

HELLEN ALBUQUERQUE ZISSOU

FOSFOLIPASE A₂ SECRETÓRIA DO GRUPO V E
INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni*: ANÁLISE DO
IMPACTO DE GÊNERO EM MODELO EXPERIMENTAL
MURINO



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade
Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas: Microbiologia e
Imunologia**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO

2022

Trabalho realizado no Laboratório de Inflamação, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação dos Professores Dr. Bruno Lourenço Diaz e Dra. Christianne Bandeira de Melo e coorientação de Caroline de Souza Montenegro.

Zissou, Hellen Albuquerque

Fosfolipase A2 secretória do grupo V e infecção por *Schistosoma mansoni*: análise do impacto de gênero em modelo experimental murino / Hellen Albuquerque Zissou. -- Rio de Janeiro, 2022.

46 f.

Z81f

Orientadores: Bruno Lourenço Diaz e Christianne Bandeira de Melo.

Coorientadora: Caroline de Souza Montenegro.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -

Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2022.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. sPLA2gV. 3. Resposta Imune do tipo 2. 4. C57BL/6. 5. Macho. I. Diaz, Bruno Lourenço, orient. II. Melo, Christianne Bandeira de, orient. III. Montenegro, Caroline de Souza, coorient. IV. Título.

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO**

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO
RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO
EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO: **Hellen Albuquerque Zissou**

DRE: 118052999

BANCA EXAMINADORA: Profa. Dra. Alessandra D’Almeida Filardy (Presidente)
Dra. Amanda Roberta Revoredo Vicentino
Dra. Valdirene de Souza Muniz
Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (Suplente)

Título da Monografia: **“Fosfolipase A2 secretória do grupo V e infecção por
Schistosoma mansoni: análise do impacto de gênero em modelo
experimental murino”**

Local: Sala virtual <https://meet.google.com/tdq-ofxu-nvq>

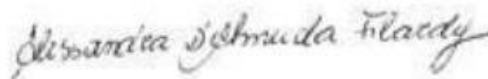
Data e hora de início: **7 de março de 2022 às 9:00h**

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota **10** neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelo presidente da banca examinadora, aluno, orientador (ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 07 de março de 2022.

NOTA	Banca Examinadora:
10	Profa. Dra. Alessandra D’Almeida Filardy
10	Dra. Amanda Roberta Revoredo Vicentino
10	Dra. Valdirene de Souza Muniz
_____	Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes

Presidente da banca



Profa. Dra. Alessandra D’Almeida Filardy

Aluno:



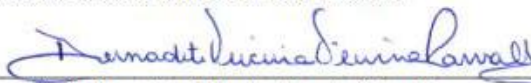
Hellen Albuquerque Zissou

Orientador:



Dr. Bruno Lourenço Diaz / Coorientador: Dra. Christianne Bandeira de Melo

Coordenador
de TCC



Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Christianne Bandeira de Melo, pela oportunidade de ter aprendido tanto nos meus anos de iniciação científica, por ser sempre um exemplo e inspiração nessa linda profissão. Por toda paciência, dedicação e incentivo. Sou muito grata por ter tido o privilégio de ser orientada por alguém tão especial.

Ao meu orientador, professor Bruno Diaz, pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Inflamação, por todos os ensinamentos e por ser um excelente exemplo de profissional.

Ao professor Claudio Canetti, pelos ensinamentos diários, por todas as conversas compartilhando experiências e, principalmente, por tornar os dias mais divertidos no laboratório.

Aos meus pais, André e Nilza, por terem me dado todo o suporte para chegar até aqui, por todo o apoio, amor, incentivo e por acreditarem sempre em mim. Obrigada por serem meus maiores exemplos. E aos meus irmãos, Susan e Matheus, por estarem sempre ao meu lado.

À minha co-orientadora, Caroline Montenegro, que esteve sempre disposta a responder meus questionamentos, por me explicar quantas vezes fosse necessário, me acalmar antes das apresentações de trabalho e, principalmente, por ter se tornado uma amiga tão especial. Agradeço por todas as conversas sérias, pelas risadas, por tornar os dias mais leves com a sua forma tranquila de falar e por sempre me acompanhar na coquinha gelada depois de um dia de experimento.

À minha dupla de laboratório, Vitória Fernanda, por ter estado ao meu lado nos últimos anos. Foi um prazer dividir tantos momentos importantes com você durante a graduação e iniciação científica. Agradeço pela torcida de sempre, conversas à tarde com bolo de cenoura e por ser a melhor companhia no trânsito da linha amarela, você foi essencial.

Aos amigos do Laboratório de Inflamação, agradeço pelo acolhimento desde o início, pelas conversas e torcidas durante essa jornada.

Ao grupo Seleção Natural, formado pelas melhores amigas que eu poderia ter tido para dividir os anos de graduação. Obrigada por estarem presentes nos momentos mais complicados, pelo apoio e incentivo incansáveis.

Aos colaboradores do projeto: Laboratório de Malacogia (Fiocruz), Laboratório de Imunofarmacologia (Fiocruz), Laboratório de Biologia Molecular do Vírus (IBCCF) e as Plataformas PIA (Plataforma de Imuno-Análise), PLAMOL (Plataforma de Microscopia Óptica de Luz Gustavo de Oliveira Castro) e PEPAB (Plataforma de Expressão, Purificação e Análise de Biomoléculas).

Aos professores que aceitaram participar da banca de defesa da monografia.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPERJ, pelo apoio financeiro para a realização do projeto.

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

HELLEN ALBUQUERQUE ZISSOU

FOSFOLIPASE A₂ SECRETÓRIA DO GRUPO V E INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni*: ANÁLISE DO IMPACTO DE GÊNERO EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO

Orientadores: Bruno Lourenço Diaz e Christianne Bandeira de Melo

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A enzima fosfolipase A₂ secretória do grupo V (sPLA₂gV) parece ser uma molécula imunomodulatória com impacto na definição do perfil da resposta imune a ser instalado em diferentes contextos fisiopatológicos. Um modelo experimental interessante para investigar o papel da sPLA₂gV na polarização da resposta é a infecção por *S. mansoni*, visto que esta caracteriza-se por instalação inicial de uma resposta imunológica de tipo 1, seguida por polarização da resposta para o tipo 2. Camundongos C57BL/6 *versus* BALB/c apresentam diferentes perfis de montagem da resposta imune frente a diferentes estímulos, sendo o gatilho de resposta Th1 predominante em camundongos C57BL/6, enquanto animais BALB/c preferencialmente montam resposta tipo 2 caracterizada por inflamação eosinofílica. Mais ainda, diferenças de gênero em modelos experimentais murinos são observadas no desenvolvimento da infecção, que parecem ser parcialmente ocasionadas pela ação de hormônios sexuais, indicando ser necessário estudo de moléculas regulatórias durante este modelo de infecção. Dessa forma, o estudo visou a identificação do modelo experimental murino ideal para se investigar o papel da sPLA₂gV no contexto da infecção por *S. mansoni*. Acompanhamos o desenvolvimento da infecção em machos e fêmeas, C57BL/6 e BALB/c, em animais deficientes para a enzima sPLA₂gV e selvagens, através da avaliação de sobrevivência, da carga parasitária e resposta do tipo 2. A análise da sobrevivência dos animais infectados por *S. mansoni* mostrou que, dentre os quatro modelos estudados, apenas “C57BL/6 macho” exibe diminuição de sobrevivência dos animais deficientes para a sPLA₂gV a partir do 55º dia de infecção. A quantificação de ovos presentes nas fezes foi realizada com 20, 30, 45, 55 e 75 dias de infecção, onde em machos C57BL/6 selvagens, ovos são detectáveis nas fezes com 45 dias, atingem número máximo com 55 e decaem com 75 dias de infecção. Apesar de cinética similar,

fêmeas C57BL/6 e ambos os gêneros de BALB/c exibem deposição de ovos nas fezes com magnitude inferior. Em animais C57BL/6 machos deficientes para a enzima, o número de ovos de *S. mansoni* encontrados nas fezes em 55 dias de infecção mostrou-se marcadamente reduzido comparado aos animais WT, enquanto os outros modelos animais estudados não mostraram diferença significativa.. Para análise da eosinofilia peritoneal os animais foram eutanasiados com 55 dias. Resultado similar foi encontrado para o parâmetro de eosinofilia peritoneal induzida pela infecção, onde os machos C57BL/6 também desenvolveram reação eosinofílica de maior intensidade que se mostrou sensível à ausência da enzima. Como marcador de estabelecimento de resposta imune do tipo 2, foram avaliados também os níveis de IL-13 no sobrenadante do lavado peritoneal, onde o grupo de camundongos “C57BL/6 macho” apresentou redução acentuada da citocina em animais deficientes para a enzima sPLA₂gV, enquanto os modelos “C57BL/6 fêmea”, “BALB/c macho” e “BALB/c fêmea” não exibiram diferenças significativas entre animais selvagens (WT) e com ausência da enzima (*Pla2g5*^{-/-}). Assim, selecionamos camundongos C57BL/6 machos como modelo experimental ideal para o estudo do papel da enzima sPLA₂gV na infecção por *Schistosoma mansoni*.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, sPLA₂gV, Resposta Imune do tipo 2, C57BL/6, Macho, Fêmea

ABSTRACT

HELLEN ALBUQUERQUE ZISSOU

GROUP V SECRETORY PHOSPHOLIPASE A₂ AND INFECTION BY *Schistosoma mansoni*: ANALYSIS OF GENDER IMPACT IN A MURINE EXPERIMENTAL MODEL

Orientadores: Bruno Lourenço Diaz e Christianne Bandeira de Melo

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Group V secretory phospholipase A₂ enzyme (sPLA₂gV) appears to be an immunomodulatory molecule with an impact on the definition of the immune response profile to be installed in different pathophysiological contexts. An interesting experimental model to investigate the role of sPLA₂gV in response polarization is *S. mansoni* infection, as it is characterized by the initial installation of a type 1 immune response, followed by type 2 response polarization. Mice C57BL/6 versus BALB/c present different profiles of mounting the immune response to different stimuli, with the Th1 response being predominant in C57BL/6 mice, while BALB/c animals preferentially mount a type 2 response characterized by eosinophilic inflammation. Furthermore, gender differences in experimental murine models are observed in the development of the infection, which seem to be partially caused by the action of sex hormones, indicating the need to study regulatory molecules during this model of infection. Thus, the study aimed to identify the ideal murine experimental model to investigate the role of sPLA₂gV in the context of *S. mansoni* infection. We followed the development of infection in males and females, C57BL/6 and BALB/c, in sPLA₂gV -deficient and wild-type animals, by evaluating survival, parasite load and type 2 response. The analysis of the survival of animals infected by *S. mansoni* showed that, among the four models studied, only “C57BL/6 male” showed a decrease in the survival of animals deficient for sPLA₂gV from the 55th day of infection. The quantification of eggs present in the feces was performed at 20, 30, 45, 55 and 75 days of infection, in wild-type C57BL/6 males, eggs are detectable in feces at 45 days, peak at 55 days and decay at 75 days of infection. Despite similar kinetics, C57BL/6 females and both BALB/c genera exhibit lower magnitude egg deposition in feces. In male C57BL/6 animals deficient for the enzyme, the number of *S. mansoni* eggs found in the feces at 55 days of infection was

markedly reduced compared to WT animals, while the other animal models studied showed no significant difference. For the analysis of peritoneal eosinophilia the animals were euthanized at 55 days. A similar result was found for the infection-induced peritoneal eosinophilia parameter, where C57BL/6 males also developed a higher intensity eosinophilic reaction that was sensitive to the absence of the enzyme. As an indicator of the establishment of a type 2 immune response, the levels of IL-13 were also evaluated, where the group of “C57BL/6 male” mice showed a marked reduction in cytokine in animals deficient for the sPLA₂gV enzyme, while the “C57BL /6 female”, “BALB/c male” and “BALB/c female” did not show significant differences between wild-type animals (WT) and sPLA₂gV-deficient animals (Pla2g5^{-/-}). Thus, we selected male C57BL/6 mice as the ideal experimental model for studying the role of the sPLA₂gV enzyme in *Schistosoma mansoni* infection.

