 8-10 animais/grupo). Análise ANOVA post-teste Newman-Keuls não mostra diferenças estatísticas entre os grupos.

Com relação à produção de IL-17 detectada no fígado dos camundongos Balb/c, não foi possível verificar aumento na produção da citocina durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*, tanto em camundongos WT, como em camundongos MIF^{-/-} (gráfico 8). Na fase crônica da infecção, houve aumento significativo de IL-17 em relação ao grupo não infectado somente nos animais geneticamente deficientes na produção de MIF.

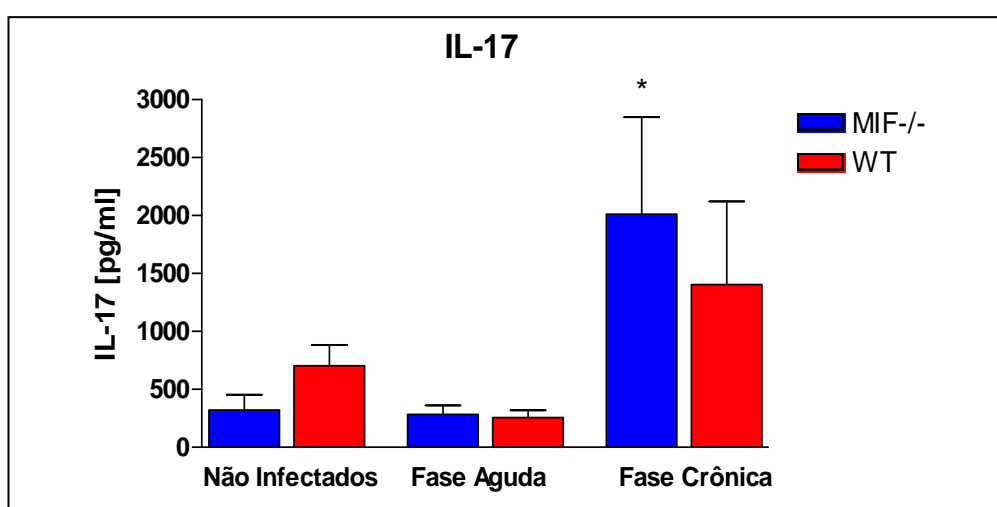


Gráfico 8. Níveis de IL-17 no homogenato hepático de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e de camundongos Balb/c (WT) durante a infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de IL-17 estimada pela técnica de ELISA. * representa $p < 0,05$ em comparação entre animais infectados do mesmo grupo entre a fase aguda e fase crônica da infecção. Os valores representam a média \pm EPM obtido com 10 animais/grupo. Análise ANOVA post-teste Newman-Keuls.

Como marca da indução da resposta do tipo 1, o nível de IFN- γ foi quantificado no homogenato hepático de camundongos Balb/c não deficientes (WT) e de camundongos Balb/c geneticamente deficientes na produção de MIF (MIF^{-/-}), durante a infecção por *S. mansoni*. Não foram detectadas alterações significativas nos níveis de IFN- γ no parênquima hepático dos animais WT no decorrer da infecção pelo parasito (**gráfico 9**). Em contraste, a quantidade de IFN- γ no parênquima hepático dos camundongos MIF^{-/-} aumentou durante a infecção por *S. mansoni*, sendo que na fase crônica da infecção, a quantidade de IFN- γ nesse grupo foi estatisticamente superior ao detectado nos animais não infectados de mesmo genótipo. Comparando-se os grupos de animais infectados, observou-se um aumento significativo do nível de IFN- γ no grupo MIF^{-/-} em relação aos animais WT na fase crônica da infecção (**gráfico 9**).

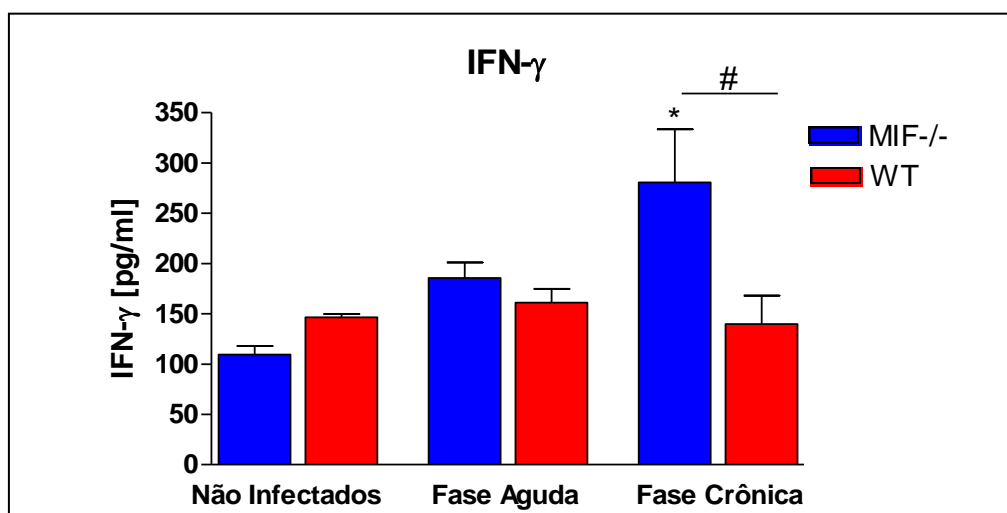


Gráfico 9. Níveis de interferon- γ (IFN- γ) no homogenato hepático de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e de camundongos Balb/c (WT) durante a infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de IFN- γ , estimada pela técnica de ELISA no homogenato hepático de camundongos não infectados e infectados subcutaneamente com 25 cercarias/animal e necropsiados após 8 (fase aguda) e 14 (fase crônica) semanas da infecção (n= 8-10 animais/grupo). * representa $p < 0,05$ em relação ao nível do animal não infectado do mesmo grupo e # representa $p < 0,05$ na comparação entre WT e MIF^{-/-} durante a fase crônica. Análise ANOVA post-teste Newman-Keuls.

Conforme observado no **gráfico 10**, a infecção por *S. mansoni* na fase aguda induz níveis semelhantes de IL-10 em camundongos MIF^{-/-} e WT. Entretanto, na fase crônica, ocorreu um maior aumento do nível de IL-10 hepático nos animais WT. Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos nesta fase da infecção por *S. mansoni* quanto ao nível de IL-10, este foi superior nos animais não deficientes (WT).

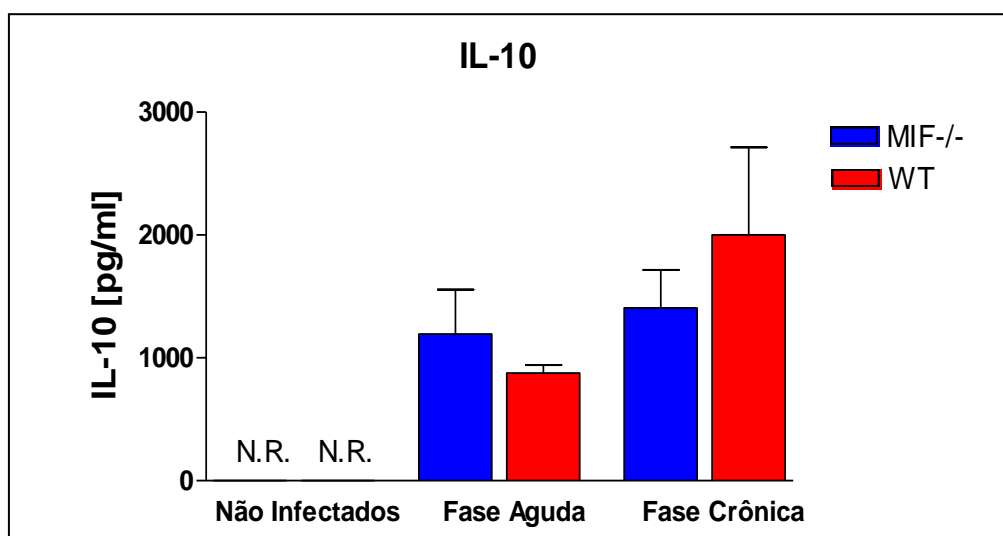


Gráfico 10. Níveis de IL-10 no homogenato hepático de camundongos Balb/c MIF^{-/-} e camundongos Balb/c WT durante a infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM da concentração de IL-10 estimada pela técnica de ELISA no homogenato hepático de camundongos infectados subcutaneamente com 25 cercarias/animal e necropsiados após 8 (fase aguda) ou 14 (fase crônica) semanas da infecção (n= 8-10 animais/grupo). Não foi realizada a quantificação de IL-10 nos camundongos não infectado (N.R.). Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

A produção de citocinas típicas do perfil de resposta do tipo 2, como IL-4, IL-5 e IL-13, foi também quantificada no homogenato hepático dos animais experimentais. Os dados apresentados mostram que a infecção por *S. mansoni* nos camundongos induziu aumento da produção local (fígado) de IL-4, IL-5 e IL-13 em relação aos seus controles não infectados (**Gráficos 11, 12 e 13**).

Com relação à produção de IL-5, a infecção induziu aumento gradual da produção dessa citocina. Apesar de não constatadas diferenças estatísticas no nível de IL-5 entre os

camundongos do grupo WT e MIF^{-/-}, é importante salientar que a quantidade de IL-5 quantificada nos camundongos WT foram sempre superiores que nos MIF^{-/-} (gráfico 11).

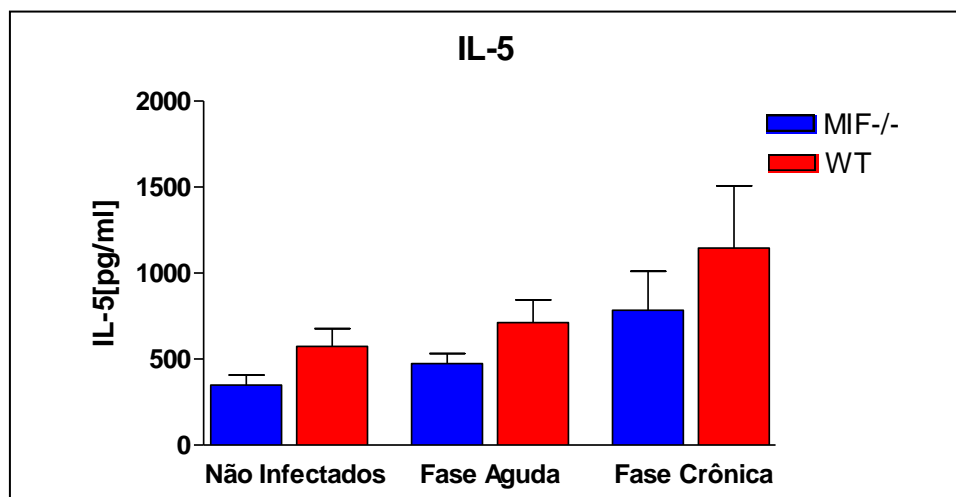


Gráfico 11. Níveis de IL-5 no homogenato hepático de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e de camundongos Balb/c (WT) durante a infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da concentração de IL-5 estimada pela técnica de ELISA no homogenato hepático de camundongos não infectados ou infectados subcutaneamente com 25 cercarias/animal e necropsiados após 8 (fase aguda) ou 14 (fase crônica) semanas da infecção (n= 8-10 animais/grupo). Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

No caso da produção de IL-4, camundongos MIF^{-/-} apresentaram níveis estatisticamente elevados de IL-4 no fígado dos animais da fase aguda, com redução durante a fase crônica, enquanto que nos camundongos WT a quantidade de IL-4 aumenta durante a infecção. Desta forma, na fase crônica da infecção por *S. mansoni*, os níveis de IL-4 detectados no fígado dos camundongos WT foram estatisticamente superiores aos dos animais não infectados e dos camundongos MIF^{-/-} infectados cronicamente pelo parasito (**Gráfico 12**).

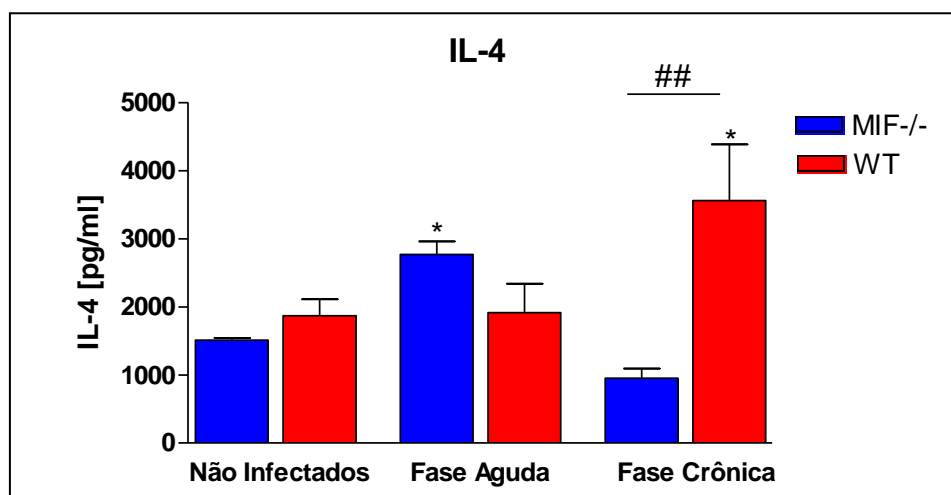


Gráfico 12. Níveis de IL-4 no homogenato hepático de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e de camundongos Balb/c (WT) durante a infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da concentração de IL-4 estimada pela técnica de ELISA no homogenato hepático de camundongos não infectados e infectados subcutaneamente com 25 cercarias/animal e necropsiados após 8 (fase aguda) ou 14 (fase crônica) semanas da infecção (n= 8-10 animais/grupo). * representa p < 0,05 em comparação com o nível dos animais não infectados e ## representa p < 0,01 na comparação entre camundongos MIF^{-/-} e WT, durante a fase crônica da infecção. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

A produção de IL-13 no fígado de camundongos infectados elevou-se estatisticamente na fase aguda da infecção em ambos os grupos experimentais, não sendo observada diferença estatística entre eles. Entretanto, na fase crônica da infecção, a produção de IL-13 retornou aos níveis basais dos animais não infectados no grupo geneticamente deficiente em MIF, mas ainda apresenta-se elevada nos animais WT (**gráfico 13**).

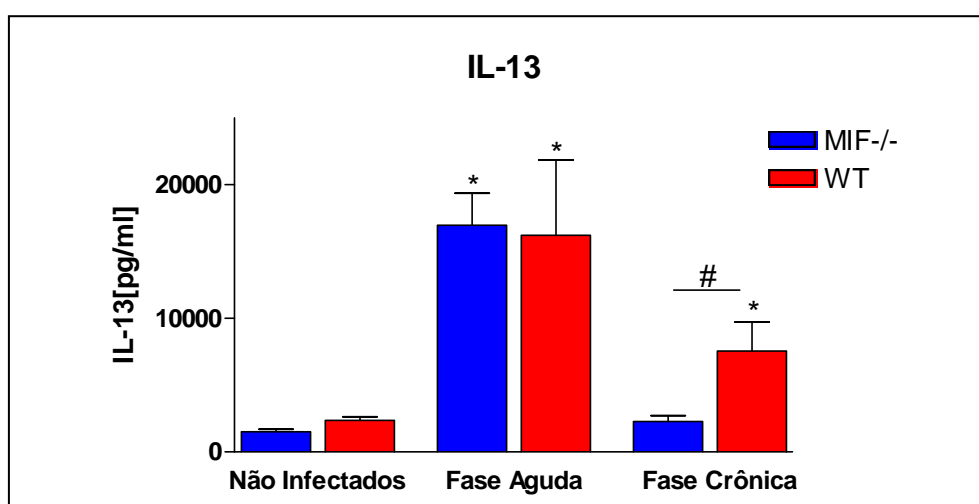


Gráfico 13. Níveis de IL-13 no homogenato hepático de camundongos Balb/c MIF^{-/-} e de camundongos Balb/c WT durante a infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da concentração de IL-13 estimada pela técnica de ELISA (n= 8-10 animais/grupo). * representa p < 0,05 em relação ao nível do animal não infectado do mesmo grupo e # p < 0,05 entre grupos diferentes. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

6.2.3 Atividade enzimática como medida indireta do infiltrado celular no Fígado e no Intestino

A estimativa da infiltração/ativação de neutrófilos no fígado e intestino dos animais foi indiretamente realizada através da quantificação da atividade de mieloperoxidase (MPO) no homogenato destes tecidos. A infecção por *S. mansoni* induziu um aumento da atividade da mieloperoxidase tanto no intestino (**gráfico 14**) quanto no fígado (**gráfico 15**) dos animais de ambos os grupos. Durante a fase aguda da infecção, o aumento da atividade de MPO foi semelhante nos animais WT e MIF^{-/-}, tanto no intestino (**gráfico 14A**) como no fígado (**gráfico 15A**). Na fase crônica, também não houve diferença estatística na atividade de MPO detectada no intestino dos dois grupos experimentais (**gráfico 14B**). Entretanto, o aumento da atividade de MPO na fase crônica da infecção foi significativamente maior nos animais deficientes na produção de MIF, sugerindo maior participação de neutrófilos no granuloma durante a fase crônica.