Key words: *Schistosoma mansoni*, sPLA₂gV, Type 2 response, C57BL/6, Male, Female

RESUMO PARA LEIGOS

HELLEN ALBUQUERQUE ZISSOU

FOSFOLIPASE A₂ SECRETÓRIA DO GRUPO V E INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni*: ANÁLISE DO IMPACTO DE GÊNERO EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO

Orientadores: Bruno Lourenço Diaz e Christianne Bandeira de Melo

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

A esquistossomose é uma doença causada predominantemente pelo parasita *Schistosoma mansoni*. Essa doença é de grande relevância no cenário global, devido à severidade do quadro clínico e marcante prevalência. A partir da infecção pelas cercárias, que são a forma infectante do parasita, ocorre a instalação de resposta imunológica com o intuito de eliminação do helminto. Essa resposta tem características específicas de acordo com a fase de desenvolvimento da infecção, sendo assim, durante a fase aguda, a resposta imunológica é predominantemente de perfil tipo 1, com a presença de células como macrófagos que tem como objetivo eliminar as formas adultas do parasita. No entanto, após a deposição de ovos do *S. mansoni*, a resposta imunológica muda de perfil para o tipo 2 com surgimento de células como os linfócitos Th2, que liberam citocinas que irão favorecer recrutamento de outras células para o local da infecção, provocando inflamação. O objetivo desse trabalho foi entender qual modelo experimental em camundongos é o ideal para o estudo do papel de uma enzima que parece ser regulatória no estabelecimento da resposta imunológica durante a infecção por *Schistosoma mansoni*, tendo em vista que existem diferenças relacionadas ao gênero dos animais durante a infecção devido à presença de hormônios sexuais e outras possíveis moléculas. Para isso, foi realizada a infecção de camundongos machos e fêmeas, com ou sem a presença da enzima, e de dois modelos diferentes (C57BL/6 e BALB/c). Esses grupos foram avaliados no decorrer da infecção, através de: verificação da taxa de mortalidade dos animais, quantidade de ovos liberados nas fezes e análise da presença de células marcadoras de uma infecção por parasita e da resposta de perfil tipo 2. Com isso, verificou-se que os camundongos machos C57BL/6 são o modelo ideal para o estudo do papel da enzima, pois nesse grupo a enzima: apresenta função protetora contra a mortalidade causada pela infecção; leva a mudanças na liberação de ovos nas fezes; e ainda, parece contribuir para a instalação de uma resposta protetora de perfil tipo 2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sítios de clivagem das diferentes famílias de Fosfolipases nos fosfolipídeos

Figura 2 – Mapa do status da esquistossomose em países endêmicos em 2020

Figura 3 – Ovos de *Schistosoma mansoni*

Figura 4 - Ciclo biológico do *S. mansoni*

Figura 5 – Resposta imunológica durante a infecção por *S. mansoni*

Figura 6 – Cortes histológicos de fígado (corados com H&E)

Figura 7 – Revelação do gel

Figura 8 – Desenho experimental

Figura 9 – A enzima sPLA_{2gV} possui papel protetor contra a mortalidade induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni* apenas em camundongos C57BL/6 machos

Figura 10 – A enzima sPLA_{2gV} possui papel mais expressivo na regulação da liberação de ovos apenas nas fezes de camundongos C57BL/6 machos

Figura 11 – A enzima sPLA_{2gV} é capaz de induzir eosinofilia peritoneal característica da infecção por *S. mansoni* apenas em camundongos C57BL/6 machos infectados

Figura 12 – A enzima sPLA_{2gV} exerce papel na indução de IL-13 na infecção por *Schistosoma mansoni* apenas em camundongos C57BL/6 machos infectados

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Ácido araquidônico

cPLA₂ - Fosfolipase 2 citosólica

dNTPs - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

HE - Hematoxilina e eosina

IFN - Interferon

Ig - Imunoglobulina

IL- Interleucina

iPLA₂ - Fosfolipase A₂ independente de Ca⁺

KOH - Hidróxido de potássio

PCR - Reação em cadeia da polimerase

PL - Fosfolipase

sPLA₂ - Fosfolipase A₂ secretória

TCD4 - Célula T CD4⁺

Th- Linfócitos T auxiliares

TGF-β- Fator de crescimento transformador

TNF - Fator de necrose tumoral

Treg- Células T regulatórias

ÍNDICE

RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Fosfolipases	1
1.2 Esquistossomose: aspectos epidemiológicos	3
1.3 Infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	6
1.4 Resposta imunológica na esquistossomose mansônica	8
1.5 Eosinófilos na infecção por <i>S. mansoni</i>	11
1.6 Camundongos de linhagem BALB/c e C57BL/7	11
1.7 Diferenças relacionadas ao gênero do modelo experimental murino de infecção por <i>S. mansoni</i>	12
2 JUSTIFICATIVA	14
3 OBJETIVOS	15
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Animais	16
4.2 Genotipagem	16
4.3 Infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	17
4.4 Exame parasitológico de fezes	18
4.5 Análise de eosinofilia peritoneal	18
4.6 Dosagem de citocinas	19
4.7 Análise estatística	19
5 RESULTADOS	20
5.1 A enzima sPLA ₂ gV protege contra a mortalidade induzida pela infecção por <i>S. mansoni</i> em camundongos C57BL/6 machos	20

5.2 A enzima sPLA ₂ gV possui papel regulador na liberação de ovos de <i>S. mansoni</i> nas fezes de camundongos C57BL/6 machos infectados	21
5.3 A enzima sPLA ₂ gV é capaz de induzir eosinofilia peritoneal característica da infecção por <i>S. mansoni</i> em camundongos C57BL/6 machos infectados	22
5.4 A enzima sPLA ₂ gV exerce papel na indução de IL-13 na infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos C57BL/6 machos infectados	24
6 DISCUSSÃO	25
7 CONCLUSÕES	27
8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fosfolipases

As fosfolipases (PL) são enzimas lipolíticas capazes de hidrolisar fosfolipídios, sendo assim responsáveis pela conversão dessas moléculas em mediadores lipídicos, que por participarem de vias de transdução de sinal, proliferação, apoptose e transporte de membrana na célula, podem levar à progressão de patologias. A subdivisão das PLs ocorre de acordo com o sítio de clivagem do fosfolipídio, podendo ser 4 famílias: A (A1 e A2), B, C e D (**Figura 1**) (Bou Khalil *et al.*, 2010; Sandoval, 2018).

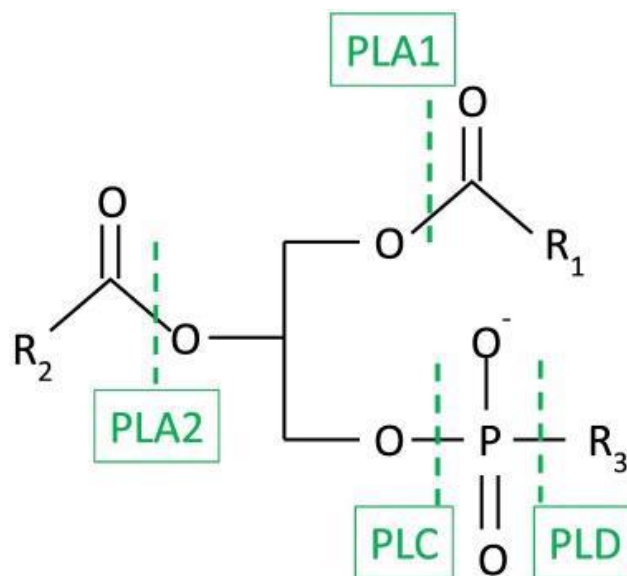


Figura 1: Sítios de clivagem das diferentes famílias de Fosfolipases nos fosfolipídeos. Representação do sítio de clivagem das diferentes Fosfolipases. As fosfolipases B possuem ao mesmo tempo a atividade da PLA₁ e PLA₂. Fonte: Shayman, J.A., Tesmer, J.J.G. Lysosomal phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, (2019).

A família das fosfolipases A₂ (PLA₂) hidrolisam a ligação na posição *sn-2*, formando ácidos graxos e lisofosfolipídios. As PLA₂ se dividem em 3 principais classes: dependente de Ca²⁺ citosólica (cPLA₂), independente de Ca²⁺ intracelular (iPLA₂) e secretória (sPLA₂). É importante destacar que a PLA₂ citosólica exerce papel fundamental em processos inflamatórios, uma vez que sua ação vai levar à liberação e disponibilidade do ácido araquidônico que é substrato necessário para biossíntese de eicosanóides (Boilard *et al.*, 2010;

Murakami *et al.*, 2011; Henderson *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2014; Filkin, Lipkin e Fedorov, 2020).

No genoma humano foram codificados 10 genes de PLA₂ do tipo secretória, mais especificamente, a fosfolipase A₂ secretória do grupo V (sPLA₂gV) é uma enzima de tamanho 14 kDa, que tem seu papel funcional estudado de forma mais direta a partir da geração de camundongos deficientes na enzima sPLA₂gV. Esses camundongos “knockout” foram descritos como ferramenta experimental de estudo por Satake, Diaz, e colaboradores em 2004. O estudo em questão evidenciou que a sPLA₂gV exerce função regulatória na geração de eicosanóides, porém de forma secundária e auxiliando na amplificação e ativação sequencial da cPLA₂, já conhecida pelo papel essencial na disponibilização de ácido araquidônico para biossíntese de leucotrienos e prostaglandinas. Ainda, para entender a relação da enzima e da produção de eicosanóides, foram avaliados os macrófagos peritoneais de camundongos *Pla2g5*^{-/-} *in vitro*, e geração de leucotrieno cisteínado (CysLT) a partir de um ensaio utilizando injeção de zymosan *in vivo*, onde os resultados obtidos exibiram redução nos níveis de leucotrieno cisteínado (CysLT) e PGE₂ em camundongos *Pla2g5*^{-/-}, evidenciando o envolvimento da sPLA₂gV na produção de eicosanóides induzida por zymosan (Satake *et al.*, 2004; (Kikawada, Bonventre e Arm, 2007).

A enzima sPLA₂gV é capaz de mediar efeitos biológicos múltiplos, incluindo metabolismo lipídico, migração leucocitária, inflamação das vias aéreas, atividade transcricional, fagocitose e trombose (Henderson *et al.*, 2013; Htwe *et al.*, 2021). A sPLA₂gV foi identificada como sendo expressa em macrófagos de linhagem *P338D1* (Balboa *et al.*, 1996; Kessen *et al.*, 2005), mastócitos derivados de medula óssea (Bingham *et al.*, 1999), células Th2 (Ho *et al.*, 2001), neutrófilos humanos (Degousee *et al.*, 2002) e células epiteliais pulmonares (Masuda *et al.*, 2005).

Faz-se importante aqui destacar que a sPLA₂gV parece ainda ter papel imunoregulatório voltado para o estabelecimento de resposta do Tipo 2. Especificamente, identificou-se a participação da enzima em patologias que possuem inicialmente uma fase Th1 seguida de polarização para resposta imune do Tipo 2, como modelos de asma e a leishmaniose (Giannattasio *et al.*, 2010; Zamith-Miranda *et al.*, manuscrito em preparação). Alinhado a estes achados, Sato e colaboradores (2014) mostraram através da utilização do camundongo *Pla2g5*^{-/-}, que a enzima sPLA₂gV atua de maneira a desempenhar papel anti-inflamatório na obesidade, uma vez que camundongos com ausência da enzima apresentaram obesidade de forma mais

intensa e maior resistência à insulina. Além disso, houve indícios de que a ausência da enzima levou à diminuição de resposta Th2/M2, assim agravando o quadro inflamatório em contexto de obesidade, visto que a enzima estaria envolvida na disponibilização de ácido graxo e consequentemente na polarização de macrófagos M1 para M2 (Sato *et al.*, 2014).

A cPLA₂ (citossólica) é reconhecida como a principal responsável pela disponibilização de ácido araquidônico para síntese de eicosanóides, então para o entendimento do potencial envolvimento da sPLA₂gV nesse contexto, foi realizado outro estudo relevante, que consistiu na utilização do modelo de camundongo deficiente para a enzima (*Pla2g5^{-/-}*) em linhagens C57BL/6 e BALB/c, para análise da participação da (sPLA₂gV) na produção de eicosanóides por mastócitos derivados de cultura de medula óssea (BMMC). Os mastócitos (BMMC) de animais C57BL/6 deficientes para sPLA₂gV apresentaram redução na geração imediata e tardia de PGD₂, no entanto, em modelos em que se utilizou animais BALB/c *Pla2g5^{-/-}*, não foi possível observar tal redução em ambas as fases de produção de eicosanóides. Identificou-se que a enzima sPLA₂gV atua na amplificação da geração tardia de PGD₂ através da indução de expressão de COX-2, de forma dependente da linhagem de camundongo (Diaz *et al.*, 2006).

Dessa forma, considerando o aparente papel imunoregulatório da sPLA₂gV voltado para o estabelecimento de resposta imune do Tipo 2, a infecção por *Schistosoma mansoni* representa um interessante modelo experimental para investigação funcional da enzima, uma vez que apresenta perfil de resposta similar aos observados em outras patologias citadas acima.

1.2. Esquistossomose: aspectos epidemiológicos

A esquistossomose é uma doença tropical parasitária negligenciada, causada pelo trematódeo *Schistosoma*, que acomete cerca de 258 milhões de pessoas no mundo, além de 779 milhões de indivíduos que estão sob risco de infecção por viverem em áreas endêmicas. A doença está associada ao baixo nível socioeconômico e é encontrada principalmente em países da América Latina, África e Leste Mediterrâneo, devido à restrição do hospedeiro intermediário a esses locais (**Figura 2**) (McManus *et al.*, 2018; OMS, 2020).

A esquistossomose pode se apresentar em duas principais formas: a intestinal e a urogenital. A infecção é prevalente em áreas tropicais e subtropicais que não possuem saneamento adequado e água potável e é causada principalmente por cinco espécies. A

esquistossomose intestinal pode ser causada pelas seguintes espécies: *Schistosoma guineenses*; *Schistosoma intercalatum*; *Schistosoma mansoni*; *Schistosoma japonicum*; e *Schistosoma mekongi*. Enquanto a esquistossomose urogenital é causada pelo *Schistosoma haematobium* (Jenkins-Holick e Kaul, 2013; Le e Hsieh, 2017).

A esquistossomose afeta principalmente regiões pobres e rurais, entre os indivíduos vulneráveis à infecção, estão: agricultores, crianças com higiene inadequada e mulheres que realizam trabalhos domésticos em água contaminada. De forma geral, a infecção ocorre através do contato com formas larvais do parasita, presentes em água contaminada, capazes de penetrar a pele do indivíduo. Já a transmissão ocorre quando um indivíduo infectado contamina a água a partir da liberação de ovos presentes em suas fezes, no entanto, alguns ovos ficam retidos nos tecidos e esse evento pode causar imunopatologias e danos teciduais em órgãos como o fígado, por exemplo (Gryseels *et al.*, 2006; Osakunor, Woolhouse e Mutapi, 2018).

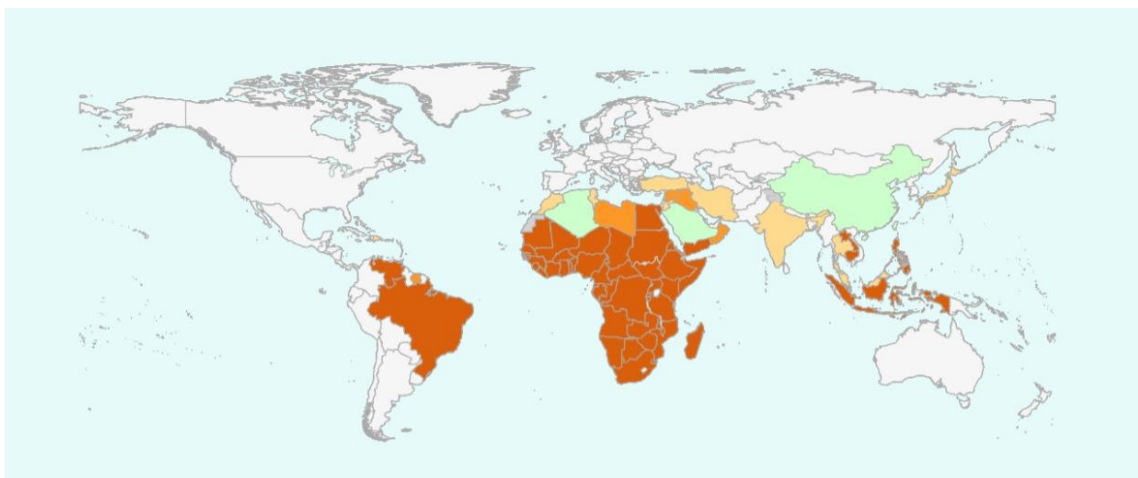


Figura 2: Mapa do status da esquistossomose em países endêmicos em 2020. As estatísticas mostraram que 61,58% dos países são não endêmicos (branco), 25,12% precisaram de quimioterapia preventiva (laranja escuro), 8,87% tem a interrupção de transmissão a ser confirmada (laranja claro); 2,96 % precisam confirmar o status de transmissão (laranja médio) e no restante dos países as estimativas não foram aplicáveis (cinza). Adaptado de Organização Mundial da Saúde (2021).

Disponível em: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html

A esquistossomose intestinal pode levar à apresentação de diversos sintomas relacionados à exposição do hospedeiro aos ovos do parasita em seu sistema, como: dor abdominal, febre, sangue nas fezes e diarreia. O aumento do fígado é comumente observado

em estágios avançados da doença, e está associado com o acúmulo de fluido na cavidade peritoneal e hipertensão portal. Há também casos de aumento do conteúdo esplênico. Em relação à esquistossomose urogenital, o sintoma mais comum é a presença de sangue na urina, e em casos avançados há presença de fibrose na bexiga e danos renais. Há também casos de aumento do conteúdo esplênico. Em relação à esquistossomose urogenital, o sintoma mais comum é o aumento do conteúdo esplênico. Em relação à esquistossomose urogenital, o sintoma mais comum é a presença de sangue na urina, e em casos avançados há presença de fibrose na bexiga e danos renais. A esquistossomose em sua fase crônica pode causar incapacidade ou morte dos indivíduos infectados. O alto índice de óbitos causados pela doença pode estar relacionado ao câncer de bexiga, falha hepática e renal, por exemplo (Caldas, 2008; Le e Hsieh, 2017).

Em crianças, a doença pode causar anemia, atrofia e diminuição na capacidade de aprendizado, no entanto, esses efeitos normalmente são reversíveis quando realizado tratamento (Osakunor, Woolhouse e Mutapi, 2018).

O diagnóstico da esquistossomose é realizado através da detecção de ovos do parasita nas fezes ou urina do hospedeiro infectado. Na esquistossomose intestinal, os ovos podem ser detectados por técnica padrão conhecida como Kato-Katz, que consiste em análise microscópica do conteúdo fecal, viabilizando a identificação dos característicos ovos de *Schistosoma* devido à presença de espícula lateral (**Figura 3**). Entretanto, essa detecção só pode ser realizada cerca de oito semanas após a infecção, quando o parasita passa a liberar ovos no sistema do hospedeiro (Katz, Chaves e Pellegrino, 1972; Rabello, 1997; Ross *et al.*, 2002).

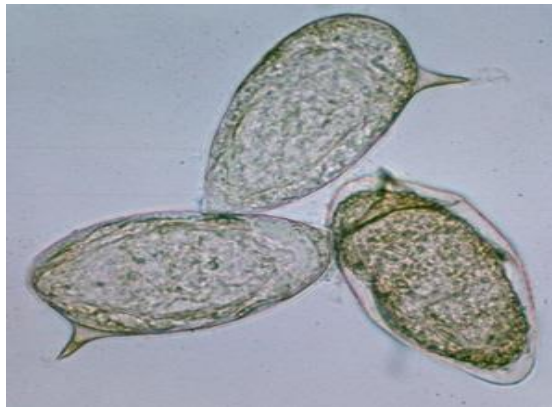


Figura 3: Ovos de *Schistosoma mansoni*. É possível observar a presença de espicula lateral característica dos ovos do parasita. Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>

Em áreas de transmissão de *Schistosoma mansoni*, é possível fazer a detecção de anticorpos e antígenos em amostras de sangue ou urina, utilizando-se o teste de CCA (“Circulating Cathodic Antigen”). Mas em áreas não-endêmicas, podem ser realizados testes sorológicos para determinar a possível exposição à infecção e a necessidade de exames para acompanhamento e tratamento (Tchuenté *et al.*, 2012; Elbasheir, Karti e Elamin, 2020).

Para esquistossomose urogenital, a técnica mais utilizada para diagnóstico é a de filtração. Crianças infectadas com *Schistosoma haematobium* quase sempre apresentam sangue em proporção microscópica na urina, podendo assim, ser detectado através de tiras de reagente (Le e Hsieh, 2017).

O tratamento da esquistossomose consiste na utilização do fármaco Praziquantel, sendo o único medicamento disponível contra a infecção. O fármaco anti-esquistossomótico oferece segurança, baixo custo, fácil distribuição e eficácia. No entanto, atualmente, a quimioterapia preventiva em larga escala têm sido a ferramenta mais eficaz para o controle da doença, visto que é um fármaco pouco efetivo nos estágios iniciais do desenvolvimento parasitário e mais efetivo contra as formas adultas do verme. Considerando o grupo infantil como um dos mais vulneráveis à infecção, os programas de quimioterapia preventiva possuem foco em crianças em idade escolar. O medicamento é também distribuído para a população em risco através de programas de administração em massa. Há, porém, uma preocupação com o desenvolvimento de resistência associada a esse fármaco, uma vez que a utilização desse fármaco é realizada em

massa e repetidas vezes pela população (Zwang e Olliaro, 2014; Vale *et al.*, 2017; Osakunor, Woolhouse e Mutapi, 2018).

1.3. Infecção por *Schistosoma mansoni*

O ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* depende do hospedeiro definitivo, sendo o homem o principal, e de um hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria glabrata*. Os ovos de *Schistosoma mansoni* eclodem ao entrar em contato com a água, liberando os miracídeos, que são larvas capazes de infectar o hospedeiro intermediário. O caramujo infectado libera então as cercárias na água, forma infectante do homem. Após a penetração na pele do hospedeiro definitivo, a cercária se transforma em esquistossômulo, o qual é capaz de alcançar a circulação sanguínea e ser transportado de forma passiva até o coração. É então bombeado para o pulmão e em seguida retorna para o coração para atingir assim a circulação sistêmica. Os esquistossômulos ao chegarem no sistema portal terminam seu desenvolvimento, amadurecendo em adultos com sexos dimórficos. O verme macho mantém a fêmea em seu canal ginecóforo, o par migra do fígado para as veias mesentéricas, onde ocorre a cópula e a oviposição. Então, parte dos ovos migra para o tecido hepático, induzindo a formação de granulomas. No tecido hepático, o granuloma não pode ser eliminado tornando-se fibrótico no decorrer do tempo. No entanto, para dar continuidade ao ciclo biológico, os ovos precisam amadurecer para serem eliminados pelas fezes (**Figura 4**). Alguns ovos não são eliminados por não alcançarem o lúmen intestinal, permanecendo no intestino. (Carvalho, Coelho e Lenzi, 2008; Schwartz, 2018; Nation *et al.*, 2020).

A infecção por *Schistosoma mansoni* pode ser dividida em 2 fases: aguda e crônica. A fase aguda pode ser assintomática ou sintomática, de forma a apresentar a dermatite cercariana no sítio onde houve exposição à cercária, além de sintomatologia da Febre Katayama, como linfadenopatia, dor abdominal, cefaleia, febre, e a hepatoesplenomegalia característica. Com a progressão da doença, cerca de 6 meses após a infecção, observa-se a fase crônica, surgindo sinais de complicação, como: fibrose hepática, hemorragia digestiva e insuficiência hepática (McManus *et al.*, 2018; Ministério da Saúde, 2019).

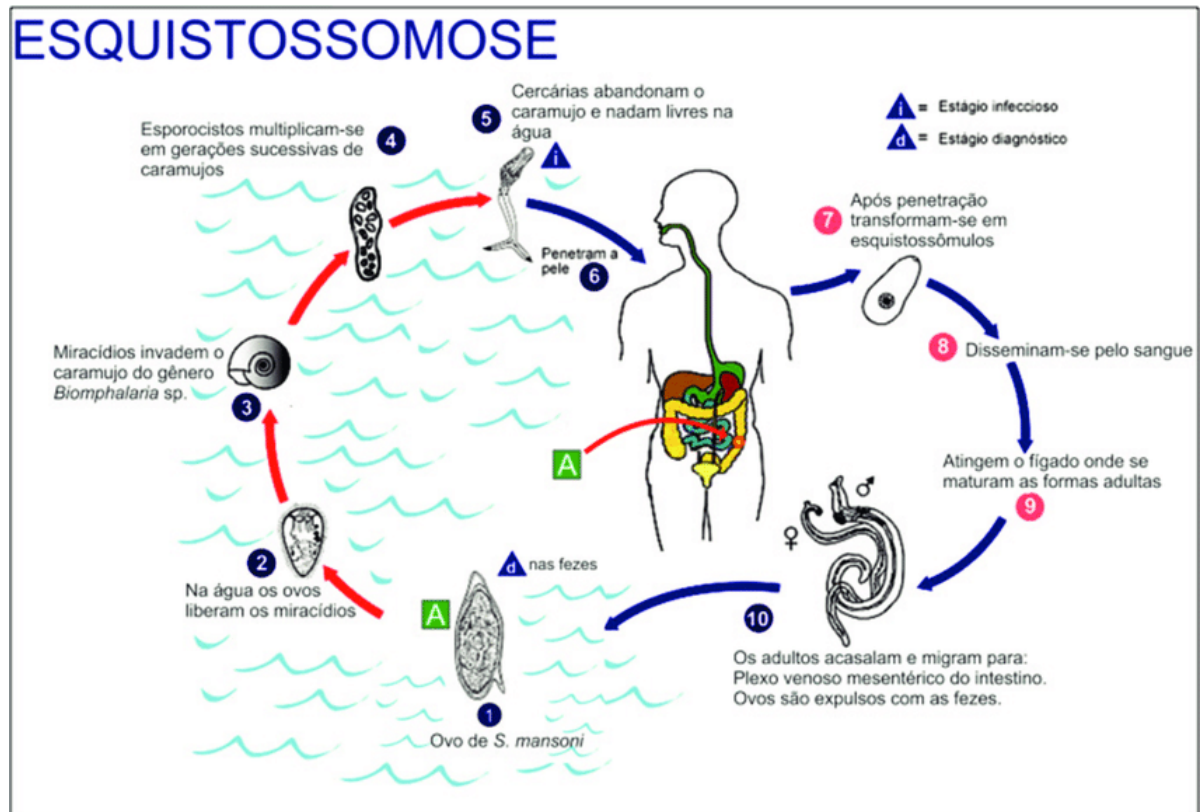


Figura 4: Ciclo biológico do *S. mansoni*. (1) Liberação de Ovos de *S. mansoni* nas fezes do indivíduo infectado; (2) Liberação de miracídeos a partir da eclosão dos ovos; (3) Miracídeos invadem o caramujo do gênero *Biomphalaria sp.* (hospedeiro intermediário); (4) Esporocistos multiplicam-se em gerações sucessivas de caramujos; (5) Liberação das cercárias do caramujo para a água; (6) Penetração das cercárias na pele humana; (7) Transformação das cercárias em esquistossomulos; (8) Disseminação pelo sangue; (9) Migração para o fígado onde se maturam em formas adultas; (10) Acasalamento dos adultos e migração para o intestino onde produzem ovos que são excretados com as fezes. Adaptado de Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), 2017.