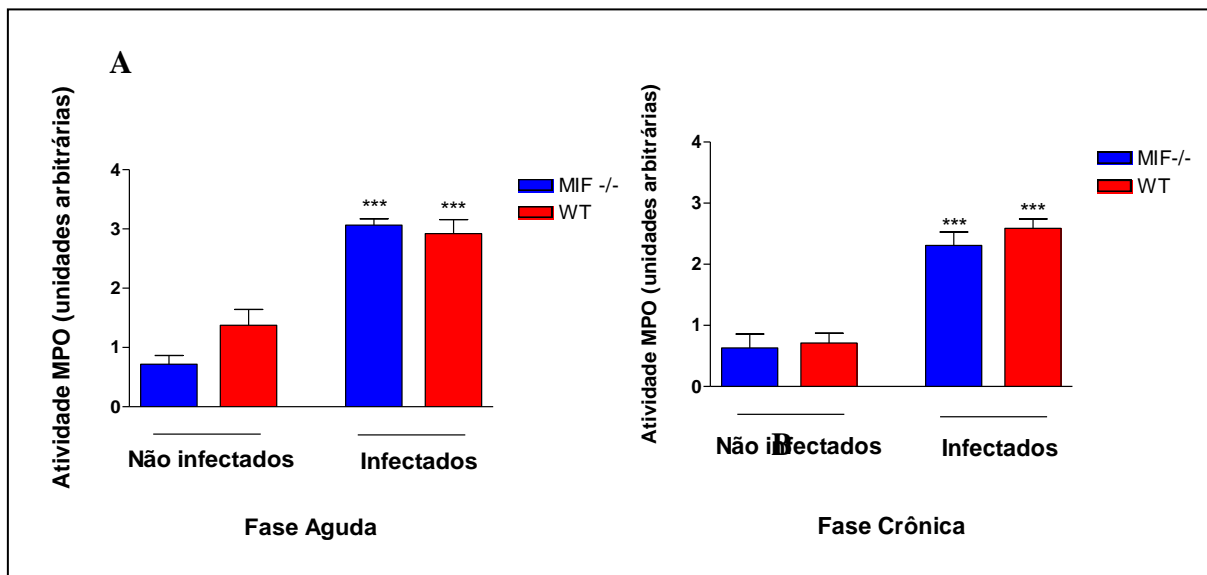


Gráfico 14. Atividade de mieloperoxidase (MPO) no intestino de camundongos WT e MIF^{-/-} durante a fase aguda (A) e fase crônica (B) da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM dos valores de absorbância obtidos com 100 mg de intestino de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e Balb/c (WT) não infectados, após 8 (fase aguda) e 14 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. Foram processados 15-18 amostras por grupo, obtidas de 3 experimentos independentes. *** representa $p < 0,001$ na comparação entre os valores obtidos de camundongos infectados versus não infectados do mesmo grupo experimental. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

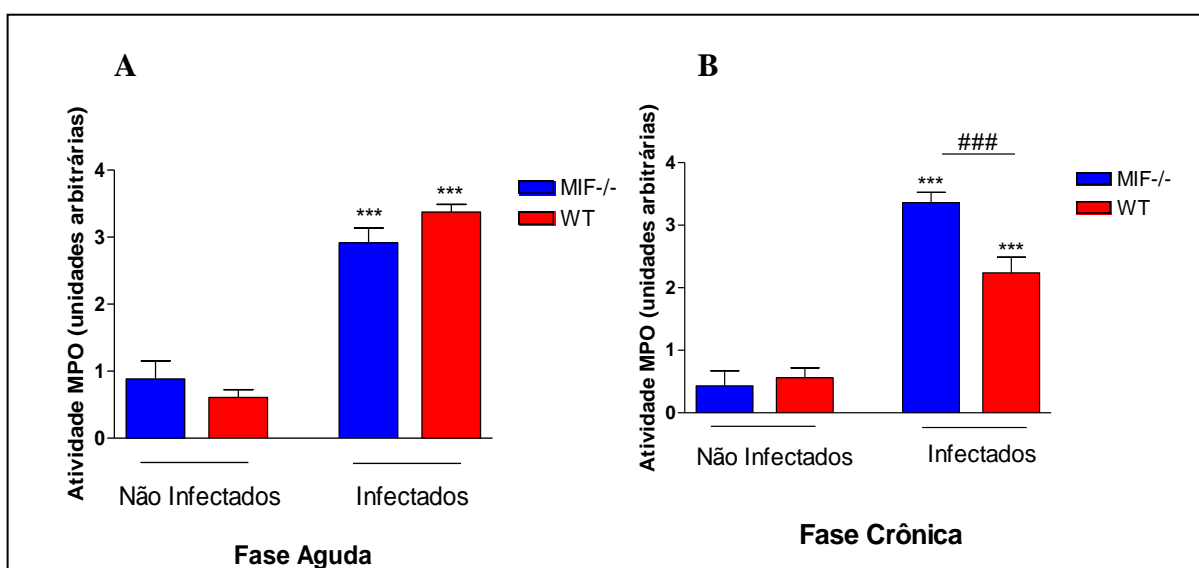


Gráfico 15. Atividade de mieloperoxidase (MPO) no fígado de camundongos WT e MIF^{-/-} durante a fase aguda (A) e fase crônica (B) da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM de absorbância obtidos com 100 mg de fígado. Foram processados 15-18 amostras por grupo, obtidas de 3 experimentos independentes. *** representa $p < 0,001$ na comparação entre os valores obtidos de camundongos infectados versus não infectados do mesmo grupo experimental e ### representa $p < 0,001$ na comparação entre camundongos MIF^{-/-} e WT, durante a fase crônica da infecção. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

O conteúdo relativo de eosinófilos nos tecidos foi indiretamente estimado pela atividade de peroxidase (EPO) no intestino (**gráfico 16**) e fígado (**gráfico 17**) dos animais durante a infecção por *S. mansoni*. Os dados demonstraram que a infecção por *S. mansoni* induziu aumento significativo na atividade de EPO no fígado e no intestino tanto na fase aguda como na fase crônica. Na fase aguda da infecção, a atividade de peroxidase no intestino e no fígado foi estatisticamente superior nos camundongos WT em relação aos camundongos MIF^{-/-}, indicando menor atividade de eosinófilos nos animais deficientes. Entretanto, na fase crônica da infecção a atividade de peroxidase foi semelhante nos dois grupos experimentais.

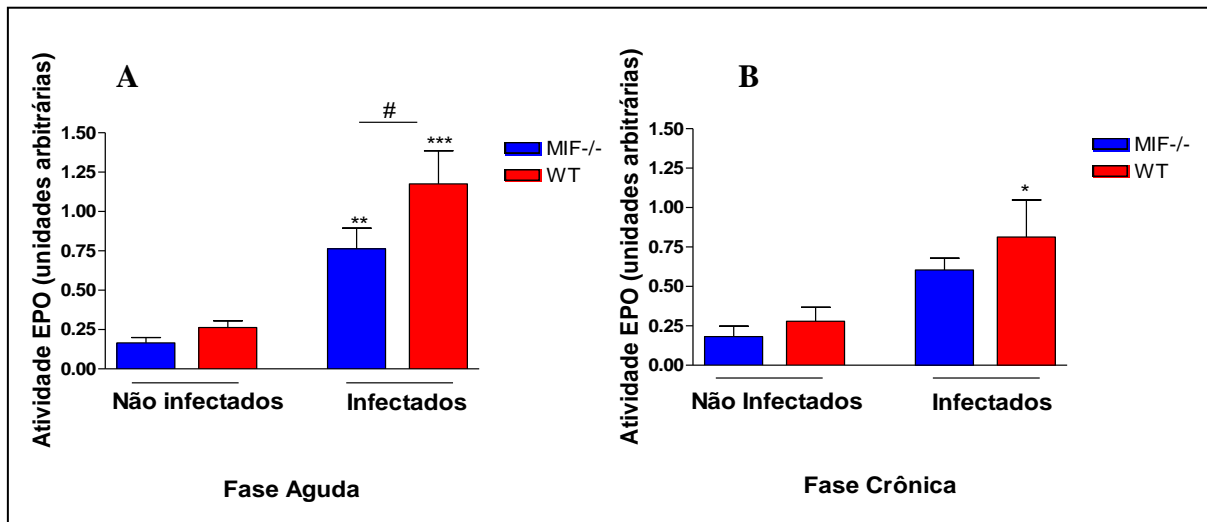


Gráfico 16. Atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO) no intestino de camundongos WT e MIF^{-/-} durante a fase aguda (A) e fase crônica (B) da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM de absorbância obtidos com 100 mg de intestino de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e Balb/c (WT) não infectados, após 8 (fase aguda) e 14 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. Foram processados 15-18 amostras por grupo, obtidas de 3 experimentos independentes. *, **, ***, representam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,001$, respectivamente na comparação entre os valores obtidos de camundongos infectados versus não infectados do mesmo grupo experimental e # representa $p < 0,05$ na comparação entre camundongos MIF^{-/-} e WT, durante a fase aguda da infecção. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

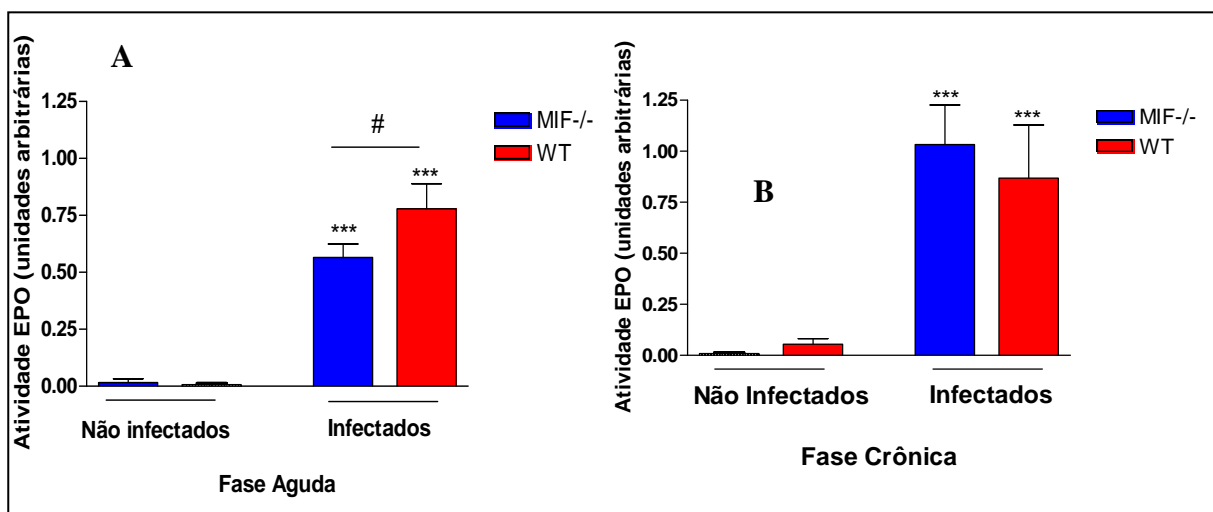


Gráfico 17. Atividade de peroxidase de eosinófilos (EPO) no fígado de camundongos WT e MIF^{-/-} durante a fase aguda (A) e fase crônica (B) da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média \pm EPM. Foram processados 15-18 amostras por grupo, obtidas de 3 experimentos independentes. *** representa $p < 0,001$ na comparação entre os valores obtidos de camundongos infectados versus não infectados do mesmo grupo experimental e # representa $p < 0,05$ na comparação entre camundongos MIF^{-/-} e WT, durante a fase aguda da infecção. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

Com relação à atividade de NAG, foi observada uma atividade basal da enzima no fígado e intestino de animais não infectados, o que está de acordo com a presença de macrófagos residentes nesses tecidos. No intestino (**gráfico 18**), a atividade da enzima aumenta gradualmente em camundongos infectados, mas não se observam diferenças estatísticas entre os camundongos WT e MIF^{-/-}.

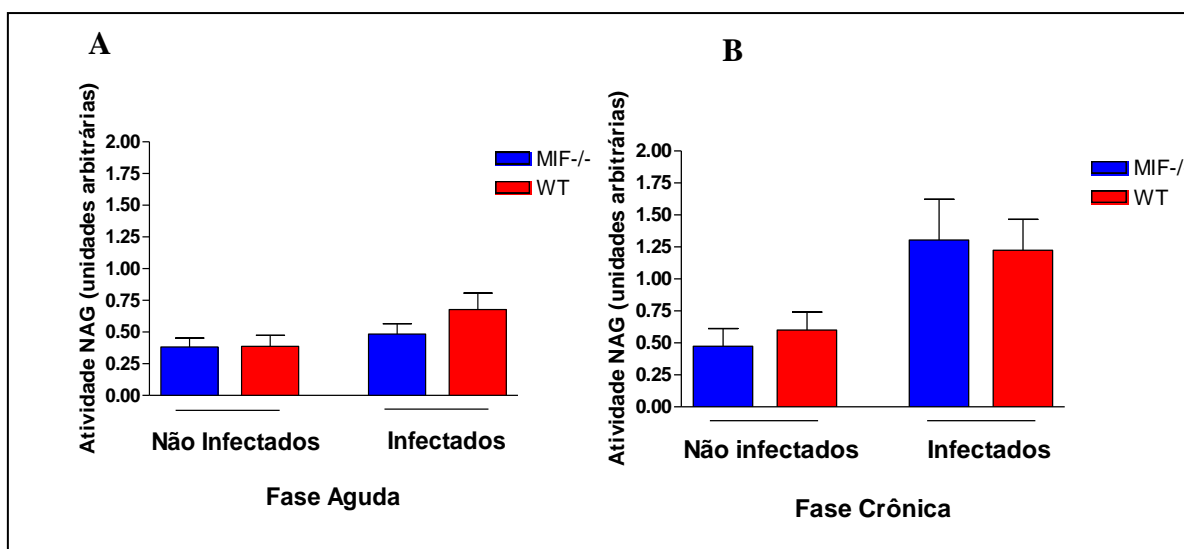


Gráfico 18. Atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) no intestino de camundongos WT e MIF^{-/-} durante a fase aguda (A) e fase crônica (B) da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM de absorbância obtidas com 100 mg de fígado de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e Balb/c (WT) não infectados, após 8 (fase aguda) e 14 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. Foram processados 18-21 amostras por grupo, obtidas de 3 experimentos independentes. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

No fígado, a atividade de NAG nos camundongos WT foi estatisticamente elevada ainda na fase aguda e permanece em elevação durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni* em relação ao detectado em animais não infectados. A elevação da atividade de NAG também foi elevada durante a infecção por *S. mansoni* em camundongos MIF^{-/-}, entretanto, essa elevação foi estatisticamente inferior ao detectado nos animais não deficientes (WT). (**gráfico 19**).

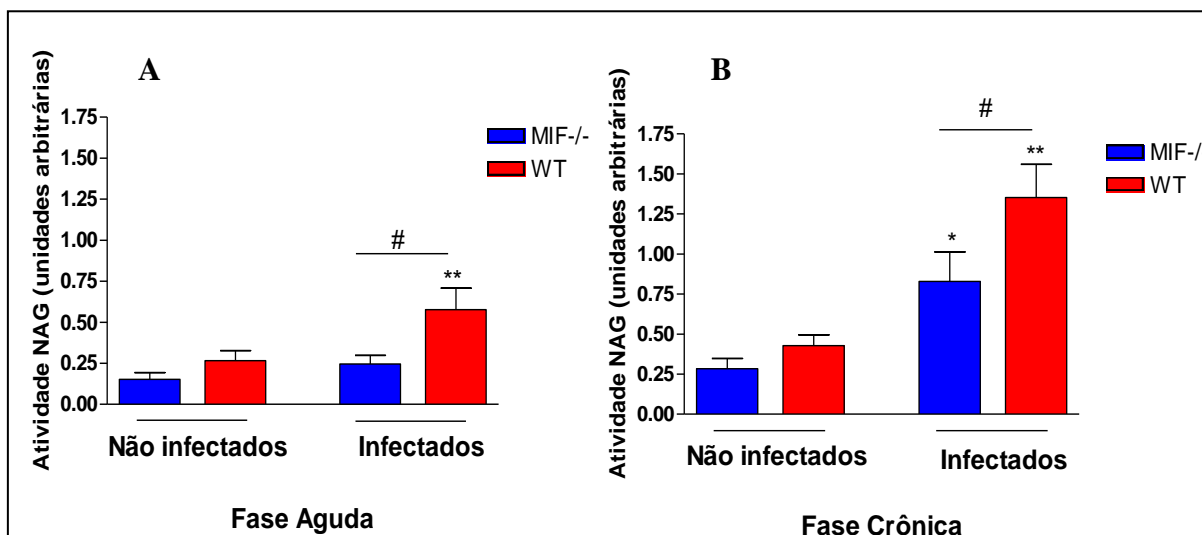


Gráfico 19. Atividade de N-acetilglicosaminidase (NAG) no fígado de camundongos WT e MIF^{-/-} durante a fase aguda (A) e fase crônica (B) da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM de absorbância obtidos com 100 mg de fígado de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e Balb/c (WT) não infectados, após 8 (fase aguda) e 14 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. Foram processados 18-21 amostras por grupo, obtidas de 3 experimentos independentes. * e ** representam p < 0,05 e p < 0,01, respectivamente na comparação entre os valores obtidos de camundongos infectados versus não infectados do mesmo grupo experimental e # representa p < 0,05 na comparação de camundongos infectados MIF^{-/-} e WT durante a mesma fase de infecção. Análise ANOVA post-test Newman-Keuls.

6.3. Avaliação Patológica

Na esquistossomose, a formação do granuloma e a deposição de colágeno no fígado são importantes marcadores de morbidade. Esses parâmetros foram avaliados através da análise histopatológica e pela quantificação de hidroxiprolina no fígado dos animais infectados.

As figuras 7 e 8 ilustram as alterações histopatológicas observadas no fígado de camundongos MIF^{-/-} e WT durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*. Na figura 7 foram ilustrados granulomas decorrentes da deposição de ovos do parasito no fígado de camundongos não deficientes, WT (**figura 7A**) e animais deficientes na produção de MIF (MIF^{-/-}) (**figura 7B**). As imagens sugerem que a reação ao redor dos ovos do parasito nos camundongos não deficientes seja mais intensa que nos animais deficientes. A avaliação detalhada do granuloma hepático nesta fase da infecção sugere que a infiltração celular (**figura 8A e B**) e a deposição de colágeno (**figura 8 C, D, E e F**) é maior nos camundongos WT que nos deficientes MIF^{-/-}.

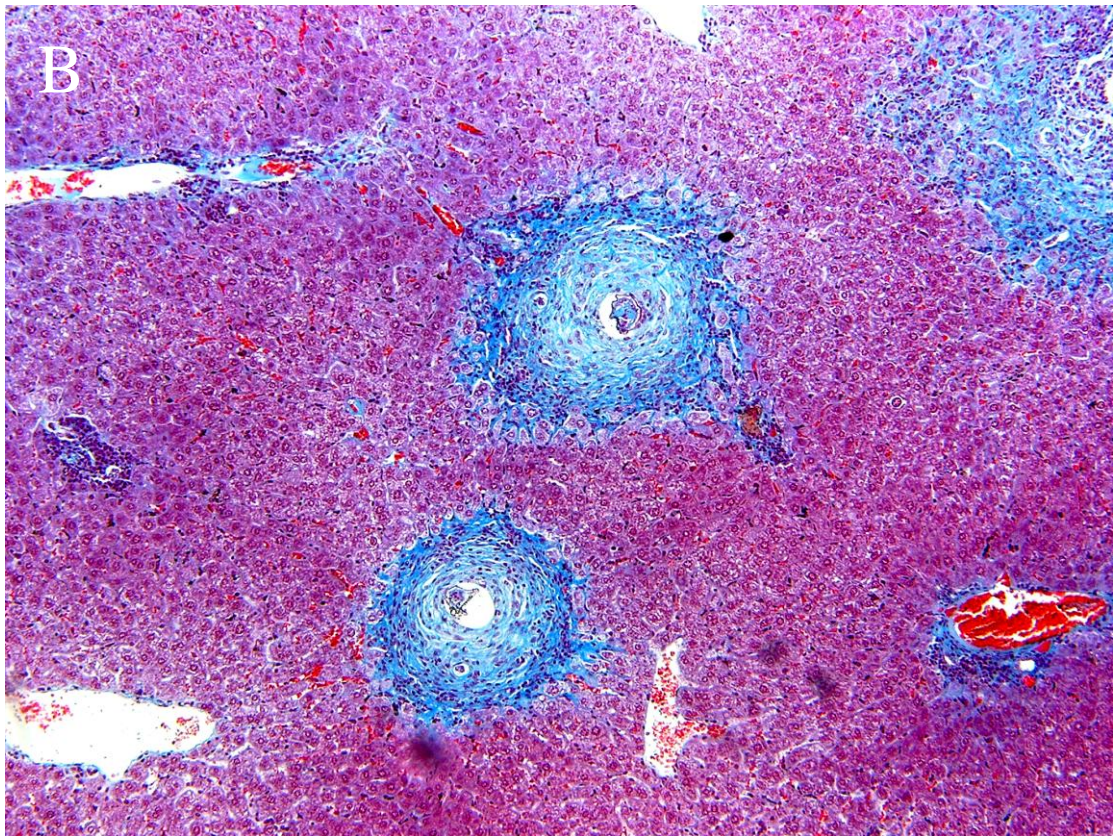
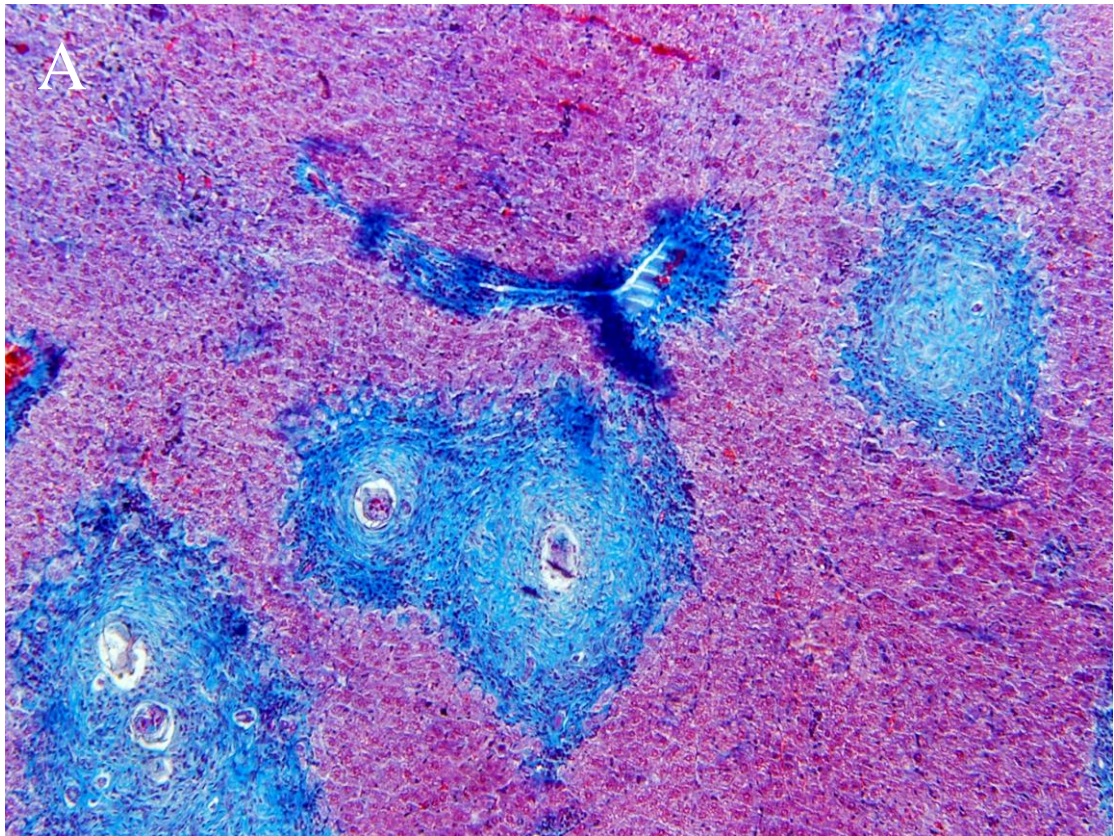


Figura7. Fotomicrografias de cortes de tecido hepático de animais com 8 semanas após a infecção por *S. mansoni* corados Tricômico de Masson. A, Balb/ c (WT), B, Balb/c ($MIF^{-/-}$), aumento 10x.

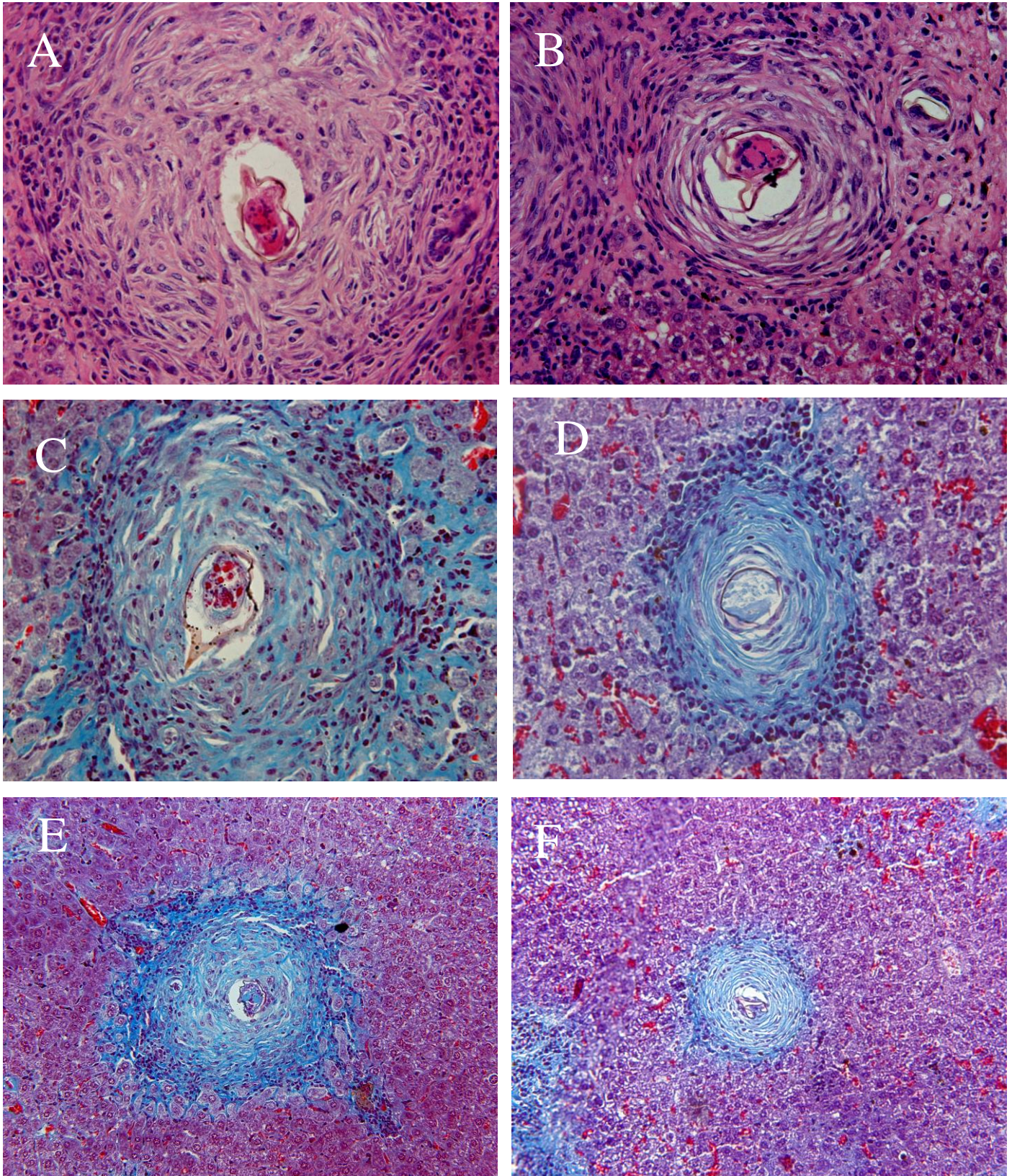


Figura 8. Fotomicrografias de cortes histológicos de tecido hepático de camundongos durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*. A, C e E são cortes de fígado de animais WT; B, D e F de animais MIF^{-/-}. Os cortes A e B foram corados com hematoxilina-eosina evidenciando a infiltração celular granulomatosa. Os cortes C, D, E, F foram corados com Tricômico de Masson mostrando a deposição tecidual de colágeno. Cortes A, B, C,D em aumento 40x; cortes E, F em aumento 20x.

Na fase crônica da infecção por *S. mansoni*, as diferenças observadas no granuloma hepático observado nos animais WT e *MIF*^{-/-} se intensificaram (**Figuras 9 e 10**). Foi observado, principalmente durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*, que o infiltrado celular, o tamanho do granuloma (Figura 9) e a deposição de colágeno (Figura 10) foram visualmente menores nos animais *MIF*^{-/-} em comparação com os animais não deficientes.

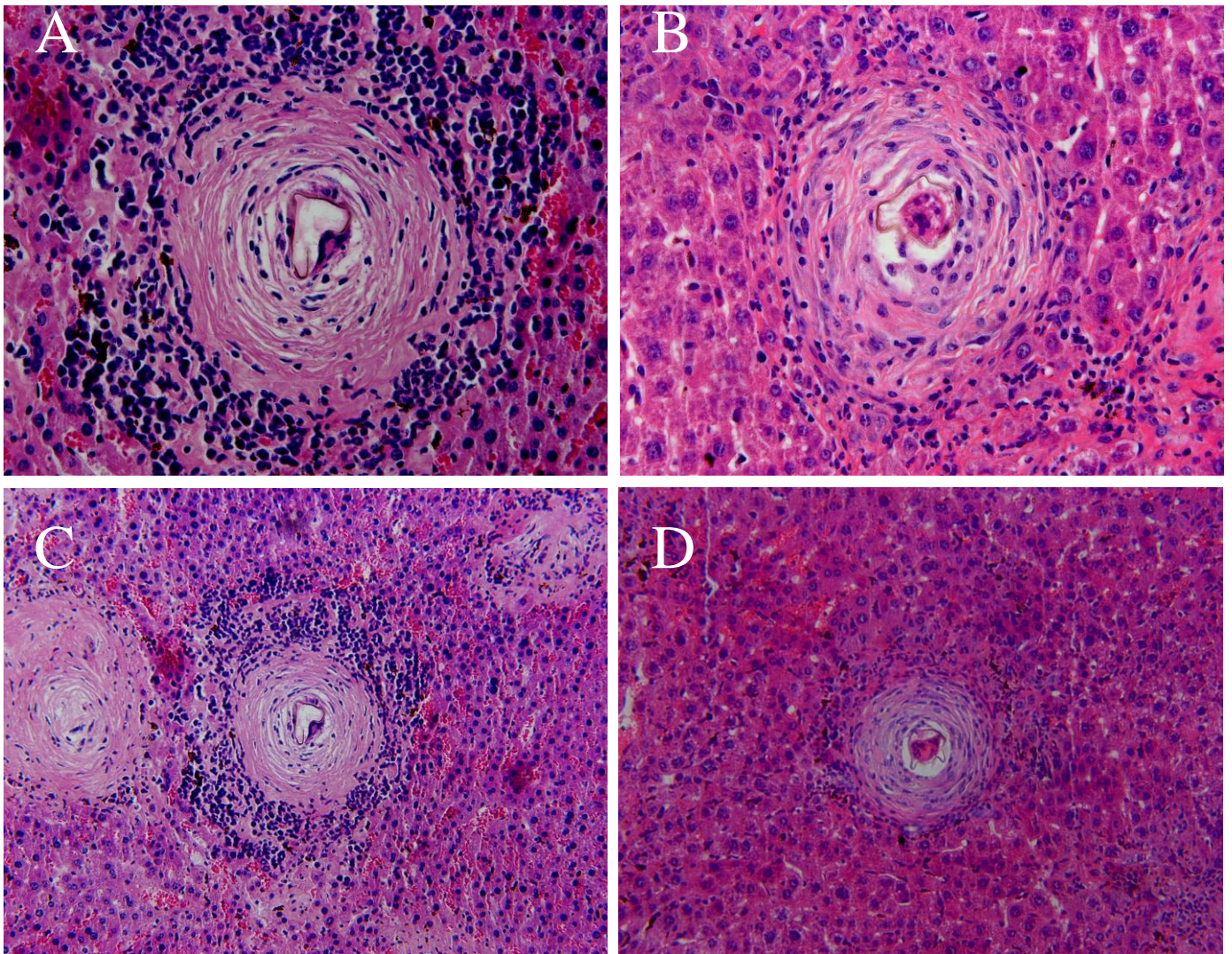


Figura 9. Fotomicrografia de cortes de tecido hepático durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni* corados com hematoxilina-eosina. Representação de cortes de granulomas hepáticos de camundongos WT (A, C) e *MIF*^{-/-} (B, D) processados após 14 semanas da infecção subcutânea com 25 cercárias de *S. mansoni*/animal. Os cortes representados em A e B, demonstrados em aumento 40x, e cortes C e D no aumento de 10x.

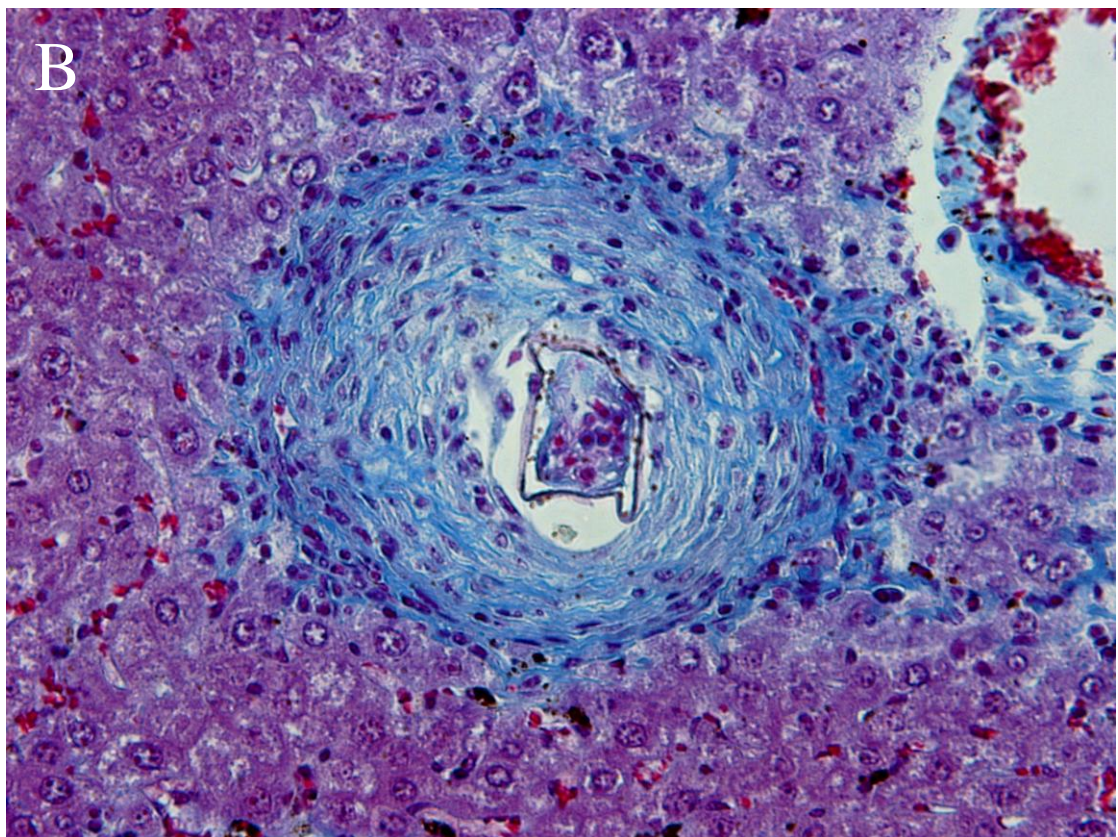
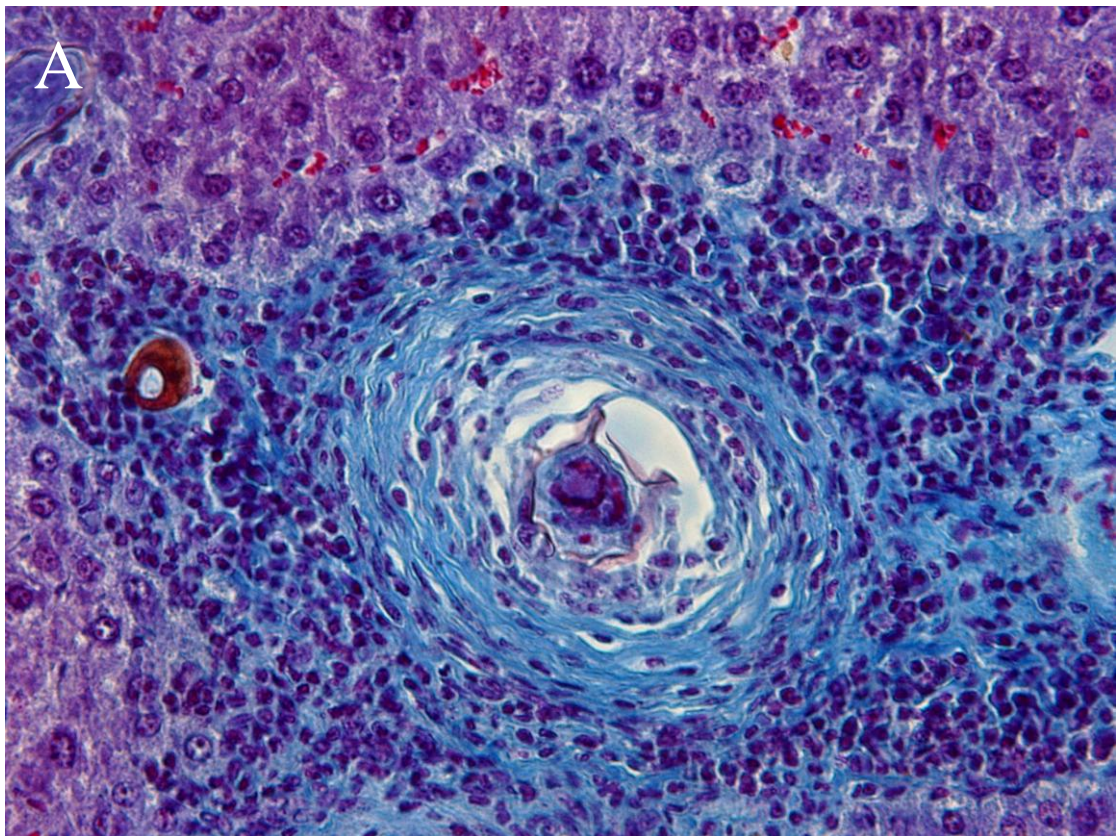


Figura 10. Fotomicrografia de cortes histológicos de fígado de camundongos WT (A) e $MIF^{-/-}$ (B) infectados por *S. mansoni* após 14 semanas de infecção com 25 cercárias de *S. mansoni* e corados com Tricômico de Masson. Aumento 40x.

Na tentativa de quantificar a diferença na deposição de colágeno sugerida pela análise histopatológica foi avaliado o conteúdo de hidroxiprolina, como marcador da deposição de colágeno no fígado destes animais WT e MIF^{-/-} na fase aguda e crônica da infecção. Conforme mostrado no **gráfico 20**, o conteúdo de hidroxiprolina no fígado de camundongos WT infectados aumenta significativamente na fase aguda e na fase crônica da infecção por *S. mansoni*, enquanto que esse aumento não foi observado nos animais geneticamente deficientes na produção de MIF. Dessa forma, a comparação entre os grupos de animais infectados demonstra a presença de concentrações significativamente maiores no grupo de animais WT tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção em comparação com animais MIF^{-/-}.