1.4. Resposta imunológica na esquistossomose mansônica

Infecções causadas por *Schistosoma mansoni* levam à exposição do hospedeiro à diferentes antígenos durante os estágios do complexo ciclo de vida do parasita. Durante a fase aguda da esquistossomose, antes da presença de ovos do parasita nas fezes, a resposta é direcionada ao antígeno do parasita sendo predominantemente de Tipo 1, caracterizada pelo aumento dos níveis de citocinas IL-1, IL-6, além da presença de macrófagos que secretam óxido nítrico e linfócitos liberando citocinas do tipo fator de necrose tumoral (TNF- α) e interferon (IFN- γ). Com a cópula dos vermes adultos e posterior liberação de ovos, a resposta de Tipo 1 sofre polarização para o perfil Tipo 2, caracterizada pela liberação das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, responsáveis por promover aumento característico de níveis sistêmicos de eosinófilos (**Figura 5**) (Dunne e Cooke, 2005; Zheng *et al.*, 2020).

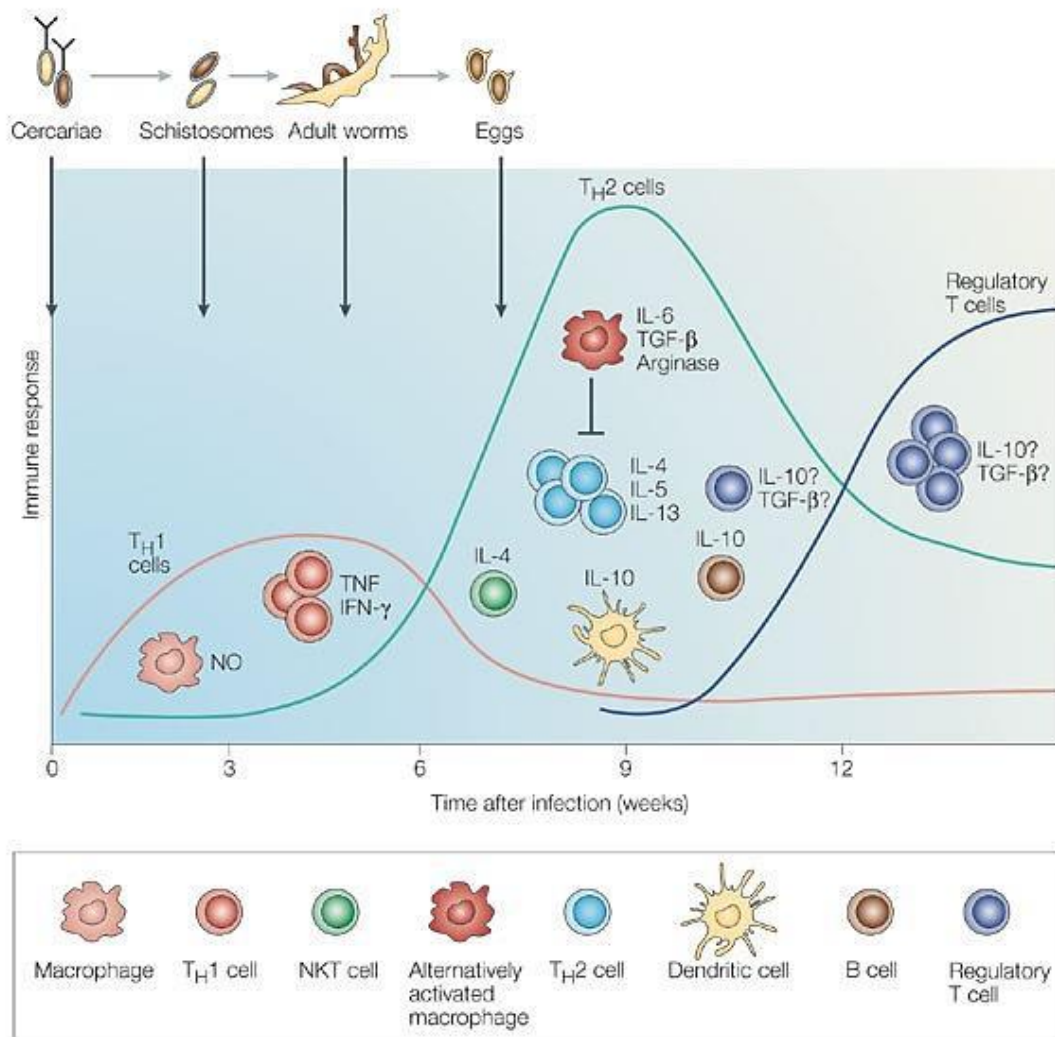


Figura 5: Resposta imunológica durante a infecção por *S. mansoni*. Nas primeiras semanas de infecção, antes da liberação dos ovos, a resposta imunológica é prioritariamente de perfil Th1 com a presença de macrófagos secretando óxido nítrico (NO) e linfócitos liberando citocinas INF e IFN- γ . Após a liberação dos ovos, a resposta é polarizada para o perfil Th2 caracterizada pela liberação de citocinas pró inflamatórias como IL-4, IL-5 e IL-13. A partir da décima segunda semana de infecção a resposta tem caráter mais regulatório com a liberação de citocinas como IL-10 e TGF- β .

O declínio da resposta Tipo 1 é gerado não apenas pela presença do antígeno solúvel do ovo do parasita, mas também por células CD25+CD4+ produtoras de IL-10, ambos capazes de inibir a secreção de IL-12 pelas células dendríticas, além de induzir a polarização da resposta para o tipo 2 que em conjunto com a resposta T regulatória, é capaz de impedir o desenvolvimento da resposta Tipo 1 (McKee e Pearce, 2004).

Com o desenvolvimento da resposta imune do Tipo 2, os níveis de Imunoglobulina E aumentam paralelamente aos níveis de eosinófilos circulantes, com liberação de citocinas do

tipo 2, como: IL-4 e IL-5, responsáveis por auxiliar as células B na mudança de isotipo de imunoglobulinas para IgE, e de atuar como fator de crescimento e sobrevivência para eosinófilos, respectivamente (Mosmann, 1992).

Em decorrência da liberação de ovos pelas fêmeas do parasita, observa-se o surgimento de inflamação nos tecidos hepático e intestinal. Essa resposta imune desempenha papel fundamental na determinação da intensidade da doença. A resposta imune mediada por células TCD4+ é essencial para evitar danos nos hepatócitos durante a infecção, que poderiam ser causados por moléculas secretadas pelos ovos de *Schistosoma mansoni* (**Figura 6**). Nesse sentido, essas células são responsáveis pelo início da resposta granulomatosa ao redor dos ovos presentes nos tecidos, na tentativa de contê-los e impedir danos hepáticos gerados por toxinas (Hams *et al.*, 2013).

Os granulomas são importantes mecanismos imunológicos no contexto da infecção por *Schistosoma mansoni*. Essa resposta granulomatosa atinge o ápice entre a oitava e décima semana após a infecção, com níveis altos de produção de citocinas, que diminuem no decorrer da infecção até o estabelecimento da fase crônica entre a décima sexta e a vigésima semana. Os eosinófilos constituem uma das principais populações presentes no granuloma, sendo recrutados por citocinas do tipo 2 e associados à resposta protetora contra helmintos (Moore, Grove e Warren, 1977).

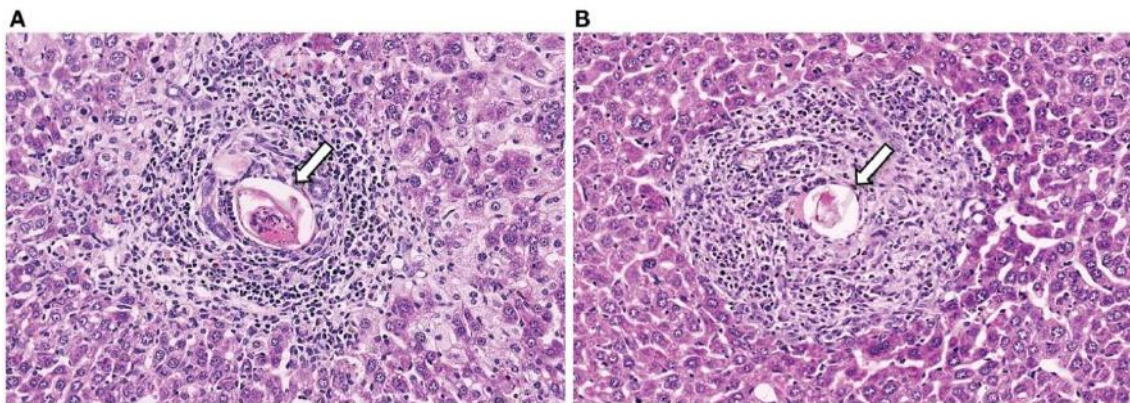


Figura 6: Cortes histológicos de fígado (corados com H&E). (A) de camundongo depletado de célula TCD4+. (B) de camundongo normal. Setas apontando os ovos de *S. mansoni*. Fonte: Hams, E.; Aviello, G.; Fallon, P.G. The Schistosoma Granuloma: Friend or Foe? *Frontiers in Immunology* (2013).

Com a instalação da fase crônica da doença, a resposta imune do Tipo 2 pode apresentar um caráter nocivo, visto que a IL-13 produzida por linfócitos Th2 é uma citocina pró fibrótica e está associada ao desenvolvimento de fibrose hepática, de forma a auxiliar no estabelecimento de um processo imunopatológico (Hams *et al.*, 2013).

1.5. Eosinófilos na infecção por *S. mansoni*

Os eosinófilos são granulócitos, com núcleos bilobados característicos, que se desenvolvem na medula óssea a partir de progenitores pluripotentes, e são constantemente associadas à participação da resposta protetora contra helmintos. Essas células apresentam grânulos que possuem quatro principais proteínas, como a proteína eosinofílica básica principal (MBP), proteína eosinofílica catiônica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), além disso, os grânulos são capazes de armazenar citocinas, enzimas e fatores de crescimento. Tanto MBP quanto ECP apresentaram atividade antiparasitária em estudo *in vitro*, sendo assim proteínas tóxicas para schistosomulos e para larvas de *Schistosoma mansoni*, porém estudos com manipulação de eosinófilos em modelos murinos não apresentou impacto significativo no desenvolvimento da doença durante infecção por *Schistosoma mansoni*. (Rosenberg, Dyer e Foster, 2012).

É importante destacar que em modelos de infecção por *Schistosoma mansoni*, a resposta predominante é a do tipo 2, logo, linfócitos Th2 ativadas levam à produção de citocinas do tipo 2, entre elas a IL-5, conhecida por apresentar papel central no desenvolvimento, ativação e recrutamento de eosinófilos. O aumento de IL-5 sérica ocorre, principalmente, em resposta à deposição de ovos do helminto com cerca de 6 a 8 semanas de infecção, e é responsável pela geração do quadro de eosinofilia sanguínea. Os eosinófilos são então recrutados para os granulomas hepáticos em fase de desenvolvimento (Swartz *et al.*, 2006; Rosenberg, Dyer e Foster, 2012).

Portanto, existe um questionamento sobre a participação ativa dos eosinófilos em infecções por helminto ou a possibilidade de serem apenas marcadores nesses contextos fisiopatológicos. Enquanto observa-se altos níveis de eosinófilos em resposta à infecção helmíntica e a degranulação responsável pelos danos ao parasita em modelos *in vitro*, o mesmo não foi observado em alguns estudos *in vivo* (Swartz *et al.*, 2006).