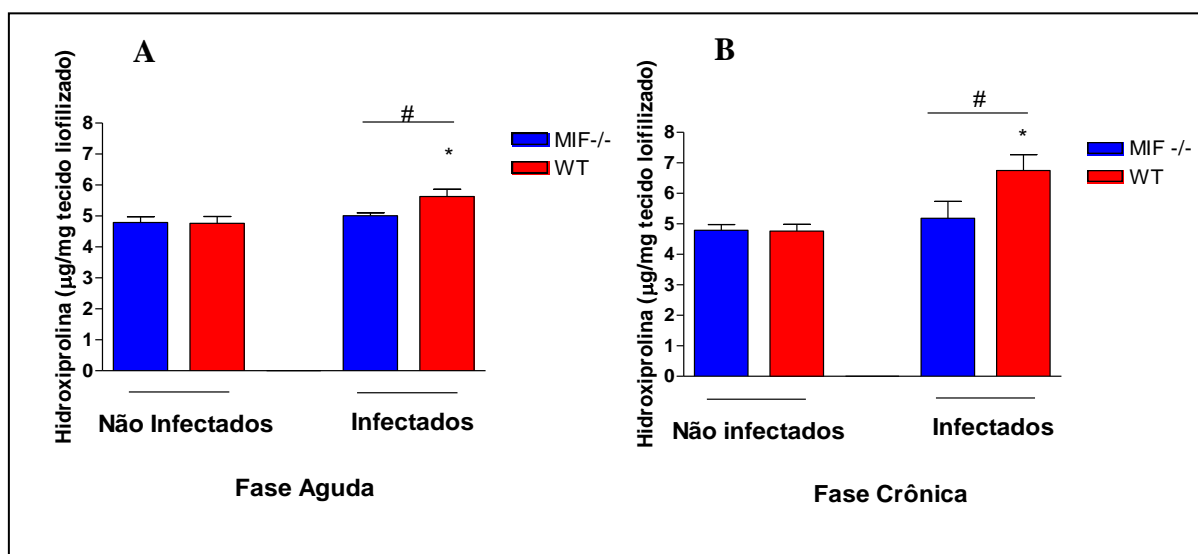


Gráfico 20. O conteúdo de hidroxiprolina no fígado de camundongos WT e MIF^{-/-} durante a fase aguda (A) e fase crônica (B) da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da quantidade de hidroxiprolina estimada no fígado de camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e Balb/c (WT) não infectados, após 8 (fase aguda) e 14 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. Foram processados 8-10 amostras por grupo. * representa p < 0,05 na comparação entre os valores obtidos de camundongos infectados versus não infectados do mesmo grupo experimental e # representa p < 0,05 para camundongos MIF^{-/-} comparados com camundongos WT durante a mesma fase de infecção.

A medida da lesão tecidual hepática foi também realizada tendo em vista a observação do grau de destruição tecidual nos grupos experimentais. A estimativa da atividade de Aspartato Aminotransferase (AST) no soro de camundongos dos diferentes grupos experimentais revelou que a infecção induz a um aumento gradual da atividade enzimática, sendo estatisticamente superior aos não infectados na fase crônica da infecção, porém sem diferença estatística entre os grupos infectados por *S. mansoni* (**gráfico 21**). A quantificação da atividade sérica de Alanina Aminotransferase (ALT) (**gráfico22**) demonstrou um aumento significativo da atividade desta enzima em camundongos infectados por *S. mansoni* tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção de ambos os grupos experimentais. Entretanto, este aumento foi estatisticamente maior no grupo dos animais deficientes na produção de MIF, refletindo uma maior lesão hepática neste grupo de animais durante fase crônica da infecção.

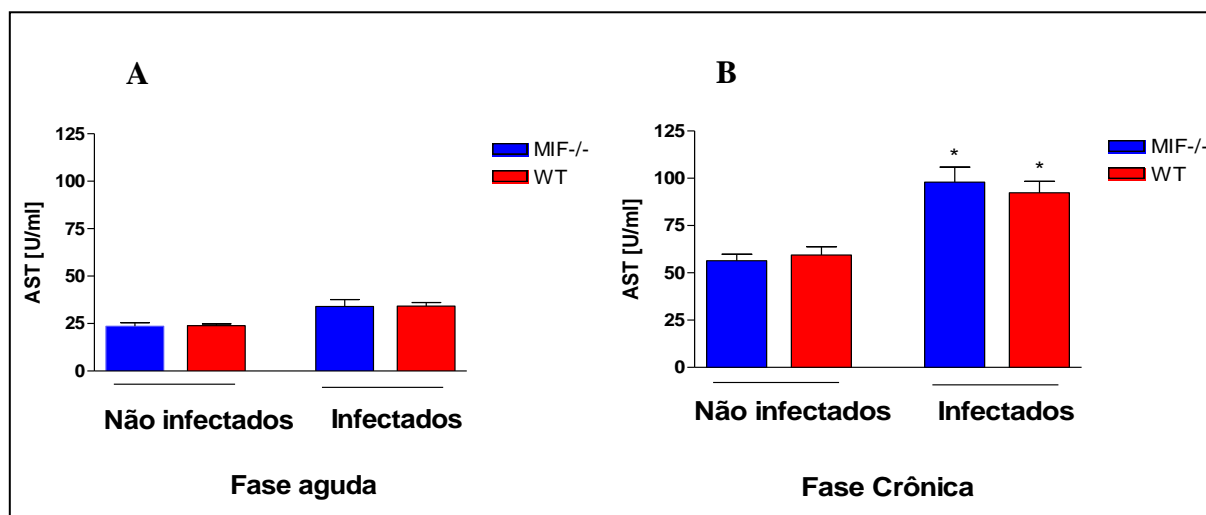


Gráfico 21. Atividade sérica de Aspartato aminotransferase (AST) em camundongos WT e MIF^{-/-} durante a fase aguda (A) e fase crônica (B) da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da atividade de AST sérica em camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e Balb/c (WT) não infectados, após 8 (fase aguda) e 14 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. Foram processados 8-10 amostras por grupo. * representa $p < 0,05$ na comparação entre os valores obtidos de camundongos infectados versus não infectados do mesmo grupo experimental.

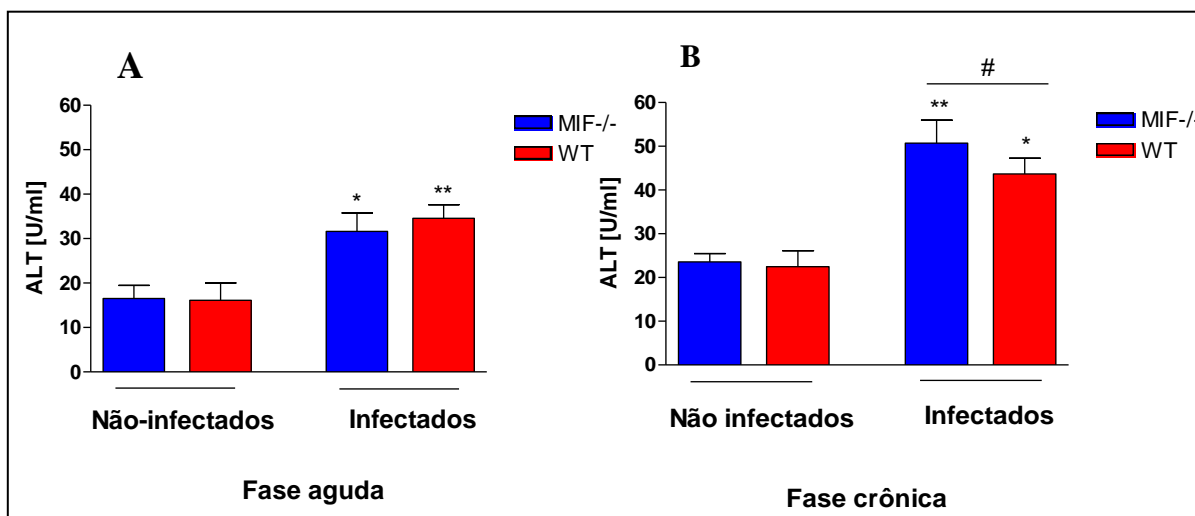


Gráfico 22. Atividade sérica de Alanina aminotransferase (ALT) em camundongos WT e MIF^{-/-} durante a fase aguda (A) e fase crônica (B) da infecção por *S. mansoni*. Os valores representam a média ± EPM da atividade de AST sérica em camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e Balb/c (WT) não infectados após 8 (fase aguda) e 14 (fase crônica) semanas da infecção com 25 cercárias/animal de *S. mansoni*. Foram processados 8-10 amostras por grupo. * e ** representam $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente na comparação entre os valores obtidos de camundongos infectados versus não infectados do mesmo grupo experimental e # representa $p < 0,05$ para camundongos MIF^{-/-} comparados com camundongos WT durante a mesma fase de infecção.

Para finalizar a análise comparativa da gravidade da patologia induzida pela esquistossomose nos animais deficientes na produção de MIF, a taxa de mortalidade dos animais infectados foi avaliada em todos os experimentos. Conforme apresentado no **gráfico 23**, os animais MIF^{-/-} infectados por *S. mansoni* apresentaram uma taxa de mortalidade significativamente maior em comparação com os animais WT.

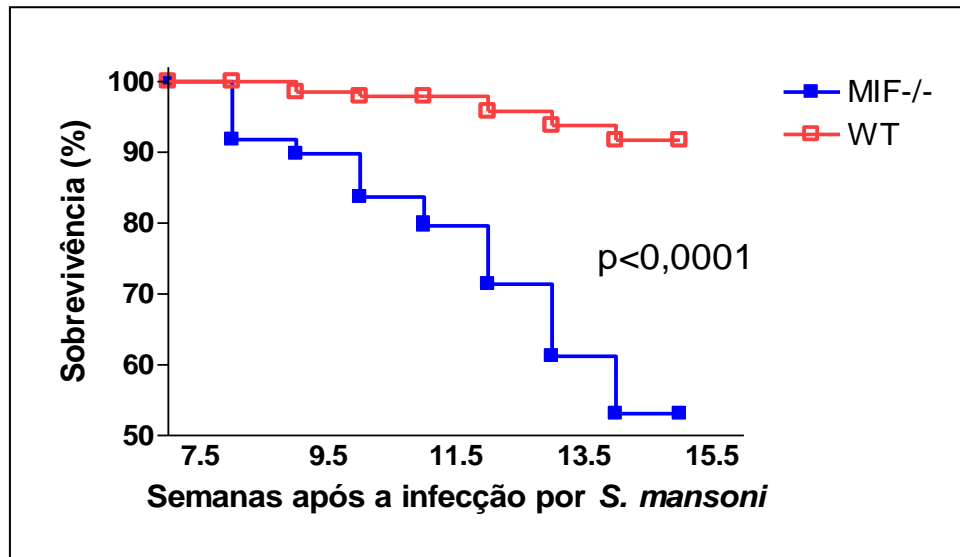


Gráfico 23. Curva de mortalidade induzida pela infecção por *S. mansoni* em camundongos WT e MIF^{-/-}. Foram acompanhados camundongos Balb/c (MIF^{-/-}) e Balb/c (WT) infectados com 25 cercárias/animal durante 14 semanas de infecção (49 animais/grupo). Comparação por Kaplan- Meier, post test Logrank.

7. DISCUSSÃO

Os dados aqui apresentados mostram que a produção de MIF não afeta a suscetibilidade de camundongos à infecção por *S. mansoni*, pois camundongos geneticamente deficientes na produção de MIF (MIF^{-/-}) infectados pelo parasito apresentaram carga parasitária semelhante à dos camundongos não deficientes (WT). A retenção de ovos do parasito nos tecidos do hospedeiro também foi semelhante em ambos os grupos experimentais. Apesar de a contagem de ovos retidos no baço sugerir uma maior retenção de ovos no baço dos animais MIF^{-/-} na fase crônica da infecção, não houve diferença estatística. Além disso, a contagem dos ovos retidos nos pulmões, intestino e fígado foram semelhantes entre ambos os grupos experimentais, tanto na fase aguda como na fase crônica da esquistossomose experimental. Estes dados contrariam trabalhos anteriores em modelos de infecção por helmintos, como *Taenia crassiceps* e *Schistosoma japonicum*. Nesses trabalhos, camundongos geneticamente deficientes na produção de MIF foram mais suscetíveis à cisticercose em comparação com camundongos normais (SATOSKAR *et al.*, 2001; RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2003). Trabalhando com *S. japonicum*, STAVITSKY *et al.*, (2003) demonstraram que a produção de MIF é importante no controle de formas adultas do parasito, e que o bloqueio dessa citocina, através da inoculação de anticorpos neutralizantes, resultou em aumento da carga parasitária e diminuição da fecundidade do parasito. Por outro lado, MAGALHÃES *et al.*, (2009) demonstraram que camundongos C57Bl/6 geneticamente deficientes na produção de MIF e não deficientes apresentaram número semelhantes de vermes recuperados na perfusão sanguínea e de ovos eliminados nas fezes durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*.

Entretanto, apesar de não ter havido diferença quanto à carga parasitária, ou melhor, quanto à intensidade e suscetibilidade à infecção, camundongos Balb/c MIF^{-/-} infectados por *S. mansoni* apresentaram uma taxa de mortalidade significativamente maior em comparação com os animais WT, sugerindo que a patologia induzida pela infecção por *S. mansoni* tenha

sido agravada nos animais deficientes. No intuito de verificar possíveis alterações que justifiquem o aumento da mortalidade induzida pelo parasito em camundongos MIF^{-/-}, foram analisados parâmetros imunológicos e patológicos associados à infecção por *S. mansoni*.

Infecções helmínticas, como é o caso da infecção por *S. mansoni*, induzem a produção de IgG1 e principalmente IgE, anticorpos dependentes de citocinas do perfil Th2. BACHER *et al.*, (1996) têm demonstrado que MIF participa da ativação de células T e B, pois inoculação de anticorpos anti-MIF resultou em inibição da proliferação de células T e a produção de anticorpos por células B *in vivo*. Nossos dados indicam que a ausência de MIF não interferiu significativamente com a indução de reatividade de IgG2a ou IgG1 durante a fase aguda da esquistossomose experimental murina. Na fase crônica da infecção foi detectada pequena redução dos níveis de IgG2a parasito reativo nos animais deficientes a produção de MIF comparado aos não deficientes, mas é importante salientar que a reatividade de IgG2a durante a esquistossomose experimental é muito baixa, não sendo possível precisar a significância biológica deste achado. Diferente da pouca diferença observada nos níveis de IgG1 e IgG2a parasito-reativas, a produção MIF teve um papel importante no aumento de produção de IgE durante a infecção por *S. mansoni*. Os níveis diminuídos de IgE no soro dos animais MIF^{-/-} é um dos indício de que MIF tem importante no desenvolvimento e manutenção da resposta de perfil Th-2 durante a infecção por *S. mansoni*. MIZUE *et al.*, (2005) demonstraram em modelo experimental de asma, que também induz uma resposta de perfil Th2 com altos níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 no lavado broncoalvelar e altos níveis séricos de IgE, que houve uma diminuição significativa da produção de IgE em animais MIF^{-/-} quando desafiados com OVA. Paralelamente, ROSSI *et al.* (2005), demonstraram que há um aumento dos níveis de MIF no lavado broncoalveolar de pacientes asmáticos. Em conjunto, esses dados da literatura corroboram com o descrito neste trabalho experimental e indicam que MIF tem importante participação no desenvolvimento da resposta adaptativa de perfil Th2. Entretanto, a influência

da produção de MIF na resposta humoral detectada neste trabalho experimental difere do que tem sido observado na infecção por *Taenia crassiceps*, em que o nível de IgE foi preservado na ausência de MIF (RODRIGUEZ-SOSA *et al.*, 2003) e dos achados de MAGALHÃES *et al.*, (2009) que demonstraram que a ausência de MIF não interfere com a produção de IgE durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni*. Talvez a diferença na resposta humoral possa estar relacionada com a natureza ou duração do estímulo antigênico nos diferentes modelos experimentais.

Analisando o perfil de resposta imunológica no sítio de retenção do ovo, ou seja, no homogenato hepático de animais MIF^{-/-} e WT, ficou demonstrado que MIF está envolvida na ativação da resposta imunológica e formação do granuloma. Camundongos deficientes na produção de MIF apresentaram diminuição da resposta de perfil Th2, evidenciado por menores níveis de IL-13, IL-4, e, apesar de não estatisticamente significante, diminuídos níveis de IL-5 no parênquima hepático, principalmente durante a fase crônica da infecção. Em contrapartida ao aumento da produção de citocinas do perfil Th2, os dados obtidos durante a infecção por *S. mansoni* demonstraram que a produção de IFN- γ no fígado foi aumentada em camundongos MIF^{-/-}, em comparação com os animais não deficientes na fase crônica da infecção. Esses dados sugerem que a ausência de MIF no estabelecimento da resposta do tipo 2 é prejudicada, afetando o balanço Th1/ Th2 detectado nesta fase da infecção por *S. mansoni*. Estes dados corroboram os achados de KAPLAN *et al.*, (1998), que sugerem que o desenvolvimento do granuloma esquistossomótico é um processo complexo, onde subpopulações Th1 e Th2 regulam o processo, em que a ausência de polarização da resposta Th2 leva ao aumento de uma resposta Th1. Esse balanço tem conseqüências na formação do granuloma e na evolução da patologia de fase crônica. Estes dados são consistentes com estudos prévios que sugerem um papel de regulação cruzada para INF- γ , IL-4 e IL-10 na diferenciação celular entre perfis Th1 e Th2. (CHENSUE *et al.*, 1994; JANKOVIC & SHER,

1996; WYNN *et al.*, 1997,1998; BOROS & WHITFIELD, 1999;1998; FLORES-VILLENUEVA *et al.*, 1994; PEARCE *et al.*,1991; SHER *et al.*, 1991). Porém a regulação cruzada entre Th1 e Th2 não explica todo o processo de regulação do granuloma esquistossomótico. A falência da resposta granulomatosa em mudar para Th1 em animais privados de IL-4 sugere que a reação cruzada entre os dois tipos de respostas não ocorra (METWALI *et al.*, 1996; RAKASZ *et al.*, 1998). Sabe-se da participação de outras subpopulações de células T que também participam da formação e regulação do granuloma como as Treg (HESSE *et al.*, 2004) ,e mais recentemente, ficou demonstrada a participação da subpopulação Th17 (RUTITZKY & STADECKER, 2006) durante a infecção experimental. E há indícios mostrando que o balanço entre a ativação e atuação entre os vários tipos de subpopulações de células T seja determinante durante a infecção (ANTHONY *et al.*, 2007).

Inicialmente a produção de MIF foi descrita como uma citocina pró-inflamatória clássica, isto é, uma citocina envolvida com indução e amplificação da resposta de perfil Th-1 (CALANDRA *et al.*, 1994; CALANDRA *et al.*, 1995; BACHER 1997; DONNELLY *et al.*, 1997; FLASTER *et al.*, 2007). Posteriormente, foi verificado que a produção de MIF também está associada com amplificação e manutenção de resposta imune de perfil Th2, como demonstrado por vários autores (ROSSI *et al.*, 1998; YAMAGUCHI *et al.*, 2000; BACHER *et al.*, 1996). Nossos dados também confirmam a importância da produção de MIF no desenvolvimento da resposta Th2 durante a infecção por *S. mansoni* em camundongos. Esses dados claramente indicam que MIF não é um mediador unidirecional envolvido exclusivamente na ativação imunológica ambiente Th1, mas sim uma citocina que atua de acordo com o ambiente de citocinas prevalente, sendo um potente amplificador da inflamação independente do perfil de resposta predominante. Nossos resultados sugerem que MIF, em contexto de uma resposta inflamatória do tipo 2, como no granuloma esquistossomótico e em inflamações alérgicas (MIZUE *et al.*, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2008), pode acelerar o

desenvolvimento de uma reatividade do tipo 2, incluindo a atração de macrófagos, eosinofilia e a indução de macrófagos alternativamente ativados. Recentemente, a expressão de proteína homóloga a MIF tem sido documentada em uma variedade de parasitos infectantes ao homem, incluindo o protozoário *Plasmodium falciparum* e *Leishmania major* e em alguns helmintos *Brugia malayi* e *Trichinella spiralis*, *Wuchereria bancrofti* (PRIETRO-LAFUENTE *et al.*, 2008). A caracterização da produção de proteína homóloga à MIF de mamíferos em espécies de parasitos, põe em discussão se a produção de moléculas mímicas do parasito tenha função de contrabalançar o efeito da citocina produzida pelo próprio hospedeiro e/ou se auxilia o estabelecimento de uma resposta imunológica que seja favorável à sobrevivência do parasito no hospedeiro. O papel de MIF em regular a ativação alternativa de macrófagos foi relatado na infecção por *Brugia malayi* (FALCONE *et al.*, 2001). Esses autores relatam que a produção de proteína homóloga à MIF pelo verme pode agir de forma sinérgica com IL-13 e IL-4 na ativação da resposta Th2. Estes dados sugerem que a produção de proteína homóloga à MIF pelo parasito contribui para conter a inflamação do tipo 1 durante a infecção pelo helminto. Aparentemente, na esquistossomose, a ligação de MIF com a produção de colágeno existe, e apesar da necessidade de estudos adicionais para um melhor esclarecimento, esta atuação pode estar relacionada com a atividade de AAM.

Outro resultado que merece destaque na avaliação de citocinas foi que a quantificação dos níveis de TNF- α no homogenato hepático de camundongos infectados por *S. mansoni* não apontou diferenças no nível desta citocina entre os grupos experimentais. Trabalhos demonstraram que a produção de MIF estimula a indução da produção de TNF- α por macrófagos (CALANDRA *et al.*, 2004; CALANDRA & ROGER, 2003), entretanto estes dados foram obtidos em condições experimentais que ativam predominantemente uma resposta do tipo 1. Em um ambiente predominante do tipo 2, como no granuloma esquistossomótico, a produção de TNF- α parece não ser afetada pela ausência de MIF.

O mecanismo preciso pelo qual MIF promove a resposta Th2 permanece a ser esclarecido. MIZUE *et al.*, 2005 demonstraram que MIF produzido e secretado por células apresentadoras de antígenos pode ser determinante no processo de diferenciação celular e na manutenção da resposta imune adaptativa do tipo 2. MICTHELL *et al.*, (1999) sugerem que a indução da sinalização via ERK-1/2 através da cascata de ativação de MAPKinase pode ser essencial para a hiperreatividade induzida pelo parasito e para a resposta inflamatória do tipo 2. No modelo de asma experimental e arteriosclerose a produção de MIF tem efeito quimiotático sobre monócitos e linfócitos (MIZUE *et al.*, 2005; SCHOBER *et al.*, 2008). Adicionalmente, MIF se liga aos receptores de quimiocinas CXCR2 e CXCR4, podendo apresentar funções de quimiocina e age como regulador do recrutamento celular inflamatório (BERNHAGEN *et al.*, 2007). No entanto, em contraste aos ligantes CXCL8 e CXCL12, os quais agem de uma maneira restrita, MIF promove o recrutamento de ambos, monócitos e células T, por interagir com CXCR2 e CXCR4 respectivamente. Além do efeito no recrutamento celular para o sítio inflamatório, STAVITSKY & XIANLI, (2002) mostraram que MIF pode regular a resposta imune por modular a expressão de moléculas chave na ativação celular. Esses autores relataram que MIF aumenta a expressão de B7-1 pelas células B e CD40L pelas células T, em cultura de células B e macrófagos de camundongos infectados por *S. mansoni*, ou seja, a ativação de células B e T apresentam-se diminuídas em animais deficientes de MIF, pois a expressão de receptores importantes na interação entre linfócitos B e T é diminuída. Nesse sentido, a produção diminuída de IgE e de citocinas do perfil Th2 induzida pela infecção experimental por *S. mansoni* em camundongos deficientes na produção de MIF corroboram os dados apresentados por STAVITSKY & XIANLI, (2002). Assim, apesar de não quantificarmos a expressão moléculas co-estimulatórias estes resultados parecem ter ligação com os nossos dados e podem ser motivo de investigações posteriores em nosso modelo de infecção por *S. mansoni*. STAVITSKY & XIANLI (2002) também

demonstraram que MIF pode interferir e modular a expressão de MHC-II, B7-2, CD40, ICAM-1, CR1/CR2 e receptores para IL-10 e a expressão intracelular de IL-10, TNF- α e p40 (IL-12) através da estimulação de altas concentrações de MIF recombinantes à cultura de vários tipos de células através de ensaios de citometria de fluxo.

Associado às alterações detectadas no padrão de produção de citocinas e na resposta humoral, a ausência de MIF também resultou em diminuição da resposta inflamatória celular ao redor dos ovos do parasito, confirmadas pelos ensaios de atividade enzimática (EPO, NAG, MPO) e pela análise de lâminas confeccionadas de tecido hepático dos camundongos infectados por *S. mansoni*. A quantificação de atividade enzimática EPO e NAG é uma medida indireta da concentração/ativação de eosinófilos e macrófagos, respectivamente. Há vários relatos na literatura demonstrando que MIF é uma citocina que atua na quimiotaxia, ativação e manutenção da sobrevivência celular durante a inflamação (CALANDRA *et al.*, 1994, SABROE *et al.*, 2000; MIZUE *et al.*, 2005; BERNHAGEN *et al.*, 2007; MAGALHÃES *et al.*, 2007; NAKAMURU *et al.*, 2005). O recrutamento e ativação de eosinófilos (ROSSI *et al.*, 1998) e macrófagos (CALANDRA *et al.*, 1994) faz com que estas células também produzam MIF, aumentando a possibilidade de retro-alimentação do estímulo durante o processo inflamatório. Adicionalmente, trabalhos experimentais têm demonstrado a importância de MIF no acúmulo de células inflamatórias no tecido, através da estimulação da expressão de moléculas de adesão nos endotélios (LAN *et al.* 1997; ROSSI *et al.*, 1998; MIZUE *et al.*, 2005).

Em nosso modelo experimental foi possível confirmar a importância de MIF sobre o recrutamento de eosinófilos durante a infecção por *S. mansoni*. Estes dados corroboram os relatados por MAGALHÃES *et al.* (2009), que demonstraram que MIF é essencial no recrutamento de eosinófilos para o granuloma esquistossomótico na fase aguda da infecção. Além disso, os autores demonstraram que a relação de MIF e eosinófilos vai além da

quimiotaxia, pois seus achados demonstram claramente que a produção de MIF é requerida como um fator de sobrevivência durante a diferenciação de eosinófilos induzida por IL-5. Entretanto, além de MIF, outras citocinas, como GM-CSF, IL-5, IL-3, IL-5 e eotaxina são fatores que atuam na ativação e aumento da sobrevivência de eosinófilos nos tecidos, provavelmente atuando após a transmigração celular. Portanto, na ausência de produção de MIF, não podemos descartar a possibilidade de que outros elementos da resposta imunológica possam colaborar no recrutamento, ativação e sobrevivência de eosinófilos que foi restabelecido na fase crônica da infecção em animais MIF^{-/-} infectados por *S. mansoni*. Além do efeito sobre eosinófilos, a ausência de MIF resultou em aumento significativo na atividade de MPO no homogenato hepático da fase crônica da infecção por *S. mansoni*, sugerindo maior participação de neutrófilos no granuloma esquistossomótico destes animais. É possível que as alterações na composição celular verificada no granuloma esquistossomótico formado em camundongos MIF^{-/-}, altere significativamente a produção de elementos quimiotáticos locais. Neste sentido é importante salientar que neutrófilos não expressam CD74, um dos receptores de MIF (BAUMANN *et al.*, 2003; BERNHAGEN *et al.*, 2007).

Uma das diferenças mais marcantes detectadas no decorrer da infecção por *S. mansoni* em camundongos MIF^{-/-}, foi a redução do recrutamento de macrófagos para o granuloma, pois tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção o infiltrado macrofágico foi significativamente menor nos camundongos MIF^{-/-}, verificado pela redução do nível de atividade de N-acetil-glicosaminidase e pela constatação da grande redução desta célula na análise histopatológica. Outros trabalhos demonstraram que a ausência ou o bloqueio de MIF influencia negativamente a infiltração de macrófagos (MIZUE *et al.* 2005; BERNHAGEN, *et al.*,2007). Além de atuar na quimiotaxia de células inflamatórias, MIF também suprime apoptose celular mediada por p-53 e este efeito pode sustentar a resposta inflamatória de forma mais eficaz (MITCHEL *et al.*, 2002). MIF também aumenta a produção de IL-2, a

expressão do receptor de IL-2 e de células T de memória, além de influenciar a diferenciação Th1/Th2 em infecções experimentais (BACHER *et al.*, 1996). A observação de que a expressão de MIF persiste em doenças estabelecidas tem sustentado a hipótese de que esta citocina tenha papel na manutenção do processo inflamatório (DONELY & BUCALA, 1997).

Trabalhos anteriores demonstraram que a reação granulomatosa ao redor de ovos de *S. mansoni* é significativamente suprimida por anticorpos dirigidos contra macrófagos e eosinófilos, indicando que estas células são mediadores importantes desta resposta inflamatória (BOROS & WARREN, 1971; MAHMOUD *et al.*, 1975). Granulomas isolados de fígados de camundongos no final da fase aguda da infecção e estimulados *in vitro*, liberaram citocinas que atuam especificamente em macrófagos e eosinófilos (BOROS *et al.*, 1973), células que participam no seqüestro de antígenos do parasito que extravasam para o parênquima hepático e são altamente tóxico ao tecido.

Infecções crônicas por helmintos são tipicamente associadas a uma resposta imunológica com perfil Th2, na qual macrófagos alternativamente ativados são proeminentes. Investigações indicaram que MIF estimula a transcrição de YM1 em macrófagos, que além de atuar como fator quimiotático para eosinófilos (OHWASI *et al.*, 2000; FALCONE, 2001), está associado à ativação alternativa de macrófagos (KLEEMANN *et al.*, 2000; ZANG *et al.*, 2002). YM1 foi detectada em camundongos deficientes em IL-4 e IL-5, sugerindo que MIF possa agir diretamente para induzir a produção de YM1. FALCONE *et al.*, (2001) sugere também que MIF possa ser o primeiro estímulo para macrófagos iniciar a diferenciação alternativa, mas outros fatores são necessários para que o processo se complete. Recentemente PRIETO-LAFUENTE *et al.* (2009) mostrou que MIF atua na regulação do receptor de IL-4 em macrófagos, e que juntamente com IL-4 resultou em aumento da expressão de marcadores da ativação alternativa destas células. Como demonstrado por HERBERT *et al.* (2004) a ativação alternativa de macrófagos é importante na regulação da resposta Th1 e da

imunopatologia na esquistossomose. Estimulação de macrófagos *in vitro* com elevados níveis de IL-4 e IL-13 e IL-21 reprimem a síntese de iNOS e estimulam a produção de arginase, enzima envolvida na produção de prolina, a partir de arginina (PESCE *et al.*, 2006; WYNN, 2004). A prolina é um importante precursor do colágeno (GORDON, 2003). Numerosos estudos têm apontado que macrófagos e fibroblastos são as principais células envolvidas na patogênese da fibrose. Apesar de células T CD4+ serem essenciais, a sua principal contribuição pode ser o controle da ativação e o recrutamento de macrófagos e fibroblastos (HESSE *et al.*, 2000; HESSE *et al.* 2001). Lembrando que os níveis de IL-4 e IL -13 foram diminuídos na fase crônica da infecção, é possível que a ativação alternativa dos macrófagos que compõem o granuloma possa também estar diminuída. A diminuição da quantidade de macrófagos no sítio inflamatório aliado a redução de ativação destas células pode ser responsável pela reduzida produção de colágeno observada no granuloma formado em camundongos MIF^{-/-} durante a infecção por *S. mansoni*.

A produção elevada de IL-13 (CHIARIMONT *et al.*, 1999; FALLON, 2000), eosinofilia tecidual (REIMAN *et al.*, 2006), e a ativação de macrófagos alternativamente ativados (HERBERT *et al.*, 2004) têm sido associado com fibrose hepática e a consequente hipertensão portal, principal causa de morbidade grave durante a fase crônica da infecção por *S. mansoni*. A nossa análise da deposição tecidual de colágeno em camundongos infectados por *S. mansoni* confirma que MIF é essencial neste processo, desde que, a deposição de colágeno no granuloma desenvolvido em camundongos MIF^{-/-} foi menor em comparação com os animais WT. Adicionalmente, a ausência de MIF afetou a produção de citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) e a infiltração de macrófagos e eosinófilos para o granuloma, podendo ser a razão para a diferença na produção e deposição de colágeno. Estudos usando camundongos deficientes na produção de várias citocinas mostraram que a fibrogênese está fortemente associada com o desenvolvimento de uma resposta do tipo Th2, envolvendo IL-4, IL-5 e IL-13 (WYNN, *et al.*,

1995). Apesar de uma potente resposta inflamatória se desenvolver quando células de perfil Th1 são predominantes, sob estas circunstâncias, o desenvolvimento da fibrose tecidual é completamente atenuado. Estes estudos mostram que a inflamação crônica nem sempre induz a deposição de elementos conectivos teciduais e que a magnitude da fibrose é regulada pelo desenvolvimento e fenótipo das células T coordenado por citocinas do tipo 2 (WYNN *et al*, 2004). IL-13 é a principal citocina pró-fibrótica, sendo sugerido que IL-13 está fortemente envolvida com a patologia da esquistossomose, devido ao seu potente efeito pró-fibrótico que é dependente da sinalização via ativação do receptor II de IL-13, ou seja, independente de IL-4 (RAMALINGAN *et al.*, 2008). O baixo nível de IL-13 dos animais MIF^{-/-} na fase crônica, coincide com a menor deposição de colágeno, quantificada através do ensaio de hidroxiprolina, em comparação com os animais WT. Nossos dados se contrapõem ao apresentado por RODRIGUEZ-SOSA *et al.* (2003) que, trabalhando com os modelos de infecção de *Taenia crassiceps*, demonstram um aumento significativo da produção de IL-13 em animais Balb/c deficientes na produção de MIF comparado ao detectado em não deficientes. Posteriormente, MAGALHÃES *et al* (2009) mostraram que camundongos C57BI/6-129/SV F2 deficientes na produção de MIF e infectados por *S. mansoni* produziam níveis de IL-13 compatíveis com os animais não deficientes, mas os autores só analisaram a fase aguda da infecção. Em nosso trabalho, apesar do nível de IL-13 ser diferente entre os grupos somente na fase crônica da infecção, a deposição de colágeno já foi menor nestes animais desde a fase aguda, em que os níveis desta citocina foram semelhantes. Por isso acreditamos que fatores adicionais à produção de IL-13 possam interferir nesta deposição de colágeno. Talvez um menor número de eosinófilos e macrófagos em decorrência da ausência de MIF como anteriormente discutido, já que há relatos na literatura de que estas células possam estar envolvidas neste processo de fibrose e patologia.

HUMBLES *et al.*, (2004) demonstraram que eosinófilos também são importantes no processo de deposição de colágeno e remodelação tecidual no modelo de imunização e desafio por OVA (ovalbumina), utilizando camundongos deficientes na diferenciação de eosinófilos. Assim, é possível que a diminuição de eosinófilos durante a fase aguda da infecção por *S. mansoni* em camundongos MIF^{-/-}, possa colaborar com a diminuição da deposição de hidroxiprolina tecidual nestes animais, mesmo na presença de IL-13, pois eosinófilos podem ser origem de importantes citocinas fibrogênicas (tal como TGF- β e IL-13). Posteriormente, apesar da eosinofilia tecidual se tornar semelhantes em comparação com os animais WT, a persistência de uma diminuída deposição de colágeno possa ser em decorrência da diminuição dos níveis de IL-13 e de AAM, que segundo HERBERT *et al.*, (2004) são fundamentais o desenvolvimento da imunopatologia através da produção de colágeno.

Nossos dados demonstram que camundongos Balb/c geneticamente deficientes na produção de MIF infectados por *S. mansoni* desenvolveram um granuloma menor, com menor celularidade e menor deposição de colágeno, mas a infecção nestes animais resultou em maior taxa de mortalidade. Assim, nesta linhagem de camundongos, a redução do granuloma esquistossomótico e da resposta Th2 foi associado a maior mortalidade dos animais. Alguns trabalhos experimentais (STADECKER & HERNANDEZ, 1998; HOFFMANN *et al.*, 2000; RUTITZKY *et al.*, 2001) sugerem que a formação do granuloma constitui um importante mecanismo de defesa do hospedeiro, pois é capaz de seqüestrar toxinas secretadas pelo ovo do parasito retido no tecido, protegendo-o da lesão hepática mais intensa e aguda. O estabelecimento de uma resposta granulomatosa no curso da doença é de fundamental importância para prevenir um quadro agudo letal marcado pela predominância de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1. Neste sentido, animais imunossuprimidos ou atímicos desenvolveram resposta granulomatosa diminuída, composta principalmente por macrófagos

imaturos, com presença de necrose liquefativa no fígado e no pulmão, com severa destruição do parênquima tecidual, liberação de enzimas hepáticas e morte precoce dos hospedeiros (AMSDEN *et al.*, 1980). Infecções em camundongos tolerizados contra antígenos de ovos do parasito também não desenvolvem granuloma ao redor dos ovos retidos em tecidos, e como consequência apresentaram lesões hepáticas mais graves (FALLON & DUNNE, 1999; DUNNE & DOENHOFF, 1983). Portanto, a formação de granulomas menores, incapazes de conter os produtos antigênicos provenientes do ovo do parasito, também podem ser lesivos aos tecidos do seu hospedeiro. Para confirmar um possível efeito hepático lesivo decorrendo da formação de granulomas pequenos e incapazes de conter os antígenos produzidos pelos ovos do parasito, foram quantificados marcadores de lesão hepática, transaminase oxalacética (AST ou TGO) e transaminase pirúvica (ALT ou TGP). Os nossos resultados demonstraram que apesar de níveis iguais de AST, uma maior produção de ALT, que segundo AWDALLA *et al.*, (1975) é mais específica de células hepáticas, foi constatada no soro de animais MIF^{-/-} em comparação com os animais WT. Esse resultado corrobora com nossa hipótese de que o papel protetor desempenhado pelo granuloma não foi atingido nos camundongos geneticamente deficientes na produção de MIF, gerando uma lesão hepática mais intensa no fígado destes animais.

É essencial ressaltar que, em modelos murinos, diferentes linhagens de camundongos apresentam diferenças na suscetibilidade e na patologia da esquistossomose. Dessa forma, camundongos C3H e CBA desenvolvem reações granulomatosas mais proeminentes, enquanto BL/6 e BALB/c desenvolvem lesões significativamente menores quando desafiados com mesmo número de cercárias (STADECKER *et al.*, 2004). DAJEM *et al.*, (2008) demonstraram que camundongos C57BL/6 são mais suscetíveis à infecção em comparação com camundongos Balb/c. Assim, ao utilizarmos camundongos Balb/c, linhagem que originalmente produz uma resposta granulomatosa menos intensa, podemos ter comprometido

o componente protetor do granuloma. Entretanto, é possível que a ausência de MIF possa reduzir a patologia crônica em outras linhagens de camundongos ou outros hospedeiros, onde a resposta granulomatosa ao redor do ovo é muito intensa.

Nesse contexto, apesar da importância do caráter multifatorial que está envolvido na evolução da esquistossomose humana, nossos dados indicam que diferenças na produção de MIF em humanos possa estar associada à lesão hepática e com o grau de fibrose do paciente, podendo ser um candidato a biomarcador da doença. Claro que considerações dessa natureza são reducionistas, porque levam em consideração apenas uma variável deste enorme mosaico de fatores que provavelmente atuam em conjunto no desenvolvimento de formas graves da esquistossomose humana, entretanto, podem ter uma grande aplicação clínica e merecem um estudo mais detalhado.