1.6. Camundongos de linhagem BALB/c e C57BL/6

Classicamente estudos com modelos experimentais murinos empregando as linhagens BALB/c *versus* C57BL/6, revelam que existem diferenças na montagem da resposta imunológica frente a diferentes estímulos entre essas duas linhagens. De forma geral, camundongos C57BL/6 apresentam resposta imune predominantemente de perfil Tipo 1,

enquanto camundongos BALB/c apresentam preferencialmente montagem de resposta de perfil Tipo 2. Em linhas bem gerais, observa-se que os linfócitos T de animais C57BL/6 preferencialmente produzem e liberam níveis elevados de IFN γ e baixos de IL-4, enquanto que em animais BALB/c ocorre o oposto, favorecendo a produção de altos níveis de IL-4 e baixos de IFN γ . É importante destacar que tanto a resposta imune do Tipo 1 quanto a do Tipo 2 são importantes, muitas vezes sequenciais e até complementares para diferentes condições fisiopatológicas para garantir a efetividade da resposta imune global. Por exemplo, no contexto de infecção por *Schistosoma mansoni*, enquanto as citocinas do Tipo 1 são importantes durante os estágios iniciais dérmicos (cercárias) e frente à migração do schistosomulo, as citocinas do Tipo 2 são importantes na fase crônica da doença, quando ocorre deposição de ovos e formação de granulomas (Infante-Duarte e Kamradt, 1999).

Além da resposta das células T, a capacidade das células imunes inatas parece ser diferente entre essas linhagens de camundongos, possivelmente afetando a imunidade adquirida para defesa contra patógenos específicos. Por exemplo, para entender diferenças funcionais da atividade macrofágica entre linhagens C57BL/6 e BALB/c de camundongos, um estudo demonstrou que macrófagos de camundongos C57BL/6 possuem níveis mais elevados de produção de TNF- α e IL-12 quando comparados aos macrófagos de animais BALB/c, frente à estímulos com componentes bacterianos, como LPS e MALP-2. Mostrando assim, que a resposta presente em animais C57BL/6 é de perfil inflamatório mais associado à Tipo 1 (Watanabe *et al.*, 2004).

A infecção por *Leishmania major* é um dos melhores exemplos para o entendimento da regulação entre o balanço de resposta imune do tipo 1/ tipo 2. Por exemplo, frente à infecção por *L. major*, animais BALB/c desenvolvem uma intensa resposta imune do tipo 2, e por isso, há o desenvolvimento de um quadro mais intenso da doença, diferente do que ocorre com outras linhagens de camundongos que se mostram mais resistentes frente à infecção por *L. major* (Scott *et al.*, 1988).

1.7. Diferenças relacionadas ao gênero do modelo experimental murino de infecção por *S. mansoni*

Yamatomo e colaboradores, a partir de um estudo utilizando antígeno solúvel de ovo de *Schistosoma mansoni* (SEA), mostraram que não existem diferenças quanto ao gênero, em

animais BALB/c, na produção de IgE antígeno-específica (Yamatomo *et al.*, 2001). No entanto, diferenças relacionadas ao gênero de modelos experimentais murinos são observadas no desenvolvimento de infecções (Roved, Westerdahl e Hasselquist, 2017). Estudos referentes à infecção por *Schistosoma mansoni* mostraram que em modelo experimental de camundongos Swiss OF1, houve diferença na fisiopatologia apresentada, sendo diminuída em animais machos quando comparados às fêmeas; essa análise foi realizada a partir dos tamanhos do fígado e baço de animais infectados (Eloi-Santos *et al.*, 1992; Boissier *et al.*, 2003).

De forma interessante, em modelo experimental de camundongos CBA/J, onde machos e fêmeas foram infectados de forma subcutânea, ambos os grupos com 45 cercárias de *Schistosoma mansoni*, as fêmeas apresentaram maior taxa de mortalidade do que os machos. Esse resultado foi acompanhado por maior carga parasitária observada em fêmeas e de recuperação de maior número de vermes adultos presentes em fêmeas infectadas, indicando maior suscetibilidade ao desenvolvimento de formas adultas do parasita. A taxa de mortalidade foi ainda avaliada em ambos os gêneros de camundongos C57BL/6, que apresentaram dados semelhantes aos CBA/J (Eloi-Santos *et al.*, 1992).

Nakazawa e colaboradores (1997) mostraram que as diferenças de taxa de sobrevivência e hepatoesplenomegalia em animais CBA/J infectados pelo parasita relacionadas às diferenças na carga parasitária, podem estar sob influência negativa da testosterona no desenvolvimento do parasita. Nesse estudo, camundongos machos foram privados de sua principal fonte de testosterona, resultando em características de sobrevivência similares às de fêmeas. Em contrapartida, fêmeas tratadas com testosterona exógena, apresentam taxa de sobrevivência, hepatoesplenomegalia e carga parasitária semelhantes a um camundongo macho infectado (Nakazawa *et al.*, 1997).

Em conjunto e baseado principalmente neste estudo de Nakazawa e colaboradores (1997), postula-se que as diferenças entre os gêneros do modelo experimental murino de infecção por *Schistosoma mansoni* são mediadas por hormônios sexuais. Entretanto, não podem ser descartadas ainda a função de outras moléculas regulatórias nas variações de susceptibilidade à infecção por *S. mansoni* entre machos e fêmeas.

2. JUSTIFICATIVA

Com base na literatura, postulamos que a infecção murina por *Schistosoma mansoni* é um modelo interessante para a investigação do papel imunomodulador da enzima fosfolipase A₂ do grupo V, por ser um modelo que apresenta inicialmente uma resposta do Tipo 1, mas que sofre polarização para a resposta imune do Tipo 2. Sabendo também que camundongos das linhagens C57BL/6 e BALB/c produzem diferentes respostas imunológicas frente a diferentes estímulos, e que existem diferenças relacionadas aos gêneros dos animais durante a infecção, faz-se importante estabelecer qual gênero e linhagem de camundongo (entre C57BL/6 e BALB/c) são os ideais para o estudo do papel da enzima sPLA_{2gV} na esquistossomose experimental.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Identificação do modelo murino experimental ideal para investigação do papel da enzima sPLA₂gV no contexto de infecção por *Schistosoma mansoni*, através da análise do impacto de gênero no papel da sPLA₂gV durante o modelo de infecção por *Schistosoma mansoni* e análise da influência da linhagem murina C57BL/6 *versus* BALB/c no papel da enzima.

3.2. Objetivos específicos

Analisar a influência da linhagem murina C57BL/6 *versus* BALB/c no papel da sPLA₂gV, e o impacto de gênero no papel da sPLA₂gV no modelo experimental murino de infecção por *Schistosoma mansoni*. Esse estudo empregou animais deficientes para a enzima como ferramenta experimental, em ambas as cepas e gêneros, para avaliação de:

- Taxa de sobrevivência
- Carga parasitária no tecido intestinal e fezes dos animais
- Estabelecimento de resposta imune do tipo 2

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos C57BL/6 e BALB/c machos e fêmeas, selvagens (WT) e deficientes para a enzima fosfolipase A₂ do grupo V (*Pla2g5*^{-/-}), contendo entre 20 e 25g. Animais provenientes do biotério do Laboratório de Inflamação do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e do Laboratório de Animais Transgênicos (LAT), ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Durante o tempo de infecção os animais foram mantidos em condições de temperatura e luz controladas, com oferta de ração e água *ad libitum*. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CCS-UFRJ 115/14).

4.2. Genotipagem

A genotipagem dos animais em acasalamento foi realizada de forma periódica para confirmação do genótipo dos animais transgênicos, garantindo que os animais utilizados eram realmente deficientes para a enzima sPLA₂G_V. O DNA genômico (gDNA) foi extraído a partir da lise da porção distal da cauda dos animais e submetido à reação de PCR com primers específicos para o gene *Pla2g5* (WT) e para o cassete de resistência a neomicina (NEO) inserido por recombinação homóloga no éxon 3 do gene *Pla2g5* dos animais deficientes para sPLA₂G_V. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, a fim de confirmar o tamanho dos fragmentos amplificados (**Figura 7**). A genotipagem foi realizada sempre com amostras de animais selecionados para compor caixas de acasalamento, assegurando o genótipo da prole. Em cada reação de PCR foi utilizado 500 ng de DNA extraídos das caudas dos animais. O DNA foi adicionado ao mix para PCR que possui os primers, solução tampão para Taq Polimerase, dNTP's e a própria Taq Polimerase.

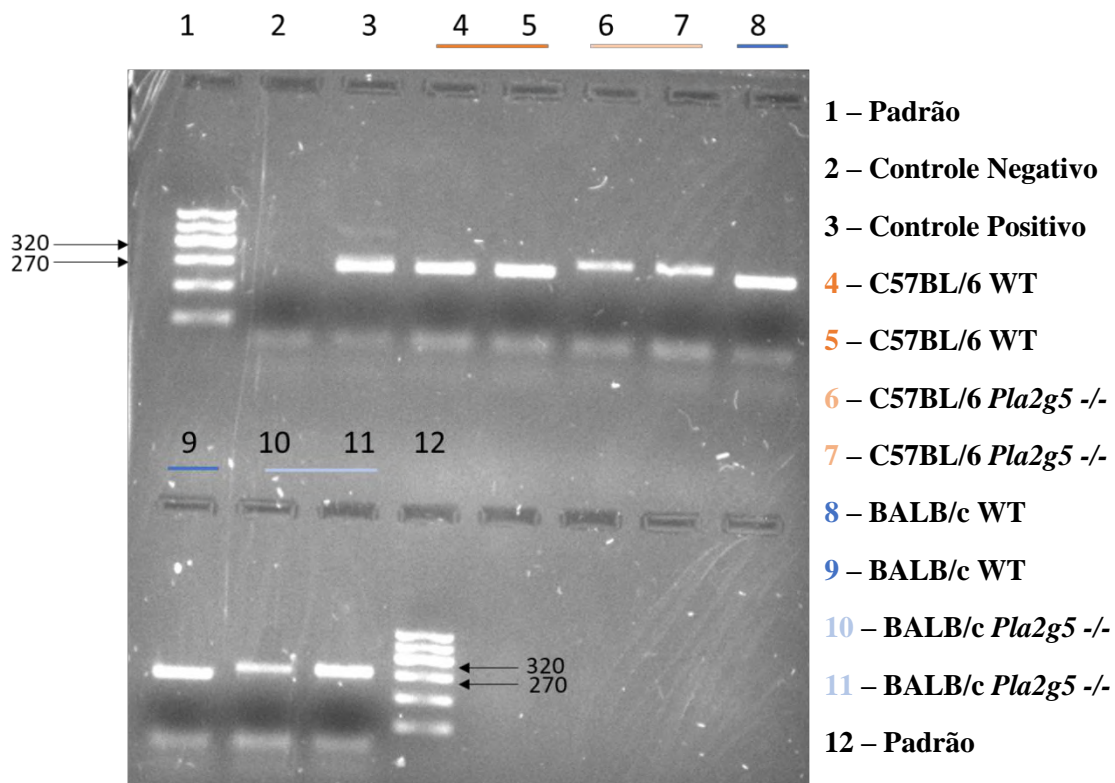


Figura 7: Revelação do gel. Colunas 1 e 12 representam o padrão de tamanho de bandas; Coluna 2 e 3 representam o controle negativo e o controle positivo, respectivamente; Colunas 4 e 5 representam os camundongos C57BL/6 com banda de tamanho correspondente ao genótipo selvagem (WT); Colunas 6 e 7 representam os camundongos C57BL/6 com banda de tamanho correspondente à deficiência para a enzima sPLA_{2gV} (KO); Colunas 8 e 9 representam os camundongos BALB/c positivos para o genótipo selvagem (WT); Colunas 10 e 11 representam camundongos BALB/c positivos para a ausência da enzima (KO).

4.3. Infecção por *Schistosoma mansoni*

O modelo experimental de infecção por *Schistosoma mansoni* consistiu na utilização de camundongos selvagens e deficientes para a enzima sPLA_{2gV}, machos e fêmeas das linhagens C57BL/6 e BALB/c. Antes da infecção, os animais foram colocados em lava pés com 50 mL de água destilada por 30 minutos, para garantir que fezes e urina não causassem interferências durante a penetração das cercárias. A infecção foi realizada com cerca de 60 cercárias de *Schistosoma mansoni* provenientes de caramujos do gênero *Biomphalaria glabrata*. No momento da infecção, os animais foram colocados em copos de vidro de 300 ml contendo solução com as cercárias e foram mantidos por 40 minutos. Os animais não infectados foram submetidos ao mesmo processo, no entanto o conteúdo presente no copo era apenas água. A eutanásia dos grupos foi realizada com 55 e 75 dias após a infecção para realização das análises. A sobrevivência dos animais foi avaliada diariamente ao longo do tempo de infecção.

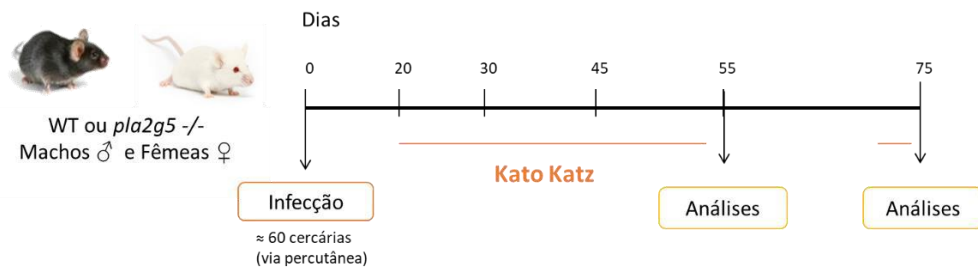


Figura 8: Desenho experimental. Representação do desenho experimental utilizado para o acompanhamento dos animais submetidos ou não à infecção por *S. mansoni*, e retirada de material para análises após a eutanásia dos camundongos.

4.4. Exame parasitológico de fezes

Os ovos de *Schistosoma mansoni* foram quantificados através do método de Kato-Katz, que consiste em um teste qualitativo-quantitativo para detecção parasitológica em fezes. Para a realização do teste, os animais foram separados de maneira individual e em caixas limpas para a coleta das fezes, com 20, 30, 45, 55 e 75 dias de infecção. O conteúdo foi colocado em um papel absorvente junto a telas que filtram o material fecal. Em seguida, o conteúdo foi colocado no orifício de uma placa perfurada sobre uma lâmina de vidro, até que estivesse completamente preenchido (1g). Esse material foi então coberto por uma lamínula já embebida em solução diafanizadora verde malaquita e a lâmina foi pressionada para que o conteúdo se espalhasse por ela de forma uniforme, em seguida as lâminas ficaram em repouso por pelo menos 60 minutos antes da contagem dos ovos. Nesse tipo de avaliação, todos os ovos encontrados na lâmina foram contabilizados e o resultado foi multiplicado por 24, como é instruído pelo kit HELM-TEST.

4.5. Análise de eosinofilia peritoneal

No momento da eutanásia dos animais, foram retirados os lavados peritoneais para a análise das células presentes na cavidade. O lavado foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos a 4°C, em seguida, o sobrenadante foi armazenado e o material sedimentado foi ressuspendido em 250 µl de PBS + EDTA para a quantificação de leucócitos totais, através da utilização de câmara de Neubauer, a partir de diluição em solução de Turk. Para análise diferencial de leucócitos e contagem do percentual de eosinófilos realizou-se um citocentrifugado, com o auxílio de uma citocentrífuga (Cientech), com rotação de 600 rpm

durante 5 minutos e em seguida as lâminas foram coradas com Panótico. Para a avaliação, foi necessário o auxílio de microscopia de campo claro (100x) sob imersão em óleo, onde foram contadas 100 células por lâmina.

4.6. Dosagem de citocinas

Para a dosagem de IL-13 foram utilizados os sobrenadantes retirados das amostras de lavado peritoneal no dia da eutanásia, através de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Foram utilizados kits comerciais da Peprotech e BD e o protocolo foi realizado seguindo as instruções recomendadas.

4.7. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Os dados paramétricos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A significância estatística foi avaliada através do teste de análise de variância one-way ANOVA, seguido pelo teste Newman-Keuls sendo as diferenças entre as médias consideradas estaticamente significativas, quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. A enzima sPLA_{2gV} protege contra a mortalidade induzida pela infecção por *S. mansoni* apenas em camundongos C57BL/6 machos

Para a avaliação da taxa de sobrevivência frente à infecção por *Schistosoma mansoni*, camundongos tanto selvagens (WT) quanto deficientes para a enzima sPLA_{2gV} (*Pla2g5*^{-/-}) foram acompanhados em quatro modelos experimentais, incluindo: (i) C57BL/6 machos; (ii) C57BL/6 fêmeas; (iii) BALB/c machos; e (iv) BALB/c fêmeas. Todos foram ou não submetidos à infecção por via percutânea com 60 cercárias de *Schistosoma mansoni*. Os animais foram então acompanhados por 75 dias de infecção; exceto o grupo de camundongos BALB/c machos, acompanhados por 55 dias. Ao comparar os quatro modelos avaliados, foi possível observar que a partir do 55º dia de infecção, apenas o grupo de animais C57BL/6 machos apresentaram redução na taxa de sobrevivência nos animais *Pla2g5*^{-/-} quando comparados aos animais selvagens do mesmo modelo (**Figura 9**). Como mostrado na **Figura 9A**, camundongos C57BL/6 machos selvagens possuem taxa de sobrevivência de 83,3% ao final dos 75 dias, enquanto animais C57BL/6 machos *Pla2g5*^{-/-} apresentam apenas 42,8% de sobrevivência. Nos demais modelos estudados (C57BL/6 fêmeas e ambos os gêneros de BALB/c), os camundongos deficientes para a enzima sPLA_{2gV} exibiram uma taxa de sobrevivência de 100% até a eutanásia realizada no 75º dia de infecção, mostrando assim maior resistência frente à infecção pelo helminto quando comparados aos C57BL/6 machos (**Figura 9B, 9C, 9D**).

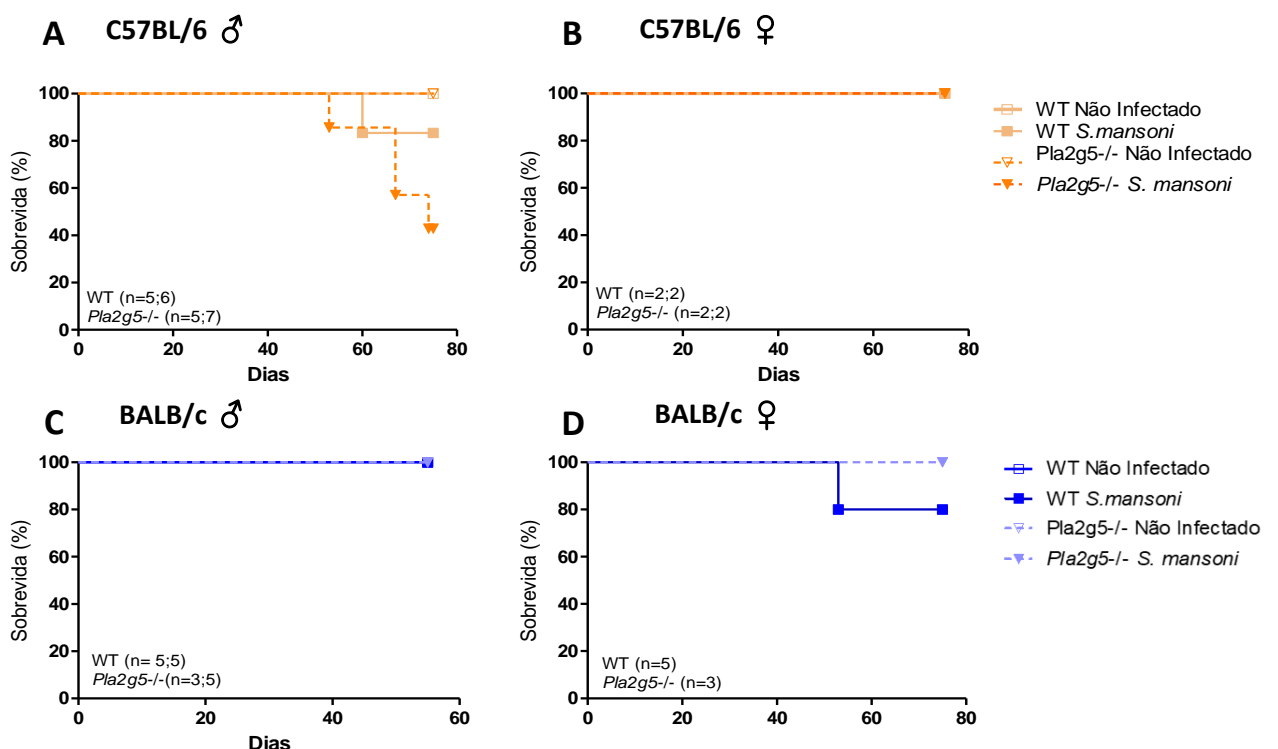


Figura 9: A enzima sPLA_{2gV} possui papel protetor contra a mortalidade induzida pela infecção por *Schistosoma mansoni* apenas em camundongos C57BL/6 machos. Os gráficos mostram os percentuais de sobrevivência em quatro modelos: C57BL/6 machos (A), C57BL/6 fêmeas (B), BALB/c machos (C) e BALB/c fêmeas (D). Os camundongos selvagens (WT) ou deficientes para a enzima (*Pla2g5^{-/-}*) foram ou não infectados com 60 cercárias de *S. mansoni* e acompanhados por 55 ou 75 dias. Os dados apresentados para cada modelo animal são representativos de pelo menos dois experimentos independentes.

5.2. A enzima sPLA_{2gV} possui papel regulador na liberação de ovos de *S. mansoni* apenas nas fezes de camundongos C57BL/6 machos infectados

Para avaliar o papel que a enzima exerce na carga parasitária durante a infecção por *Schistosoma mansoni*, um dos parâmetros analisados foi a quantificação de ovos do helminto liberados nas fezes dos animais infectados selvagens (WT) ou deficientes para a enzima (*Pla2g5^{-/-}*), de linhagens C57BL/6 ou BALB/c, machos ou fêmeas. Para a análise, utilizou-se o método de Kato Katz nos dias 20, 30, 45, 55 e 75 após a infecção, gerando assim, gráficos com perfil cinético dos quatro modelos acompanhados (**Figura 10**). Camundongos selvagens dos diferentes modelos apresentaram perfil cinético semelhantes, onde houve (i) ausência de detecção de ovos nas fezes com 20 e 30 dias após a infecção; (ii), detecção de ovos a partir de 45 dias de infecção (exceção para BALB/c machos); (iii) pico de detecção com 55 dias de infecção; e (iv) aos 75 dias de infecção o perfil mostrou declínio no número de ovos detectados (**Figura 10**). Com relação à deficiência para a enzima, é possível observar que a mesma exerce papel importante na regulação da liberação de ovos nas fezes, principalmente no modelo de camundongos C57BL/6 machos aos 55 dias de infecção, onde atua de forma mais acentuada, levando à menores quantidades de ovos observados nos animais deficientes para a enzima quando comparados aos animais selvagens (**Figura 10A**). O mesmo não foi observado nos demais modelos, que não apresentaram diferenças significativas entre camundongos WT e *Pla2g5^{-/-}*. Vale, ainda, destacar que a quantidade de ovos detectados nas fezes dos dois grupos de animais C57BL/6, revela magnitude superior da infecção em machos, com cerca de 1500 ovos/grama de fezes enquanto C57BL/6 fêmeas exibem menos de 500 ovos/grama de fezes (**Figura 10A e 10B**).

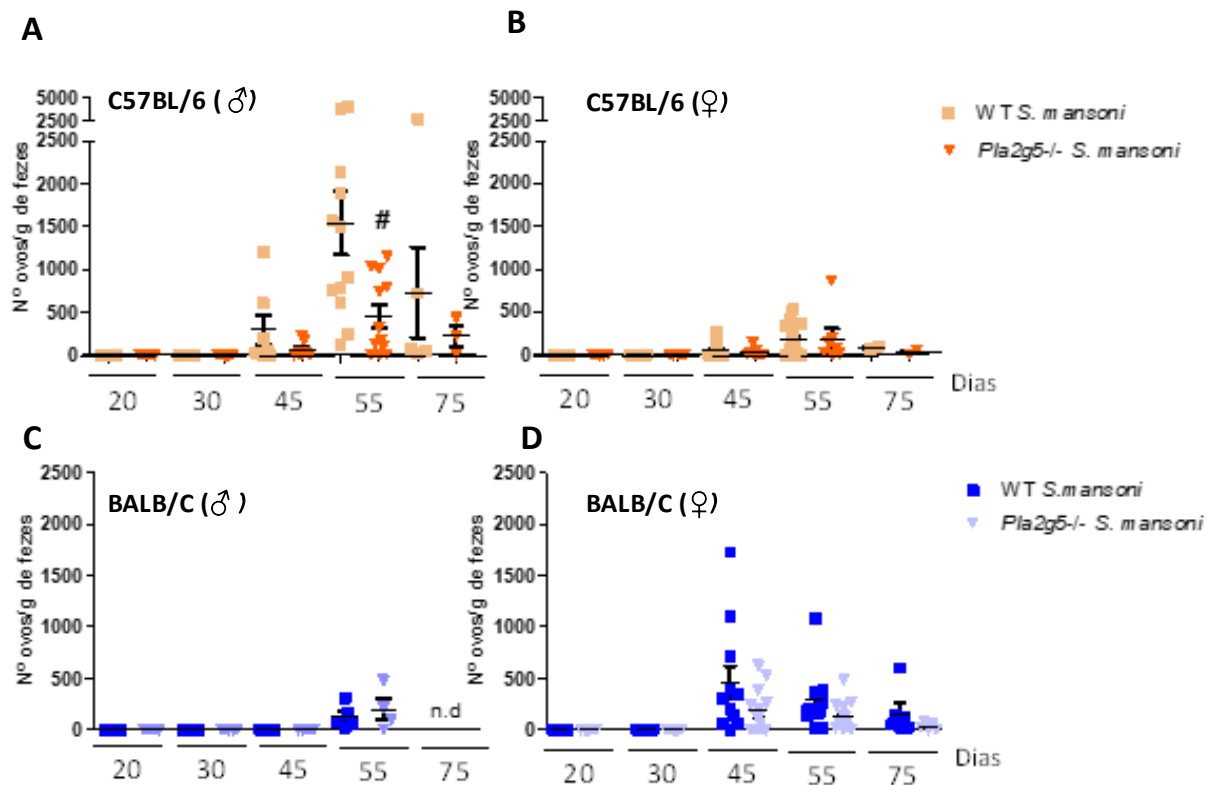


Figura 10: A enzima sPLA₂gV possui papel mais expressivo na regulação da liberação de ovos apenas nas fezes de camundongos C57BL/6 machos. Os gráficos exibem o perfil cinético da quantificação de ovos de *S. mansoni* nas fezes de camundongos selvagens (WT) ou deficientes para a enzima sPLA₂gV (*Pla2g5*^{-/-}) em quatro modelos: C57BL/6 machos (A), C57BL/6 fêmeas (B), BALB/c machos (C) e BALB/c fêmeas (D). O perfil foi montado a partir de fezes coletadas com 20, 30, 45, 55 e 75 de infecção, por método de Kato Katz. Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes para cada modelo animal (C57BL/6 e BALB/c de ambos os gêneros). #*p*<0,05 em relação ao grupo C57BL/6 WT macho. n.d.= não determinado.