Em conclusão, a ausência de MIF em camundongos Balb/c foi prejudicial ao hospedeiro durante a evolução da infecção por *S. mansoni*, apesar de não afetar a carga parasitária. Este fato é decorrente do aumento drástico na taxa de letalidade de camundongos MIF^{-/-} infectados que ocorreu a partir da postura e retenção de ovos do parasito nos tecidos deste hospedeiro. O aumento da mortalidade ocorreu apesar da diminuição da celularidade e da deposição de colágeno no granuloma, que são parâmetros associados à morbidade da esquistossomose na fase crônica da infecção, e foi coincidente com redução de citocinas do perfil Th2, aumento de IFN- γ e aumento da lesão hepática. Esses resultados evidenciam um papel fundamental de MIF na formação do granuloma e desenvolvimento da patologia associada à esquistossomose murina.

8. CONCLUSÕES

- Camundongos Balb/c geneticamente deficientes na produção de MIF apresentam maior taxa de mortalidade em decorrência da infecção por *S. mansoni* que camundongos Balb/c não deficientes.
- A avaliação parasitológica demonstrou que a ausência de MIF não alterou o número de vermes, a deposição de ovos no fígado e no intestino e o número de ovos eliminados nas fezes dos animais experimentalmente infectados por *S. mansoni*, tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção.
- A ausência de MIF não alterou a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-17 ou da citocina modulatória IL-10 no fígado dos camundongos infectados por *S. mansoni*. Entretanto, animais MIF^{-/-} apresentaram produção reduzida de citocinas do perfil Th2, especialmente IL-4, e aumento de IFN- γ no fígado na fase crônica da esquistossomose experimental.
- Nos camundongos Balb/c geneticamente deficientes na produção de MIF o granuloma induzido pela deposição de ovos de *S. mansoni* no fígado apresentou redução de celularidade, especialmente de eosinófilos e macrófagos, e da deposição de colágeno.
- A infecção por *S. mansoni* em camundongos MIF^{-/-} resultou em maior lesão hepática, detectada pelo aumento significativo dos níveis séricos de ALT durante a fase crônica da infecção, que pode estar envolvido com aumento da mortalidade nesse grupo experimental.

- Em conjunto, os dados apresentados indicam que MIF participa da formação do infiltrado celular inflamatório, atuando principalmente em eosinófilos e macrófagos e da indução da resposta do tipo 2, durante a formação do granuloma esquistossomótico hepático, e que a formação adequada do granuloma é importante na proteção do hospedeiro contra possíveis lesões hepáticas induzidas por antígenos do ovo do parasito.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F.G.C., MORAIS, C.N.L., MONTENEGRO, C.E.L., WYNN, T.A., MONTENEGRO, S.M.L. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends in Parasitology*, v. 22, p. 85-91, 2006.

AGGARWAL, S., GHILARDI, N., XIE, M.H., DE SAUVAGE, F.J., GURNEY, A.L. Interleukin-23 promotes a distinct CD4T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol. Chem.*, v. 278, p.1910-1914, 2003.

AMARAL R.S., PORTO M.A.S. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. *Rev Soc Bras Méd Trop.*, v. 27, p.73-90, 1994.

AMIRI, P. LOCKSLEY, R.M. PARSLOW, T.G. SADICK, M. McKERROW, J.H. tumor necrosis factor restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*, v. 356, p. 604-607, 1992.

AMSDEN, A. F., D. L. BOROS, AND A. T. HOOD. Etiology of the liver granulomatous response in *Schistosoma mansoni* infected athymic nude mice. *Infect. Immun.*, v. 27, p.75-80, 1980.

ANDRADE, Z.A. A Patologia da Esquistossomose Humana. In CARVALHO, O.S., COELHO, P.M.Z., LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar*. 1^a edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.

ANDRADE, Z.A. Hepatopathy Schistosomal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 51-57, 2004

ANDRADE, Z.A. & WARREN, K.S. Mild prolonged schistosomiasis I mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 58, p. 53-57, 1964.

ANDRADE, Z.A. & PRATA, A. Asymptomatic schistosomiasis studied by needle biopsy of the liver. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 5, p. 236-242, 1963.

ANTHONY, R.M., RUTITZKY, L.I., JOSEPH, F., URBAN, JR., STADECKER, M.J. GAUSE, W.C. Protective immune mechanism in helminth infection. *Nature Review Immunology*, v. 7, p. 975-987, 2007.

ARAUJO, M.I., DE JESUS, A.R., BACELLAR, O. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *Eur. J. Immunol.*, v. 26, p.1399-1403, 1996.

AWDALLA, H.N., SHERIF, A.E., SHAFEI, A.Z., KHALIL, H.A., GUIRGISF.K. Enzyme levels in homogenates of liver from mice infected with *S. mansoni* and from uninfected mice. *Intl. J. Parasitol.*, v. 5, p. 27-31, 1975.

BACHER, M., METZ, C.N., CALANDRA, T., MAYER, K., CHESNEY, J., LOHOFF, M. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v. 93, p.7849-7854, 1996.

BACHER, M., MEINHARDT, A., LAN, H.Y., MU, W., METZ, C.N., CHESNEY, J.A., CALANDRA, T., GEMSA, D., DONNELLY, T., ATKINS, R.C., BUCALA, R. Migration

inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am. J. Pathol*, v.150, p. 235-246, 1997.

BAUMANN, R., CASALTA,C., SIMON, D., CONUS, S., YOUSEFI, S., HANS-UWE SIMON, H. Macrophage migration inhibitory factor delays apoptosis in neutrophils by inhibiting the mitochondria-dependent death pathway. *The FASEB Journal*, v. 17, p. 2221-2230, 2003.

BAILEY, P. J. Sponge implants as model. *Methods in Enzymology*, v. 162, p. 327-334, 1988.

BARBOSA, C.S., FAVRE, T.C., AMARAL, R.S., PIERI, O.S. Epidemiologia e controle da Esquistossomose mansoni. In *Schistosoma mansoni & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar*. 1ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.

BARCELOS, L.S., TALVANI, A., TEIXEIRA, A.S., VIEIRA, L.Q., CASSALI, G.D., ANDRADE, S.P., TEIXEIRA, M.M. Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 78, p. 352-358, 2005.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G., GAZZINELLI, G., ELOI-SANTOS, S.M., CUNHA-MELO, J.R., ALVES-OLIVEIRA, L.F., SILVEIRA, A.M.S., VIANA, I.R.C., CARMO, J., SOUZA, A., CORR^EA-OLIVEIRA,R. Differential cellular reactivity to adult worm antigens of patients with different clinical forms of *Schistosomiasis mansoni*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med.Hyg.*, v. 86, p. 57-61, 1992.

BERNHAGEN, J., KROHN, R., LUE, H., GREGORY, J.L., ZERNECKE, A., KOENEN, RR., DEWOR, M., GEORGIEV, I., SCHOBER, A., LENG, L., KOOISTRA, T., FINGERLE-ROWSON, G., GHEZZI, P., KLEEMANN, R., MCCOLL, S.R., BUCALA, R., HICKEY, M.J., & WEBER, C. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature Medicine*, v. 13, p. 587-596, 2007.

BERNHAGEN, J., CALANDRA, T., BUCALA, R. Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features, *J. Mol. Med.*, v. 76 p.151-161, 1998.

BERNHAGEN, J., R.A. MITCHELL, T. CALANDRA, W. VOELTER, A. CERAMI, ANDR. BUCALA. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry*, v. 33, p.14144-14155, 1994.

BERNHAGEN, J., CALANDRA, T., MITCHELL, R.A., MARTIN, S.B., TRACEY, K.J., VOELTER, W., MANOGUE, K.R., CERAMI, A., BUCALA., R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxemia, *Nature*, v. 365, p, 756-759, 1993.

BLOOM, B.R., & B. BENNETT. . Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science*, v. 153, p. 80, 1996.

BINA, J.C. & PRATA, A. Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarendi: I-*Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop.*, v.36, n2, p. 211-216, 2003.

BOGEA, T., FAVRE, T. C., ROTENBERG, L., SILVA, H. S., PIERI, O. S. Circadian pattern of cercarial emergence in *Schistosoma mansoni* (Plathelmyntes: Digenea) from isolated *Biomphalaria glabrata*. ***Chronobiol Int***, v.13, n. 2, p. 93-101, 1996.

BOGLIOLO, L. Anatomical bases of hepatosplenic *Schistosomiasis mansoni* (thehepatosplenic form of schistosomiasis) and their clinical applications. ***Resen. Clin. Cient.***, v. 27, p. 86-89, 1958.

BOGLIOLO, L. & NEVES, J. Ocorrência de hepatite na forma aguda ou toxêmica da esquistossomose mansônica, antes da maturação dos vermes e da postura dos ovos, com algumas considerações sobre a forma aguda ou toxêmica da esquistossomose. ***Anais da Faculdade de Medicina de Minas Gerais***, v. 22, p. 47-74, 1965.

BOOTH, M. Periportal fibroses in human *Schistosoma mansoi* infection is associated with low IL-10, low INF- γ , high TNF- α or low RANTES, depending on age and gender. ***J. Immunol.***, v.172, p.1295-1303, 2004.

BOROS, D.L. & WARREN, K.S. Delayed Hypersensitivity-Type Granuloma Formation And Dermal Reaction Induced And Elicited By a Soluble Factor Isolated From *Schistosoma Mansoni* Eggs. ***J. Exp. Med.***, p .488-507, 1970.

BOROS, D.L., WARREN, K.S., PELLELY, R.P. The secretion of migration inhibition factor by intact schistosome egg granulomas maintained in vitro. ***Nature***, v. 246, p.224-226, 1973.

BOROS, D.L., PELLEY, R.P., WARREN, K. S. Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.*, v. 14, p.1437-1441, 1975

BOROS, D.L. Immunopathology of Schistosoma mansoni Infection. *Clinical microbiology reviews*, v. 2, n.3, p. 250-269, 1989.

BOTTIEAU, E., CLERINX J, DE VEGA M.R, et al. Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. *J Infect.*, v. 52, p. 339-45, 2006.

BOZZA, M.A., SATOSKAR, R., LIN, G., LU, B., HUMBLE, A.A., GERARD, C., DAVID J.R. Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis, *J. Exp. Med.*, v. 189, p. 341-346, 1999.

BOZZA, F.A., GOMES, R.N., JAPIASSU, A.M., SOARES, M., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., BOZZA, P.T., BOZZA, M.T. Macrophage migration inhibitory factor levels correlate with fatal outcome in sepsis. *Shock*, v. 22, p. 309-313, 2004.

BRUNET, L.R., FINKELMAN, F.D., CHEEVER, A.W., KOPF, M.A., PEARCE, E.J. IL-4 protects against TNF- α -mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J. Immunol.*, v.159, p.777-785, 1997.

BUTTERWORTH, A.E. Immunity ad morbidity in human schistosomiasis. *Tropical Geographical Medicine*, v. 46, p.197-208, 1994.

BUTTERWORTH, A.E., CAPRON, M., CORDINGLEY, J.S., DALTON, P.R., DUNNE, D.W., KARIUKI, H.C., KIMANI, G., KOECH, D., MUGAMBI, M., OUMA, J.H., PRENTICE, M.A., RICHARDSON, B.A., ARAP-SIONGOK, T.K., TAYLOR, D.W. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune response. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.79, p. 393-408, 1985

CALANDRA, T., BERNHAGEN, J., MITCHELL, R. A., BUCALA, R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J. Exp. Med.*, v.179, p.1895-1902, 1994.

CALANDRA, T., BERNHAGEN, J., METZ, C.N., SPIEGEL, L.A. BACHER, M., DONNELLY, T., CERAMI, A., BUCALA, R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature*, v. 377, p.68-71, 1995.

CALANDRA, T., ROGER, T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol.*, v.3, p.791-800, 2003.

CALDAS, I.R., CAMPI-AZEVEDO, A.C., OLIVEIRA, L.F.A., SILVEIRA, A.M.S., CORREA-OLIVEIRA, R., GAZZINELLI, G. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Tropica*, v.108, p.109-117, 2008.

CAPRON, A. & DESSAINT, J.P. Effector and regulatory mechanisms in immunity to schistosomes: a heuristic view. *Annals Review of Immunology*, v. 3, p. 455-476, 1985.

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

CARVALHO, A.T., FILHO, O.A.M., CORREA-OLIVEIRA, R.. A Resposta Imune na Forma Crônica da Esquistossomose Mansoni. In CARVALHO, O.S., COELHO, P.M.Z., LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar*. 1^a edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.

CHAO, Y., JONES, B.F., VERMIERE, J.J., LENG, L., DIFEDELE, L., HARRISON, L.M., XIONG, H., KWONG, Y.A., CHEN, Y., BUCALA, R., LOLIS, E., CAPPELLO, M. Structural and Functional Characterization of a Secreted Hookworm Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) That Interacts with the Human MIF receptor CD74. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, p. 23447-23456, 2007.

CHEEVER, A.W. LENZI, J.A., LENZI, H.L., ANDRADE, Z.A. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 917-940, 2002.

CHEEVER, A.W., HOFFMANN, K.F., WYNN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. *Immunol. Today*, v. 21, p. 465-466, 2000.

CHEEVER, A.W., POINDEXTER, R.W., WYNN, T.A. Egg laying is delayed but worm fecundity is normal in SCID mice infected with *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni* with

or without recombinant tumor necrosis factor alpha treatment. *Infec. Immun.*, v. 65, p. 2201-2208, 1999.

CHEEVER, A.W., DUVALL, R.H., HALLACK, T.A.J.R., MINKER, R.G., MALLEY, J.D., MALLEY, K.G. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg.*, v. 37, n.1, p. 85-97, 1987.

CHEEVER, A.W. A quantitative pos mortem study os schistosomiasis masoni in man. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.14, p. 38-64, 1968.

CHENSUE, S.W. & BOROS, D.L. Modulation of ganulomatous hypersensitivity. I. Characterization of T lymphocytes involved in the adoptive suppression of granulomas formation in *Schistosoma mansoni* infected mice. *The Journal of Immunology*, v.123, p.1409-1414, 1979.

CHIARIMONT, M.G., MENTINK-KANE, M., JACOBSON, B.A., CHEEVER, A.W., WHITTERS, M.J., GOAD, M.E.P., WONG, A., COLLINS, M., DONALDSON, D.D., GRUSBY, M.J., WYNN, T.A. Regulation and function of the interleukin 13 receptor $\alpha 2$ during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J. Exp. Med.*, v. 197, p. 687-701, 2003.

CHIARAMONTE, M. G., CHEEVER, A. W., MALLEY, J. D., DONALDSON, D. D., WYNN, T. A., Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. *Hepatology*, v. 34, p. 273-282, 2001.

CHIARAMONTE, M. G., DONALDSON, D. D., CHEEVER, A. W., WYNN, T. A. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J. Clin. Invest.*, v. 104, p. 777-785, 1999.

CHIARAMONTE M.G., SCHOPF, L.R., NEBEN, T.Y., CHEEVER, A.W., DONALDSON, D.D., IWYNN, T.A. IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. *J. Immunol.*, v. 162, p. 920-930, 1999.

COFFMAN, R. L., AND T. VON DER WEID. Multiple pathways for the initiation of T helper 2 (Th2) responses. *J. Exp. Med.*, v. 185, p. 373-375, 1997.

CONCEIÇÃO, J.M., BORGES-PEREIRA J., COURA, J.R. A thirty years follow-up study on Schistosomiasis mansoni in a community of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102(8), p.1007-1009, 2007.

CORRÊA-OLIVEIRA, R., MALAQUIAS, L.C., FALCAO, P.L., VIANA, I.R., BAHIA-OLIVEIRA, L.M., SILVEIRA, A.M., FRAGA, L.A., PRATA, A., COFFMAN, R.L., LAMBERTUCCI, J.R., CUNHA-MELO, J.R., MARTINS-FILHO, O.A., WILSON, R.A., GAZZINELLI, G. Cytokines is a determinant of the susceptibility and resistance in human *Schistosomiasis mansoni*. *Braz. Med. Biol. Res.*, v.31, p.127, 1998.

COURA, JR., & AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 99, p. 13-19, 2004.

CURWEN, R.S., & WILSON, R.A. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. *Trends Parasitol*, v. 19, p. 63-6, 2003.

CUA, D.J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, v. 421, p. 744-748, 2003.

DAVIES, S. J., SMITH, S. J., LIM, K. C., ZHANG, H., PURCHIO, A. F., MCKERROW, J. H., WEST, D.B. *In vivo* imaging of tissue eosinophilia and eosinopoietic responses to schistosome worms and eggs. *Int. J. Parasitol.*, v. 35, p. 851-859, 2005.

DAJEM, S.M.B., MOSTAFA, O.M.S., EL-SAID, F.G. Susceptibility of two strains of mice to the infection with *Schistosoma mansoni*: Parasitological and biochemical studies. *Parasitol Res.*, v.103, p.1059-1063, 2008.

DAVID, J.R. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, v. 56, p. 72-77, 1966.

DE JESUS, A.R., MAGALHÃES, A., MIRANDA, D.G., ARAUJO, M.I., DE JESUS, A.A., DE ALMEIDA, R.P., REGO, M.A. BURATTINI, M.N., PEARCE, E.J., CARVALHO, E.M. Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect. Immun.*, v. 72, p. 3391-3397, 2004.

DE WAAL MALEFYT, R., YSSEL, H., DE VRIES, J.E. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4₊ T cell clones and resting T cells: specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J. Immunol.*, v.1 50, p. 4754-4765, 1993.

DENKINGER, C.M., METZ, C., FINGERLE-ROWSON, G., DENKINGER, M.D., FORSTHUBER, T. Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases. *Arch. Immunol. Ther. Exp.*, v. 52, p. 389-400, 2004.

DESSEIN, A.J., COUISSINIER, P., DEMEURE, C., RIHET, P., KOHLSTAEDT, S., CARNEIRO-CARVALHO, D., OUATTARA, M., GOUDOT-CROZEL, V., DESSEIN, H., BOURGOIS, A., Environmental genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*. *Immunol. Invest.*, v. 21, p. 423-453, 1992.

DESSEIN, A.J., HILLAIRE, D., ELWALI, N.E., MARQUET, S., MOHAMED-ALI. Q., MIRGHANI, A., HENRI, S., ABDELHAMEED., A.A., SAEED, O.K, MAGZOUB, M.M., ABEL,L. Severe fibrosis in *S. mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interfero- γ receptor gene. *Am. J. Hum. Genet.*, v. 65, p. 709-721, 1999.

DOENHOFF, M.J. A role for granulomatous inflammation in the transmission of infection disease: schistosomiasis and tuberculosis. *Parasitology*, v.115, p. S.113-S115, 1997.

DONNELLY, S.C. & BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of glucocorticoid activity with a critical role in inflammatory disease. *Mol. Med. Today*, v.3, p. 502-507, 1997.

DONNELLY, S.C., HASLETT, C., REID, P.T., GRANT, I.S., WALLACE, W.A.H.,METZ, C.N., BRUCE, L.J., BUCALA, R. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nature Med.*, v. 3, p. 320-323, 1997.

DRUMMOND, S.C., SILVA, L.C.S., AMARAL, R.S., SOUSA-PEREIRA, S.R., ANTUNES, C.M., LAMBERTUCCI, J.R. Morbidity of schistosomiasis mansoni in the state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 37-44, 2006.