5.3. A enzima sPLA₂gV parece mediar o estabelecimento de eosinofilia peritoneal característica da infecção por *S. mansoni* apenas em camundongos C57BL/6 machos infectados

Para avaliar a capacidade da enzima sPLA₂gV de atuar de maneira a induzir a eosinofilia peritoneal, que é um marcador característico da infecção pelo *Schistosoma mansoni*, foram retirados lavados peritoneais no dia da eutanásia (55 dias após a infecção) para verificação das células presentes na cavidade peritoneal através de contagem total e diferencial de leucócitos de camundongos selvagens (WT) ou deficientes para a enzima (*Pla2g5*^{-/-}), machos ou fêmeas, C57BL/6 ou BALB/c (Figura 11). Os resultados obtidos mostram que a infecção por *Schistosoma mansoni* é capaz de induzir eosinofilia nos animais selvagens (WT) infectados quando comparados aos não infectados. Os quatro grupos estudados exibiram um perfil de

indução de eosinofilia semelhantes após infecção, no entanto, em animais infectados C57BL/6 machos *Pla2g5*^{-/-} foi possível observar redução significativa na quantidade de eosinófilos na cavidade peritoneal quando comparados aos camundongos selvagens (WT) infectados do mesmo modelo (**Figura 11A**). Enquanto animais infectados C57BL/6 fêmeas, BALB/c machos e BALB/c fêmeas não exibiram diferenças significantes entre a eosinofilia peritoneal quando foram comparados seus grupos selvagens e deficientes para a enzima sPLA_{2gV} (**Figura 11B**, **11C** e **11D**).

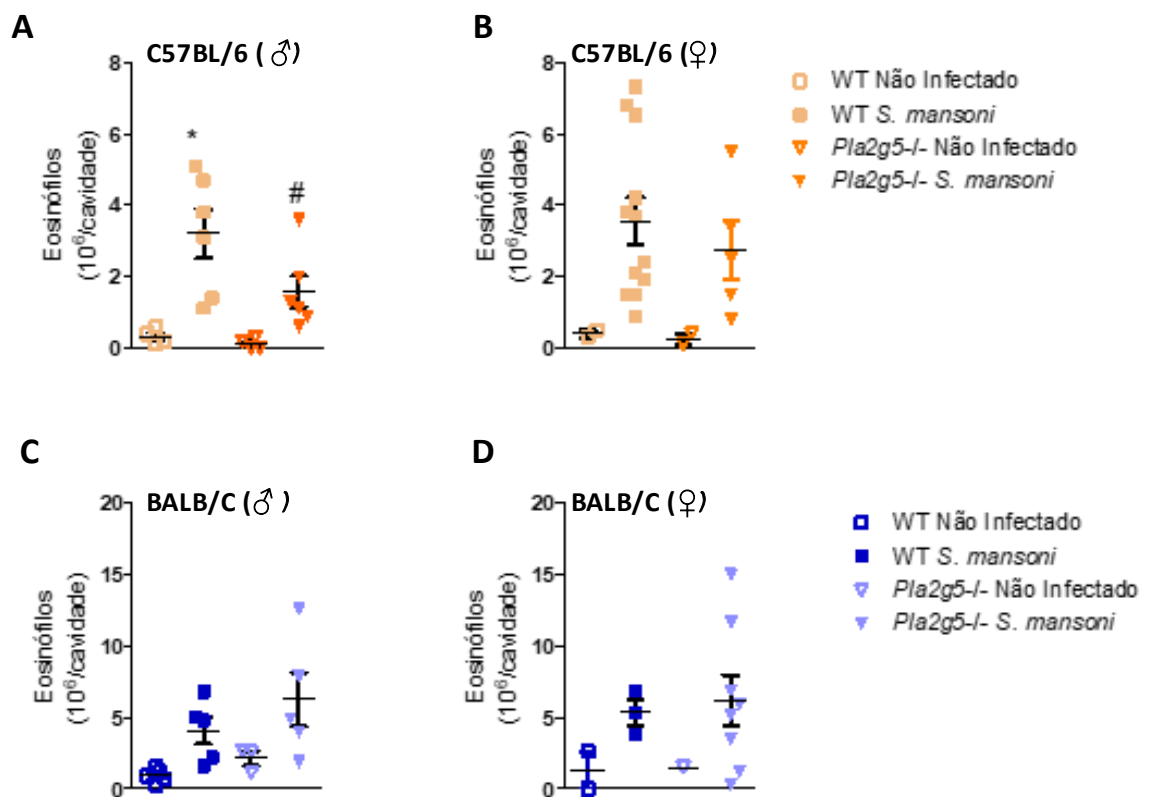


Figura 11: A enzima sPLA_{2gV} é capaz de induzir eosinofilia peritoneal característica da infecção por *S. mansoni* apenas em camundongos C57BL/6 machos infectados. Os gráficos indicam a quantidade de eosinófilos presentes na cavidade peritoneal de animais selvagens (WT) ou com ausência da enzima (*Pla2g5*^{-/-}) infectados ou não por *S. mansoni*, sendo os grupos: C57BL/6 machos (A), C57BL/6 fêmeas (B), BALB/c machos (C) e BALB/c fêmeas (D). A análise foi feita em 55 após a infecção, com a utilização de citocentrífuga para confecção das lâminas. Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes para cada modelo animal (C57BL/6 e BALB/c de ambos os gêneros). *p<0,05 em relação ao grupo não infectado e #p<0,05 em relação ao grupo camundongos selvagens infectados.

5.4. A enzima sPLA₂gV parece exercer papel na indução da produção de IL-13 na infecção por *S. mansoni* apenas em camundongos C57BL/6 machos infectados

Para o estudo do papel da enzima sPLA₂gV na indução de IL-13, citocina do tipo 2, foi realizada a dosagem por ELISA no sobrenadante do lavado peritoneal recolhido no 55º dia de infecção por *Schistosoma mansoni* de camundongos C57BL/6 ou BALB/c, machos ou fêmeas, selvagens ou deficientes para a enzima (**Figura 12**). Enquanto animais não infectados mostram níveis de IL-13 abaixo do limiar de detecção, a **Figura 12** ilustra níveis detectáveis de IL-13 no lavado peritoneal de todos os animais infectados por *Schistosoma mansoni* selvagens, independentes de cepa ou gênero. No entanto, o único modelo que apresentou redução acentuada nos níveis da citocina IL-13 frente a ausência da enzima sPLA₂gV, foi o “C57BL/6 macho” quando comparado aos animais selvagens do mesmo modelo (**Figura 12A**). Já os modelos “C57BL/6 fêmea”, “BALB/c macho” e “BALB/c fêmea” não exibiram diferenças significativas entre os animais selvagens (WT) ou deficientes para a enzima (*Pla2g5*^{-/-}) (**Figura 12B, 12C e 12D**).

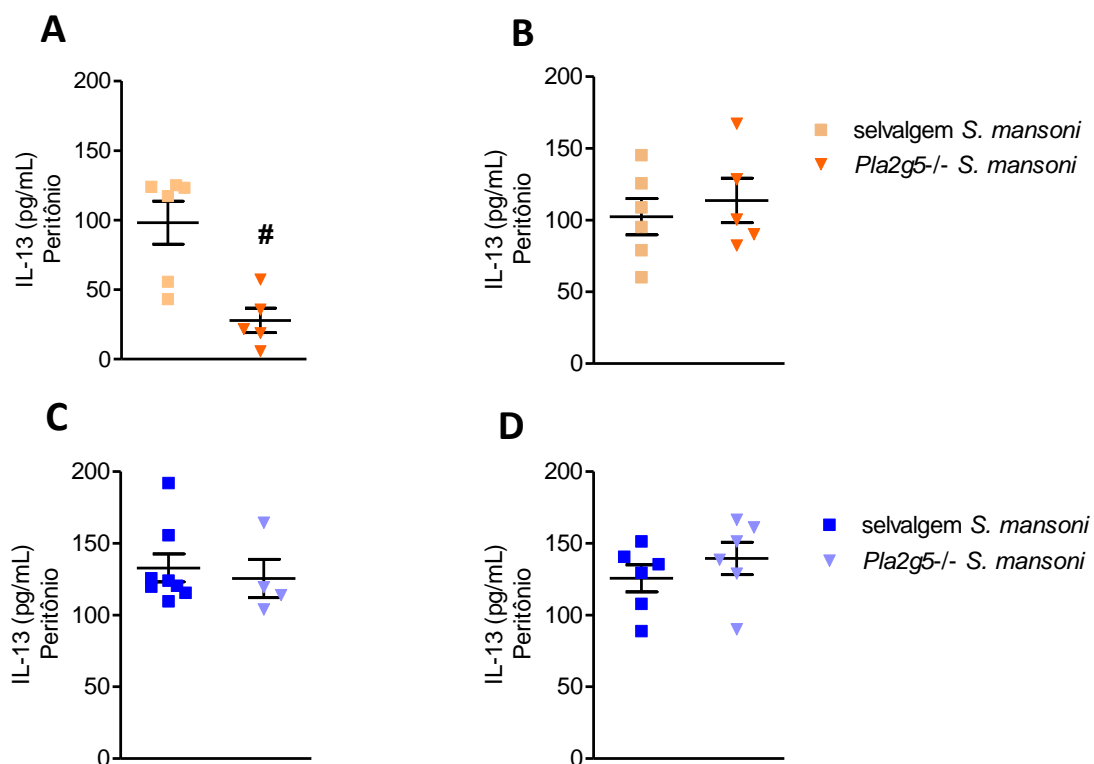


Figura 12: A enzima sPLA₂gV exerce papel na indução de IL-13 na infecção por *Schistosoma mansoni* apenas em camundongos C57BL/6 machos infectados. Os gráficos mostram os níveis da citocina IL-13 na cavidade peritoneal de camundongos infectados por *S. mansoni*, selvagens (WT) ou deficientes para a enzima (*Pla2g5*^{-/-}), C57BL/6 machos (A), C57BL/6 fêmeas (B), BALB/c machos (C) e BALB/c fêmeas (D). Os dados

apresentados são representativos de dois experimentos independentes para cada modelo animal (C57BL/6 e BALB/c de ambos os gêneros). # $p < 0,05$ em relação ao grupo camundongos selvagens infectados.

6. DISCUSSÃO

As fosfolipases são famílias constituídas por enzimas que são capazes de hidrolisar fosfolipídeos em determinadas ligações, de forma a assumirem papel relacionado à contextos inflamatórios. Mais especificamente, a fosfolipase A₂ secretória do grupo V (sPLA₂gV) parece estar relacionada à imunomodulação da resposta imunológica, exercendo função no estabelecimento do perfil da resposta imune frente à diferentes contextos fisiopatológicos (Samuchiwal e Balestrieri, 2019; Murakami, Sato e Taketomi, 2020). Nesse contexto, o estudo envolvendo tal enzima é importante para entendimento de seu papel na polarização da resposta imunológica em infecções que apresentam esse padrão de resposta, como por exemplo, a infecção por *Schistosoma mansoni*. O modelo experimental murino de infecção por este helminto, é caracterizado inicialmente por uma instalação de resposta imunológica do tipo 1, seguida por polarização para uma resposta imunológica de perfil tipo 2. Vale ressaltar que frente à diferentes estímulos existem diferenças no perfil de montagem da resposta imunológica entre as linhagens de camundongos, onde animais C57BL/6 montam preferencialmente resposta do tipo 1 e animais BALB/c montam de forma prioritária resposta do tipo 2 marcada por eosinofilia local e sistêmica. De forma interessante, existem ainda diferenças relacionadas ao gênero dos camundongos durante a infecção por *Schistosoma mansoni*, causadas em parte pela influência de hormônios sexuais (Nakazawa *et al.*, 1997), mas não sendo descartada a importância do estudo de outras moléculas regulatórias que possam estar envolvidas nas alterações observadas. Assim, o estudo visou não apenas a compreensão da função exercida pela enzima durante a infecção por *Schistosoma mansoni*, mas buscou a identificação do modelo murino experimental ideal para o estudo das funções da sPLA₂gV. Camundongos “knockout” para a sPLA₂gV foram utilizados como ferramenta experimental de estudo, além de camundongos selvagens (WT) de ambos os gêneros e linhagens, para avaliação de parâmetros de sobrevivência, carga parasitária, e marcadores imunológicos do tipo 2 no decorrer da infecção.