DUNNE, D.W. & PEARCE, E.J. Immunology of hepatosplenic schistosomiasis mansoni: a human perspective. *Microbes Infect.*, v. 1, p. 533-560, 1999.

ELOI-SANTOS, S., OLSEN, N. J., CORREA-OLIVEIRA, R., COLLEY, D. G. *Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology and susceptibility differences in male and female mice. *Exp. Parasitol.*, v. 75, p. 168-175, 1992.

FALCONE, F.H., LOKE, P., ZANG, X., MACDONALD, A.S., MAIZELS, R.M., and ALLEN, J.E. A *Brugia malayi* homolog of macrophage migration inhibitory factor reveals an important link between macrophages and eosinophil recruitment during nematode infection. *J. Immunol.*, v. 167, p. 5348-5354, 2001.

FALLON, P.G. & DUNNE, D.W. Tolerization of Mice to *Schistosoma mansoni* Antigens Causes Elevated Type 1 and Diminished Type 2 Cytokine Responses and Increased Mortality in Acute Infection. *The Journal of Immunol.*, v. 162, p. 4122-4132, 1999.

FALLON, P.G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and man. *Immunol. Today*, v. 1, p. 29-35, 2000.

FIorentino, D.F., Zlotnik, A., Mosmann, T.R., Howard, M., O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J. Immunol.*, v. 147, p. 3815-3822, 1991.

GAZZINELLI, A., BETHONY, J., ALVES-OLIVEIRA, L.F., LOVERDE, P.T., CORREA-OLIVEIRA, R., KLOOS, H. Exposure to *Schistosoma mansoni* infection in a rural area of Brazil Part I: Water contact. *Trop. Med. Int. Health*, v. 6, p. 126-135, 2001.

GAZZINELLI, G., LAMBERTUCCI, J.R., KATZ, N., ROCHA, N.S., LIMA, M.S., COLLEY, D.G. Immune responses during human Schistosomiasis mansoni. XI Immunologic status of patients with acute infections and after treatment. *J. Immunol.*, v. 135, p. 2121-2127, 1985.

GENTILE, R., COSTA-NETO, S.F., GONÇALVES, M.M.L., BONECKER, S.T., Fernandes, F.A., GARCIA, J.S., BARRETO, M.G.M., SOARES, M.S., ANDREA, P.S.D., Peralta, J.M., REY, L. An ecological field study of the water-rat *Nectomys squamipes* as a wild reservoir indicator of *Schistosoma mansoni* transmission in an endemic area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.101, p.111-117, 2006.

GOODRIDGE, H.S., MARSHALL, F.A., WILSON, E.H., HOUSTON, K.M., LIEW, F.Y., HARNETT, M.M., HARNETT, W. In vivo exposure of murine dendritic cell and macrophage bone marrow progenitors to the phosphorylcholine-containing filarial nematode glycoprotein ES-62 polarizes their differentiation to an anti-inflammatory phenotype. *Immunology*, v. 113, p. 491-498, 2004.

GORDON, S. Alternative activation of macrophages. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 3, p. 23-35, 2003.

GREEN, A.P., MANGAN, F., ORMERODO, J.E. Induction of cell infiltration and acid hydrolase release into the peritoneal cavity of mice. *Inflammation*, v. 4, p. 205-213, 1980.

GRYSEELS, B., POLMAN, K., CLERINX, J., KESTENS, L., Human schistosomiasis. *Lancet*, v. 368, p.1106-1118, 2006.

HASEEB, M.A., SHIRAZIAN, D.J., PREIS, J. Elevated serum levels of TNF- α , sTNF-RI and sTNF-RII in murine schistosomiasis correlate with schistosome oviposition and circumoval granuloma formation. *Cytokine*, v. 15, n. 5, p. 266-269, 2001.

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

HERNANDEZ, H.J., SHARPE, A.H., STADECKER, M.J.. Experimental murine schistosomiasis in the absence of B7 costimulatory molecules: reversal of elicited T cell cytokine profile and partial inhibition of egg granuloma formation. *J. Immunol.*, v. 162, p. 884-889, 1999.

HERNANDEZ H.J, WANG Y., ZELLAS N., STADECKER, M.J. Expression of class II, but not class I, major histocompatibility complex molecules is required for granuloma formation in infection with *Schistosoma mansoni*. *Eur J Immunol.*, v. 27, p. 1170-1176, 1997.

HESSE, M., PICCIRILLO, C.A., BELKAID, Y., PRUFER, J., MENTINK-KANE, M., LEUSINK, M., CHEEVER, A.W., SHEVACH, E.M., WYNN, T.A. The Pathogenesis of Schistosomiasis Is Controlled by Cooperating IL-10-Producing Innate Effector and Regulatory T Cells. *The Journal of Immunology*, v. 172, p. 3157-3166, 2004.

HESSE, M., MODOVELL, M., LA FLAMME, A.C., SCHITO, M. FUENTES, J.M., CHEEVER, A.W., PEARCE, E.J., WYNN, T.A. Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1 type 2 cytokines *in vivo*: granulomas pathology is shaped by the pattern of l-argiase metabolism. *J. Immunol.*, v. 167, p. 6533-6544, 2001.

HIATT, R.A. Factors in the pathogenesis of acute schistosomiasis mansoni. *Journal of Infectious Diseases*, v. 39, p. 659-666, 1979.

HOFFMANN, K.F., CASPAR, P., CHEEVER, A.W., WYNN, T.A. IFN-gamma, IL-12, and TNF-alpha are required to maintain reduced liver pathology in mice vaccinated with *Schistosoma mansoni* eggs and IL-12. *J Immunol.*, v. 161, p. 4201-4210, 1998.

HOFFMAN, K.F., CHEEVER, A.W., WYNN, T.A. IL-10 and the dangers of immune polarization: Excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. *J. Immunol.*, v. 164, p. 6406-6416, 2000.

HUMBLES, A.A., LLOYD, C.M., MCMILLAN, S.J., FRIEND, D.S., XANTHOU,G.,MCKENNA, E.E., GHIRAN, S., GERARD, N.P.,YU, C., ORKIN, S.,GERARD, C. A critical role for eosinophils in allergic airways remodeling. *Science*, v. 17, p. 1776-1779, 2004.

JANKOVIC, D., KULLBERG, M.C., NOBEN-TRAUTH, N., CASPAR, P., WARD, J.M., CHEEVER, A.W., PAUL, W.E, SHER, A. Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. *J. Immunol.*, v. 163, p. 337-342, 1999.

JANKOVIC, D., CHEEVER, A.W., KULLBERG, M.C., WYNN, T.A., YAP, G., CASPAR, P., LEWIS, F.A., CLYNES, R., RAVETCH, J.V., SHER, A.. CD4+T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signalling. *J. Exp. Med.*, v. 187, p. 619-629, 1998.

JOSEPH, A.L., BOROS, D.L. Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *J. Immunol.*, v. 151, p. 5461-5471, 1993.

JUNQUEIRA, L.C., MONTES, G.S., TOLEDO, O.M., JOAZEIRO, P.P. Morphological, histochemical and biochemical observations on the connective tissue matrix of in situ and isolated hepatic granulomas in experimental murine schistosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol.*, v. 80, p.27-41, 1986.

JUTTNER, S. Inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages: dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF- α . *J. Immunol.*, v. 161, p. 2383-2390, 1998.

KAPLAN, M.R., WHITFIELD, J.R., BOROS, D.L., GRUSBY, M. Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. *J. Immunol.*, v. 160, p.1850-1856, 1998.

KARANJA, D.M., COLLEY, D.G., NAHLEN, B.L., OUMA, J.H., SECOR, W.E. Studies on schistosomiasis in western Kenya. Evidence for immune-facilitated excretion of schistosome eggs from patients with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus coinfection. *Am. J. Med. Hyg.*, v. 56, p. 515-521, 1997.

KLEMENT, P., AUGUSTINE, J.M., DELANEY, K.H., KLEMENT, G., WEIT, J.I. An oral Ivermectin regimen that eradicates Pinworms (*Syphacia* sp.) in laboratory rats and mice. *Laboratory Animal. Science*, v. 46, p. 286-290, 1996.

KATZ, N., PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Critical analysis of the estimated number of schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33(3), p. 303-308, 2000.

KATZ, N. Schistosomiasis control in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 93, p. 33-35, 1998.

KHEIR, M.M., ELTOUN, I.A., SAAD, A.M., ALI, M.M., BARAKA, O.Z. HOMEIDA, M.M. Mortality due to schistosomiasis mansoni: afield study in Sudan. *Am. J. trop. Med. Hyg.*, v. 60, p. 307-310, 1999.

KING, C.L., MALHOTRA, I., MUNGAI, P., WAMACHI, A., KIOKO, J., OUMA, J.H., KZURA, J.W. B-cell sensitisation to helminthic infection develops *in utero* in humans. *J. Immunol.*, v. 160, p. 3578-3584, 1998.

KLEEMANN, R., HAUSSER, A., GEIGER, G., MISCHKE, R., BURGER-KENTISCHER, A., FLIEGER, O., JOHANNES, F., ROGER, T., CALANDRA, T., KAPURNIOTUK, A., GRELL, M., FINKELMEIER, D., BRUNNER, H., BERNHAGEN, J. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature*, v. 408, p. 211-216, 2000.

KOLLS, J.K. & LINDEN, A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, v. 21, p. 467-476, 2004.

KOPF, M., LE GROS, G., BACHMANN, M., LAMERS, M.C., BLUETHMANN, H., KOHLER, G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*, v. 352, p. 245-248, 1993.

LACERDA, C. M., FREIRE, W., VIEIRA DE MELO, P.S., LACERDA, H.R., CARVALHO, G. Splenectomy and ligation of the left gastric vein in schistosomiasis mansoni: the effect on esophageal vericeal pressure measured by a non-invasive technique. *Keio J. Med.*, v. 51, p. 89-92, 2002.

LAMBERTUCCI, JR., JORDAN, P., WEBER, G., SURROCK, R.F. *Schistosoma mansoni*: Pathological and clinical aspects. In: (Eds) Human Schistosomiasis. Wallingford: **Cab. International**, cap. 5, p.195-235, 1993.

LAN, H.Y., BACHER, M., YANG, N., MU, W., NIKOLIC-PATERSON, D.J., METZ, C., MEINHARDT, A., BUCALA, R., ATKINS, R.C. The pathogenic role of macrophage migration inhibitory factor in immunologically induced kidney disease in the rat. **J. Exp. Med.**, v. 185, p. 1455-1465, 1997.

LAURENCE, A. & O'SHEA, J.J. TH-17 differentiation: of mice and men. **Nature Immunol.**, v. 8, p. 903-905, 2007.

LENG, L., METZ, C.N., FANG, Y., XU, J., DONNELLY, S., BAUGH, J., DELOHERY, T., CHEN, Y., MITCHELL, R.A., BUCALA, R. MIF signal transduction initiated by binding to Cd74. **J. Exp. Med.**, v. 197, p. 1467-1476, 2003.

LENZI, H.L., JURBERG, A.D., COELHO, P.M.Z., LEZI, J.A. Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no Hospedeiro Definitivo. In CARVALHO, O.S., COELHO, P.M.Z., LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar**. 1^a edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008 a.

LENZI, H.L., ROMANHA, W.S., MACHADO, M.P., MOTA, E.M., LEZI, J.A. Patologia Experimental com Enfoque o Granuloma Esquistossomótico. In CARVALHO, O.S.,

COELHO, P.M.Z., LENZI, H.L. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose. Uma visão **Multidisciplinar**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008 b.

LENZI, H.L., KIMMEL, E., SCHOECHTMAM, H., PELAJO-MACHADO, M., ROMANHA, W.S., PACHECO, R.S., MARIANO, M., LENZI, J.A. Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 93, supl.1, p. 141-51, 1998.

LENZI, H.L., LENZI, J.A., KERR, I.B., ANTUNES, S.L., MOTA, E.M., OLIVEIRA, D.N. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, supl. III, p. 77-90, 1991.

LEVI-SCHAFFER, F., GARBUZENKO, E., RUBIN, A., REICH, R., PICKHOLTZ, D., GILLERY, P. Humaneosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties *in vitro*: a role for transforming growth factor beta (TGF-beta). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 96, p. 9660-9665, 1999.

LOWRY, O.H., ROSEBROUH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, v. 193(1), p. 265-275, 1951.

LUKACS, N.W. Inflammatory granulomas formation is mediated by TNF-alpha-inducible intercellular adhesion molecule-1. *The Journal of Immunology*, v. 152, p. 5883-5889, 1994.

LUE, H., KLEEMAN, R., CALANDRA, T., ROGER, T., BERNHAGEN, J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanism of action and role in disease, *Microbes and Infection*, v. 4, p. 449-460, 2002.

MACDONALD A.S., ARAUJO, M.I.I., PEARCE, E.J. Immunology of parasitic helminth infections, *Infection and Immunity*, v. 70, p. 427-433, 2002.

MACDONALD A.S., PATTON, E.A., FLAMME, A.C., ARAUJO, M.I. HUXTABLE, C.R., BAUMAN, B., PEARCE, E.J. Impaired Th2 development and increased mortality during *Schistosoma mansoni* infection in the absence of CD40/CD154 interaction. *J Immunol.*, v. 168, p. 4643-4649, 2002.

MACDONALD, A.S., STRAW, A.D., BAUMAN, B. & PEARCE, E.J. CD8⁻ dendritic-cell activation status plays an integral role in influencing th2 response development. *J. Immunol.*, v. 167, p. 1982-1988, 2001.

MACKENZIE, G.J., FALLON, P.G., EMSON, C.L., GRENCIS, R.K., MCKENZIE, N.J. Simultaneous disruption of interleukin il-4 and il-13 defines individual roles in Thelper cell type 2-mediated responses. *J. Exp. Med.*, v. 189, p. 1565-1572, 1999.

MAGALHÃES, E.S., PAIVA, C.N., SOUZA, H.S.P., PYRRHO, A.S., MOURÃO, A.S.D., FIGUEIREDO, R.T., VIEIRA-DE-ABREU, A., DUTRA, H.S., SILVEIRA, M.S., GASPAR-ELSAS, M.G.C., XAVIER-ELSAS, P., BOZZA, P.T., BOZZA, M.T. Macrophage migration inhibitory factor is critical to interleukin-5-driven eosinophilopoiesis and tissue eosinophilia triggered by *Schistosoma mansoni* infection. *FASEB J.*, v. 23, p. 1262-1271, 2009.

MAGALHÃES, E.S., MOURÃO-SÁ, D.S., VIEIRA-DE-ABREU, A., FIGUEIREDO, R.T., PIRES, A.L., FARIAS-FILHO, F.A., FONSECA, B.P., VIOLA, J.P., METZ, C., MARTINS, M.A., CASTRO-FARIA-NETO, H.C., BOZZA, P.T., BOZZA, M.T. Macrophage migration inhibitory factor is essential for allergic asthma but not for Th2 differentiation. *Eur. J. Immunol.*, v. 37, p. 1097-1106, 2007.

MAHMOUD, A.A.F., WARREN, K.S., GRAHAM, R.C. Anti-eosinophil serum and the kinetics of eosinophilia in schistosomiasis mansoni. *J. Exp. Med.*, v. 142, p. 560-574, 1975.

MAHNKE, K., QIAN, Y., KNOP, J., ENK, A.H. Induction of CD4+CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood.*, v. 101, p. 4862–4869, 2003.

MAIZELS, R.M, BALIC, A., GOMEZ-ESCOBAR, N., NAIR, M., TAYLOR, M.D., ALLEN, J.E. Helminth parasites-masters of regulation. *Immunological Reviews*, v. 201, p. 89-116, 2004.

MAILZELS, R.M. & YAZDANBAKHS, M. Immune regulation by helminth parasites: cellular and molecular mechanisms. *Nature Reviews immunology*, v. 3, p. 733-744, 2003.

MALAGUIAS, L.C.C., FALCÃO, P.L., SILVEIRA, A.M.S., GAZZINELLI, G., PRATA, A., COFFMANN, R.L., PZZIOLO, V.R., CORRÊA-OLIVEIRA, R. Cytokine regulation of human response to *Schistosoma mansoni*: I. Analysis of the role of IL-4, IL-5, and IL-10 on peripheral blood mononuclear cells responses. *Scand. J. Immunol.*, v. 46, p. 304-311, 1997.

MARTINEY, J.A., SHERRY, B., METZ, C.N., ESPINOZA, M., FERRER, A.S., CALANDRA, T., BROXMEYER, H.E., BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of *Plasmodium chabaudi*-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infect. Immun.*, v. 68, p. 2259-2267, 2000.

MARTINEZ, F.O., SICA, A., MANTOVANI, A., LOCATI, M. Macrophage activation and polarization. *Frontiers in Bioscience*, v. 13, p. 453-461, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SPCE/SVS/MS atualizado em 25/10/2007. Casos confirmados de Esquistossomose. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1995 a 2006. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf.casos_esquistossomose.pdf. Acesso em 03 de Março de 2008.

MITCHELL, R.A., METZ, C.N., PENG, T., BUCALA, R. Sustained Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) and Cytoplasmatic Phospholipase A2 Activation by Macrophage Migration Inhibitory Factor. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 18100-18106, 1999.

MITCHELL, R.A., LIAO, H., CHESNEY, J., FINGERLE-ROWSON, G., BAUGH, J., DAVID, J., BUCALA, R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, v. 99, p. 345-350, 2002.

MIZUE, Y., GHANI, S., LENG, L., MCDONALD, C., KON, P., BAUGH, J., LANE, S.J., CRAFT, J., NISHIHARA, J., DONNELLY, S.C., ZHU, Z., BUCALA, R. Role for macrophage migration inhibitory factor in asthma. *PNAS*, v. 102, p. 14410-14415, 2005.

MODENA, C.M., LIMA, W.S., COELHO, P.M.Z. Wild and domesticated animals as reservoirs of *Schistosoma mansoni* in Brazil. *Acta Tropica*, v. 108, p. 242-244, 2008.

MONTENEGRO, S.M., MIRANDA, P., MAHANTY, S., ABATH, F.G.C., TEIXEIRA, K.M., COUTINHO, E.M., BRINKMAN, J., GONÇALVES, I., DOMINGUES, L.A.W., DOMINGUES, A.L.C., SHER, A., WYNN, T.A. Cytokine production in acute versus chronic human schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon- γ and interleukin-10 in the response of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *J. Infect. Dis.*, v. 179, p. 1502-1514, 1999.

MONTESANO, M.A., COLLEY, D.G., WILLARD, M.T., FREEMAN JR, G.L., SECOR, W.E. Idiotypes expressed early in experimental *Schistosoma mansoni* infections predict clinical outcomes of chronic disease. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 195, p. 1223-1228, 2002.

MWATHA, J.K., KIMANI, G., KAMAU, T., MBUGUA, G.G., OUMA, J.H., MUMO, J., FULFORD, A.J., JONES, F.M., BUTTERWORTH, A.E., ROBERTS, M.B., DUNNE, D.W. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. *J Immunol.*, v. 160, p. 1992-1999, 1998.

NAKAMARU, Y., ORIDATE, N., NISHIHIRA, J., TAKAGI, D., FURUTA, Y., FUKUDA, S. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) contributes to the development of allergic rhinitis. *Cytokine*, v. 31, p. 103-108, 2005.

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

NOGUCHI, H., KEPHART, G.M., COLBY, T.V., GLEICH, G.J. Tissue eosinophilia and eosinophil degranulation in syndromes associated with fibrosis. *Am. J. Pathol.*, v. 140, p. 521-528, 1992.

OHMORI, Y.L., WYNER, S., MARUMI, D., ARMSTRONG, M., STOLER, T.A. Tumor necrosis factor- α induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokine in vivo. *Am. J. Pathol.*, v. 142, p. 861-870, 1993.

OKANO, M., SATOSKAR, A.R., NISHIZAKI, K., ABE, M., HARN, D.A. Jr. Induction of TH2 responses and IgE is largely due to carbohydrates functioning as adjuvants on *Schistosoma mansoni* egg antigens. *J. Immunol.*, v. 163, p. 6712-6717, 1999.

OKANO, M., SATOSKAR, A.R., NISHIZAKI, K., ABE, M., HARN, D.A. Jr. Lacto-N-fucopentaose III found on *Schistosoma mansoni* egg antigens functions as adjuvant for proteins by inducing Th2-type response. *J. Immunol.*, v. 167, p. 442-450, 2001.

OZAKI, T., KUMAGAI, M., INABA, T., SOTO, H., ITO, M., KAMIYA, H. Features of *Schistosoma mansoni* infection in SCID mice, *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, v. 28, p. 838-843, 1997.

PARAENSE, W.L. The schistosome vectors in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, Suppl 96, p. 7-16, 2001.

PASTRANA, D.V., RAGHAVAN, N., FITZGERALD, P., EISINGER, S.W., METZ, C., BUCALA, R., SCHLENÍMER, R.P., BICKEL, C., SCOTT, A.L. Filarial nematode parasites secrete a homologue of the human cytokine macrophage migration inhibitory factor. *Infect. and Immunity*, v. 66, p. 5955-5963, 1998.

PEARCE, E.J., KANE, C.M., SUN, J., TAYLOR, J.J., MCKEE, A.S., CERVI, L. Th2 response polarization during infection with helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological Reviews*, v. 207, p. 117-126, 2004.

PEARCE, E.J. & MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Rev. Immunol.*, v. 2, p. 499-511, 2002.

PEARCE, E.J., CASPAR, P., GRZYCH, J.M., LEWIS, F.A., SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 173, p. 159-166, 1991.

PEDRAS-VASCONCELOS, J.A. & PEARCE, E.J. Type1 CD8+T cell responses during infection with helminth *Schistosoma mansoni*. *J. Immunol.*, v. 157, p. 3046-3053, 1996.

PELLEGRINO, J. & KATZ, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *Adv. Parasitol.*, v. 41, p. 233-290, 1968.

PELLEGRINO, J. & SIQUEIRA, A.F. Técnica de perfusão para colheita de *S. mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev. Brás. Malariol. Doenças Trop.*, v. 8, p. 585-597, 1956.

PEREIRA, F.E.L., BOGLIOLO, L. Inflamações. In BOGLIOLO, L., BRASILEIRO FILHO, G. *Patologia*, 6 edição. Rio de Janeiro, cap. 7, p.112-148, Guanabara Koogan. 2000.

PERONA-WRIGHT, G., JENKINS, S.J., MACDONALD, A.S. Dendritic cell activation and function in response to *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*, v. 36, p. 711–721, 2006.

PESCE, J., KAVIRATNE, M., RAMALINGAM, T.R., THOMPSON, R.W., URBAN JR, J.F., CHEEVER, A.W., YOUNG, D.A., COLLINS, M., GRUSBY, M.J., WYNN, T.A. The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 116, p. 2044-2055, 2006.

PRATA, A. & BINA, J.C. Development of hepatosplenic form of schistosomiasis: a study of 20 patients observed during a 5-year period. *Gaz. Med. Bahia*, v. 68, p. 49–60, 1968.

PRATA, A. & ANDRADE, Z.A. Fibrose de Symmers sem esplenomegalia. *O Hospital*, v. 63, p. 617-623, 1963.

PRIETO-LAFUENTE, L., GREGORY, W.F., ALLEN, J.E., MAIZELS, R.M. MIF homologues from a filarial nematode parasite synergize with IL-4 to induce alternative activation of host macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 85, p. 1-11, 2009.

RAKASZ, E., BLUM, A.M., METWALI, A., ELLIOTT, D.E., LI, J., BALLAS, Z.K., QADIR, K., LYNCH, R., WEINSTOCK, J.V. Localization and regulation of IFN-gamma production within the granuloma of murine schistosomiasis in IL-4 deficient and control mice. *The Journal Immunology*, v. 160, p. 4994-4999, 1998.

RAMALINGAN, T.R., PESCE, J.T., SHEIK, F., CHEEVER, A.W., MENTINK-KANE, M.M., WILSON, M.S., STEVENS, S., VALENZUELA, D.M., MURPHY, A.J., YANCOPOULOS, G.D., URBAN JR., J.F., DONNELLY, R.P., WYNN, T.A. Unique functions of the type II interleukin 4 receptor identified in mice lacking the interleukin 13 receptor α 1 chain. *Nature Immunology*, v. 9, p. 25-33, 2008.

RAO, K.V., CHEN, L., GNANASEKAR, M., RAMASWAMY, K. Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 31207-31213, 2002.

RASO, P., PEDROSO, E.R.E. Esquistossomose mansônica. In BOGLIOLO, L., LOPES, E.R., CHAPADEIRO, E., RASO, P., TAFURI, W.L. **Patologia**, 4ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1987, p.1065-1086.

RASO, P., PEDROSO, R.P.E., NEVES, J. Patologia da forma aguda toxêmica, da esquistossomose mansoni. *Ver. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.19, p. 45-55, 1986.

RASO, P., NEVES, J. Contribuição ao conhecimento do quadro anatômico do fígado na forma toxêmica da esquistossomose mansoni através de punções e biópsias. *Ann. Fac. Med. UFMG*, v. 22, p. 147-165, 1965.

REDDY, G.K. & ENWEMEKA, C.S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin Biochem.*, v. 29, p. 225-229, 1996.

REIMAN, R.M., THOMPSON, R.W., FENG, C.G., HARI, D., KNIGHT, R., CHEEVER, A.W., ROSENBERG, H.F., WYNN, T.A. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect. Immun.*, v. 74, p. 1471-1479, 2006.

RODRIGUEZ-SOSA, M., SATOSKAR, A.R., CALDERO, R., GOMEZ-GARCIA, L., SAAVEDRA, R., BOJALIL, R., TERRAZAS, L.I. Macrophage migration inhibitory factor plays a critical role in mediating protection against the helminth parasite *Taenia crassiceps*. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 1247-1254, 2003.

ROSSI, A.G., HASLETT, C., HIRANI, N., GREENING, A.P., METZ, C.N., BUCALA, R., DONNELLY, S.C. Human Circulating Eosinophils Secrete Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Potential Role in Asthma. *Clin. Invest.*, v. 101, p. 2869-2874, 1998.

RUTITZKY, L.I. & STADECKER, M.J. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis, *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101, p. 327-330, 2006.

RUTITZKY, L.I., MIRKIN, G.A., STADECKER, M.J. Apoptosis by Neglect of CD4₊ Th Cells in Granulomas: A Novel Effector Mechanism Involved in the Control of Egg-Induced Immunopathology in Murine Schistosomiasis. *J. Immunol.*, v. 171, p. 1859-1867, 2003.

RUTITZKY, L.I., HERNANDEZ, H.J., STADECKER, M.J. Th1-polarizing immunization with egg antigens correlates with severe exacerbation of immunopathology and death in schistosome infection. *PNAS*, vol. 98, p. 13243-13248, 2001.

SABIN, E.A., KOPF, M.A. & PEARCE, E.J. *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *J. Exp. Med.*, v. 184, p. 1871-1878, 1996.

SABIN, E.A., & PEARCE, E.J. 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. *Journal of Immunology*, v. 155, p. 4844-4853, 1995.

SABROE, J., PEASE, J.E., WILLIAMS, T.J. Asthma and MIF: innately Th1 and Th2. *Clinical and Experimental Allergy*, v. 30, p. 1194-1196, 2000.

SATOSKAR, A.R., BOZZA, M., RODRIGUEZ, S.M., LIN, DAVID, J.R. Migration-inhibitory factor gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *Leishmania major* infection. *Infect. Immun.*, v. 69, p. 906-911, 2001.

SCHARAMM, G., FALCONE, F.H., GRONOW, A., HAISCH, K., MAMAT, U., DOENHOFF, M.J., OLIVEIRA, G., GALLE, J., DAHINDEN, C.A., HAAS, H. Molecular characterization of an interleukin-4-inducing factor from *Schistosoma mansoni* eggs. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p.18384-18392, 2003.

SCHOBER, A., BERNHAGEN, J., WEBER, C.W.J. Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis. **Mol Med.**, v. 86, p. 761-770, 2008.

SHER, A., COFFMAN, R.L., HIENY, S., SCOTT, P., CHEEVER, A.W. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 87, p. 61-65, 1990.

SILVA, A., SANTANA, L.B., JESUS, A.R. A Resposta Imune na Forma Aguda da Esquistossomose Mansonii. In CARVALHO, O.S., COELHO, P.M.Z., LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose. Uma visão Multidisciplinar**. 1ª edição. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008

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

SILVEIRA-LEMOS, D., TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O.A., OLIVEIRA, L.F.A., COSTA-SILVA, M.F., MATOSO, L.F.M., SOUZA, L.J.,

GAZZINELLIE, A., CORRÊA-OLIVEIRA, R. Eosinophil activation status, cytokines and liver fibrosis in *Schistosoma mansoni* infected patients. *Acta Tropica*, v. 108, p. 150-159, 2000.

STADECKER E.T., ASahi, H., FINGER, E., HERNANDEZ, H.J., RUTITZKY, L.I., SUN, J. The immunobiology of Th1 and high-pathology schistosomiasis *Immunological Reviews*, v. 201, p. 168-179, 2004.

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

STAVITSKY, A. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. *Infection and Immunity*, v. 72, p. 1-12, 2004.

STAVITSKY, A.B., METZ, C., LIU, S., XIANLI, J., BUCALA, R. Blockade of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in *Schistosoma japonicum* -infected mice results in an increased adult worm burden and reduced fecundity. *Parasite Immunology*, v. 25, p. 369-374, 2003.

STAVITSKY, A.B. & XIANLIB, J. In vitro and in vivo regulation by macrophage migration inhibitory factor (MIF) of expression of MHC-II, costimulatory, adhesion, receptor, and cytokine molecules. *Cellular Immunology*, v. 217, p. 95-104, 2002.

STRATH, M., WARREN, D.J., SANDERSON, C.J. Detection of eosinophils using an eosinophil peroxidase assay. Its use as an assay for eosinophil differentiation factors. *J Immunol Methods*, v. 83, p. 209-215, 1985.

SYMMERS, W.S.T.C. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova *Bilharzia haematobia*. *Journal of Pathology and Bacteriology*, v. 9, p. 237-239, 1904.

SWAIN, S.L., WEINBERG, A.D., ENGLISH, M., HUSTON, G. IL-4 directs the development of different subsets of helper T cells. *Journal of Immunology*, v. 145, p. 3796-3806, 1990.

SWARTZ, J.M., DYER, K.D., CHEEVER, A.W., RAMALINGAM, T., PESNICAK, L., DOMACHOWSKIE, J.B., LEE, J.J., LEE, N.A., FOSTER, P.S., WYNN, T.A., ROSENBERG, H.F. *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*, v. 108, p. 2420-2427, 2006.

TAN, T.H., EDGERTON, S.A., KUMARI, R., MCALISTER, M.S., ROE, S.M., NAGL, S., PEARL, L.H., SELKIRK, M.E., BIANCO, A.E., TOTTY, N.F., ENGWERDA, C., GRAY, C.A., MEYER, D.J., ROWE, S.M. Macrophage migration inhibitory factor of the parasitic nematode *Trichinella spiralis*. *Biochem. J.*, v. 357, p. 373-383, 2001.

TAYLOR, J.J., MOHRS, M., PEARCE, E.J. Regulatory, t cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. *J. Immunol.*, v. 176, p. 5839-5847, 2006.

TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O.A., ANDRADE, Z.A., CUNHA-MELLO, J.R., WILSON, R.A., CORRÊA-OLIVEIRA, R. The study of the cell activation in peripheral blood and spleen of hepatosplenic patients suggests an exchange of cells between these two compartments in advanced human *Schistosomiasis mansoni* infection. *Scand. J. Immunol.*, v. 56, p. 315-322, 2002.

TEIXEIRA-CARVALHO, A., MARTINS-FILHO, O.A., PERUHYPE-MAGALHAES, V., SILVEIRA-LEMOES, D., MALAQUIAS, L.C.C., OLIVEIRA, L.F.A., SILVEIRA, A.M.S., GAZZINELLI, A., GAZZINELLI, G., CORRÊA-OLIVEIRA, R. Cytokines, chemokine receptors, CD4+CD25 HIGH+ T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. *Acta Tropica*, v. 108, p. 139-149, 2008.

THOMAS, P.G., CARTER, M.R., ATOCHINA, O., DA'DARA, A.A., PISKORSKA, D., MCGUIRE, E., HARN, D.A. Maturation of dendritic cell 2 phenotype by a helminth antigen uses a Toll-like receptor 4-dependent mechanism. *J.Immunol.*, v. 171, p. 5837-5841, 2003.

VALADARES, T.E., COELHO, P.M., PELLEGRINO, J., SAMPAIO, I.B. *Schistosoma mansoni*: comparison of oviposition of the LE (Belo Horizonte), SP (São Paulo) and ST (Liberia) strains in mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 23, p. 1-5, 1981.

VAN DER KLEIJ, D., LATZ, E., BROUWERS, J.F.G.M., KRUIZE, Y.C.M., KURT-JONES, E.A., ESPEVIK, T., DE JONG, E.C., KAPSENBERG, M.L., GOLENBOCK, D.T., TIELENS, A.G.M., YAZDANBAKHSI, M. A novel host – parasite lipid cross talk: schistosomal lysophosphatidylserine activates Toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J. Biol. Chem.*, v. 277, p. 48122-48129, 2002.

VAN DIE, I., VAN VLIET, S.J., NYAME, A.K., COMMUNGS, R.D., BANK, C.M.C., APPELMELK, B., GEIJTENBEEK, T.B.H., VAN KOOYK, Y. The dendritic cell specific C-type lectin DC-SIGN is a receptor for *Schistosoma mansoni* egg antigens and recognizes the glycan antigens Lewis-x. *Glicobiol.*, v. 13, p. 471-478, 2003.

VELLA, A.T. & PEARCE, E.J. CD4+ Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. *J. Immunol.*, v. 148, p. 2283-2290, 1992.

ZANG, X., TAYLOR, P., WANG, J.M., MEYER, D.J., SCOTT, A.L., WALKINSHWI, M.D., MAIZELS, M. Homologues of Human Macrophage Migration Inhibitory Factor from a Parasitic Nematode gene cloning, protein activity, and crystal structure. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 44261- 44267, 2002.

ZUIDEMA, P.J. The Katayama syndrome: an outbreak in Dutch tourists to the Omo National Park, Ethiopia. *Trop. Geog. Med.*, v. 33, p. 30-35, 1981.

ZWINGERBERGER, H., IRSCHICK, E., SIQUEIRA, G.V., DACAL, R.C., FELDMEIE, R. Tumor necrosis factor in hepatoesplenic schistosomiasis. *Scand. J. Immunol.*, v. 31, p. 205-211, 1990.

WARREN, K.S. The effect of immunopathogenesis of schistosomiasis: in Oi'ho models. *Immunol. Rev.*, v. 61, p. 189-213, 1982.

WEINSTOCK, J.V., & BOROS, D.L. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.*, v. 130, p. 418-422, 1983.

WHITFIELD, P.J., BARLETT, A., BROWN, M.B. MARIOTT, C. Invasion by shistosome cercariae: studies in human skin explants. *Trends Parasitol.*, v. 19, p. 339-340, 2003.

WITTE, M. B., BARBUL, A., SCHICK, M. A., VOGT, N. & BECKER, H. D. Upregulation of arginase expression in wound-derived fibroblasts. *J. Surg. Res.*, v. 105, p. 35-42, 2002.

WILSON, M.S., MENTIK-KANE, M.M., PESCE, J.T., RAMALINGAN, T.R., THOMPSON, R., WYN, T.A. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology and Cell Biology*, v. 85, p. 148-154, 2007.

WILSON, N.J., .BONIFACE, K., CHAN, J.R., MCKENZIE, B.S., UMENSCHIN, W.M., MATTSON, J.D., BASHAM, B., SMITH, K., CHEN, T., MOREL, F., LECRON, J., KASTELEIN, R.A., CUA1, D.J ., MCCLANAHAN, T.K., BOWMAN, E.P., WAAL MALEFYT, R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.*, v. 8, p. 950-957, 2007.

WOLMARANS, C. T., DE ROCK, K. N., STRAUS, H.D., BORNMAN, M. Daily emergence of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* cercariae from naturally infected snails under field conditions. *J. Helminthol.*, v. 76, p. 273-277, 2002.

WYNN, T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis, *Journal of Pathology*, v. 214, p. 1199-210, 2007.

WYNN, TA. Fibrotic disease and the TH1/TH2 paradigm. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 4, p. 583-594, 2004.

WYNN, T.A. Analyses of granuloma formation in double cytokine-deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both T helper cell1 and T helpe cell –type cytokine responses *in vivo*. *J. Imuunol.*, v. 159, p. 5014-5023, 2000.

WYNN, T. A., A. W. CHEEVER, M. E. WILLIAMS, S. HIENY, P. CASPAR, R. KUHN, W. MULLER, AND A. SHER. 1998. IL-10 regulates liver pathology in acute murine schistosomiasis mansoni but is not required for immune downmodulation of chronic disease. *J. Immunol.*, v. 160, p. 4473-4480, 1998.

WYNN T.A, MORAWETZ, R., SCHARTON-KERSTEN, T., HIENY, S., MORSEHC-, KUHN, R., MULLER, W., CHEEVER, A.W, SHER, A. Analysis of granuloma formation in double cytokine deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both th1 and th2-type cytokine responses in vivo. *J Immunol.*, v. 159, p. 5014-5023, 1997.

WYNN, T.A., & CHEEVER, A.W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology*, v. 7, p. 505-511, 1995.

WYNN, T.A., ELTOUN, I., OSWALD, I.P. CHEEVER, A.W. SHER., A. Endogenous interleukin-12 (IL₁₂) regulates granuloma formation induced by eggs of Schistosoma

mansoni, and exogenous IL-12 both inhibit and prophylactically immunize against egg pathology. *J. Exp. Med.*, v. 179, p. 1551-1556, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). First report of joint WHO Expert Committees on the Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-transmitted Helminthiasis. *Technical Report Series*, Geneva, in press 912; 572302002, 2002.

10. ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 158/2008**, relativo ao projeto intitulado "***Influência da produção do fator inibidor da migração de macrófagos (MIF) na evolução da infecção por Schistosoma mansoni Sambon, 1907 em camundongos***", que tem como responsável(is) **Deborah Aparecida Negrão-Corrêa**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **20/ 05/2009**.

Este certificado expira-se em **20/ 05/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 158/2008**, related to the project entitled "***The influence of the production macrophage migration inhibitory factor in evoution the infection by Schistosoma mansoni Sambon, 1907 in mice***", under the supervisors of **Deborah Aparecida Negrão-Corrêa**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 20, 2009**.

This certificate expires in **May 20, 2014**.

Belo Horizonte, 25 de Maio de 2009.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

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

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)