Os aspectos parasitológicos da infecção por *Schistosoma mansoni* foram analisados a partir do acompanhamento dos grupos murinos descritos acima. As análises obtidas a partir da quantificação de ovos nas fezes dos camundongos ao longo da progressão da infecção, mostraram que a enzima sPLA₂gV atua de forma reguladora quando se trata da liberação dos ovos do parasita nas fezes de camundongos, principalmente em animais C57BL/6 machos, onde

a deficiência para a enzima levou à um quadro de redução da carga parasitária em animais infectados. É interessante destacar que empregando outra forma de avaliação da carga parasitária – a quantificação de ovos no tecido intestinal de camundongos – esta análise também indicou um perfil regulador da enzima sPLA₂gV de maneira mais expressiva na liberação de ovos no tecido intestinal em camundongos C57BL/6 machos (dados não mostrados).

A avaliação dos dados parasitológicos de animais com ausência da enzima sPLA₂gV foi importante na tentativa de elucidar a forma de atuação da enzima e o fato de que ela gerou resistência frente à infecção em questão em C57BL/6 machos, evidenciando, que a enzima possui papel fundamental no controle da carga parasitária neste modelo experimental de infecção por *Schistosoma mansoni*, e que esse controle instaurado pela enzima sPLA₂gV corrobora com os dados obtidos da análise de sobrevivência dos animais acompanhados durante o estudo.

Durante a infecção por *Schistosoma mansoni*, a mortalidade dos animais está normalmente associada de forma direta com a magnitude da carga parasitária. Na literatura, existe um estudo em que Eloi-Santos e colaboradores demonstraram que em modelo de infecção com 45 cercárias de *Schistosoma mansoni* em animais CBA/J machos e fêmeas, os camundongos não apresentaram mortalidade até a 8ª semana pós infecção, No entanto, a partir de 8 semanas de infecção, fêmeas CBA/J passaram a apresentar menor taxa de sobrevivência do que machos de mesma linhagem. Foram analisados ainda ambos os gêneros de camundongos C57BL/6 e CF1, que também apresentaram maior taxa de mortalidade nas fêmeas. Esses altos índices de mortalidade foram associados ao grau de fisiopatologia desenvolvida em resposta à infecção (Eloi-Santos *et al.*, 1992). Com relação à ausência de mortalidade até a 8ª semana de infecção, dado similar foi observado em nosso trabalho, em que animais infectados com 60 cercárias, dos quatro modelos acompanhados (C57BL/6 machos; C57BL/6 fêmeas; BALB/c machos; BALB/c fêmeas) também não apresentaram mortalidade importante até o 55º dia de infecção. Em contrapartida, animais do modelo “C57BL/6 macho” deficientes para a enzima sPLA₂gV se mostraram mais susceptíveis à infecção, por apresentarem menor taxa de sobrevivência a partir do 55º dia de infecção, enquanto os camundongos selvagens e *Pla2g5*^{-/-} dos demais modelos se mostraram mais resistentes à infecção, com taxa de 100% de sobrevivência ao final dos 75 dias de acompanhamento. Em função dos dados obtidos da análise de sobrevivência, podemos concluir que a sPLA₂gV apresenta papel protetor contra a mortalidade induzida pela infecção pelo helminto em C57BL/6 machos.

Para o entendimento dos potenciais mecanismos envolvidos no aparente papel protetor da enzima em camundongos C57BL/6 machos, analisamos a resposta imunológica do tipo 2 reconhecida como protetora nesta infecção. A resposta imune do tipo 2 caracterizada pela presença de linfócitos Th2, macrófagos M2 e citocinas como: IL-4, IL-5 e IL-13, responsáveis por promover a eosinofilia observada durante infecção esquistossomótica, é conhecida como marcador de infecções helmínticas e estabelecida de forma dependente da montagem de resposta imunológica do tipo 2 (Dunne e Cooke, 2005). Nossos dados mostraram que a ausência da enzima sPLA_{2gV} gera uma redução significativa apenas na quantidade de eosinófilos na cavidade peritoneal de camundongos C57BL/6 machos infectados, comprovando a participação da enzima sPLA_{2gV} no estabelecimento e indução da resposta eosinofílica peritoneal característica da infecção por *Schistosoma mansoni*. A dosagem de IL-13 (citocina do tipo 2) na cavidade peritoneal também foi um parâmetro analisado para constatar a presença de resposta imune do tipo 2. Entretanto vale destacar que esta citocina do tipo 2 além de potencial protetor, pode ter efeitos deletérios uma vez que essa citocina está relacionada ao desenvolvimento a longo prazo da fibrose hepática no curso da infecção pelo helminto, e por isso, pode também mais tardiamente estar envolvida na progressão de um quadro de morbidade causado pela infecção por *Schistosoma mansoni* (Kaviratne *et al.*, 2004).

7. CONCLUSÕES

Em conjunto, nossos dados – obtidos de parâmetros parasitológicos, de sobrevivência e estabelecimento de resposta imunológica do tipo 2 – sugerem que o modelo murino experimental ideal para o estudo do papel da enzima sPLA_{2gV} no contexto de infecção por *Schistosoma mansoni*, é o camundongo de linhagem C57BL/6 macho. Este, diferentemente dos outros 3 modelos estudados, parece apresentar uma enzima sPLA_{2gV} como componente ativo e imunomodulador essencial na imunopatogênese, contribuindo para a montagem da resposta do tipo 2 protetora eosinofílica, ocasionando mudanças na cinética parasitológica e protegendo contra a morte.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balboa, M.A., Balsinde, J., Winstead, M.V., Tischfield, J.A., Dennis, E.A. (1996). Novel group V phospholipase A₂ involved in arachidonic acid mobilization in murine P388D1 macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 32381–32384.
- Bingham, C.O., Fijneman, R.J., Friend, D.S., Goddeau, R.P., Rogers, R.A., Austen, K.F., Arm, J.P. (1999). Low molecular weight group IIA and group V phospholipase A(2) enzymes have different intracellular locations in mouse bone marrow-derived mast cells, *Journal of Biological Chemistry*, 274, 31476–31484.
- Boilard, E., Lai, Y., Larabee, K., Balestrieri, B., Ghomashchi, F., Fujioka, D., Gobezie, R., Coblyn, J.S., Weinblatt, M.E., Massarotti, E.M., Thornhill, T.S., Divangahi, M., Remold, H., Lambeau, G., Gelb, M.H., Arm, J.P. e Lee, D.M. (2010). A novel anti-inflammatory role for secretory phospholipase A2 immune complex-mediated arthritis. *EMBO Molecular Medicine*, 2, 172–187.
- Boissier, J., Chlichlia, K., Digon, Y., Ruppel, A., Moné, H. (2003). Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, 91, 144–150.
- Bou Khalil, M., Hou, W., Zhou, H., Elisma, F., Swayne, L. A., Blanchard, A. P., Yao, Z., Bennett, S.A.L., Figeys, D. (2010). Lipidomics era: Accomplishments and challenges. *Mass Spectrometry Reviews*, 29, 877–929.
- Brasil. Ministério da Saúde. (2019). Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde: 3ª. Ed.
- Caldas, I.R., Campi-Azevedo, A.C., Oliveira, L.F.A., Silveira, A.M.S., Oliveira, R.C., Gazzinelli, G. Human schistosomiasis mansoni: Immune responses during acute and chronic phases of the infection. (2008). *Acta Tropica*, 108, 109–117.
- Carvalho, O.S. (2008). Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar* [online]. Coelho, P.M.Z. e Lenzi, H.L., eds (Editora FIOCRUZ), pp. 85-145.
- Cheever, A.W., Mosimann, J.E., Deb, S. (1994). Natural History of *Schistosoma mansoni* Infection in Mice: Egg Production, Egg Passage in the Feces, and Contribution of Host and Parasite Death to Changes in Worm Numbers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50, 269–280.
- Degousee, N., Ghomashchi, F., Stefanski, E., Singer, A., Smart, B.P., Borregaard, N., Reithmeier, R., Lindsay, T.F., Lichtenberger, C., Reinisch, W., Lambeau, G., Arm, J., Tischfield, J., Gelb, M.H., Rubin, B.B. (2002). Groups IV V, and X phospholipases A₂s in human neutrophils: role in eicosanoid production and gram-negative bacterial phospholipid hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 5061–5073.
- Diaz, B.L., Satake, Y., Kikawada, E., Balestrieri, B., Arm, J.P. (2006). Group V secretory phospholipase A2 amplifies the induction of cyclooxygenase 2 and delayed prostaglandin D2 generation in mouse bone marrow culture-derived mast cells in a strain-dependent manner. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1761, 1489–1497.
- Dunne, D.W., Cooke, A. (2005). A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. *Nature Reviews Immunology*, 5, 420–426.
- Elbasheir, M.M., Karti, I.A., Elamin, E.M. (2020). Evaluation of a rapid diagnostic test for *Schistosoma mansoni* infection based on the detection of circulating cathodic antigen in urine in Central Sudan. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14, e0008313.
- Eloi-Santos, S., Olsen, N.J., Correa-Oliveira, R., Colley, D.G. (1992). *Schistosoma mansoni*: Mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. *Experimental Parasitology*, 75, 168–175.
- Filkin, S.Y., Lipkin, A.V., Fedorov, A.N. (2020). Phospholipase Superfamily: Structure, Functions, and Biotechnological Applications. *Biochemistry (Moscow)*, 85, 177–195.
- Giannattasio, G., Fujioka, D., Xing, W., Katz, H.R., Boyce, J.A., Balestrieri, B. (2010). Group V Secretory Phospholipase A2 Reveals Its Role in House Dust Mite-Induced Allergic Pulmonary Inflammation by Regulation of Dendritic Cell Function. *The Journal of Immunology*, 185, 4430–4438.
- Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., Kestens, L. (2006). Human schistosomiasis. *The Lancet*, 368, 1106–1118.

- Hams, E., Aviello, G., Fallon, P.G. (2013). The Schistosoma Granuloma: Friend or Foe? *Frontiers in Immunology*, 4.
- Henderson Jr, W.R., Ye, X., Lai, Y., Ni, Z., Bollinger, J.G., Tien, Y.-T., Chi, E.Y., Gelb, M.H. (2013). Key Role of Group V Secreted Phospholipase A2 in Th2 Cytokine and Dendritic Cell-Driven Airway Hyperresponsiveness and Remodeling. *PLoS ONE*, 8, e56172.
- Ho, I.C., Arm, J.P., Bingham, C.O. 3rd., Choi, A., Austen, K.F., Glimcher L.H. (2001). A novel group of phospholipase A₂s preferentially expressed in type 2 helper T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 18321–18326.
- Htwe, Y.M., Wang, H., Belvitch, P., Meliton, L., Bandela, M., Eleftheria, L., Dudek, S.M. (2021). Group V Phospholipase A2 Mediates Endothelial Dysfunction and Acute Lung Injury Caused by Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. *Cells*, 10, 1731.
- Infante-Duarte, C., Kamradt, T. (1999). Th1/Th2 balance in infection. *21*, 317–338.
- Jenkins-holick, D.S., Kaul, T.L. (2013). Schistosomiasis. *Urologic nursing*. 33, 163-70.
- Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J. (1972). A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst Med. Trop. São Paulo*, 14, 397-400.
- Kaviratne, M., Hesse, M., Leusink, M. (2004). IL-13 Activates a Mechanism of Tissue Fibrosis That Is Completely TGF- β Independent. **The Journal of Immunology**, 173, 4020–4029.
- Kessen, U.A., Schaloske, R.H., Stephens, D.L., Lucas K.K., Dennis, E.A. (2005). PGE₂ release is independent of upregulation of Group V phospholipase A₂ during long-term stimulation of P388D1 cells with LPS. *Journal of Lipid Research*, 46, 2488–2496.
- Kikawada, E., Bonventre, J.V., Arm, J.P. (2007). Group V secretory PLA2 regulates TLR2-dependent eicosanoid generation in mouse mast cells through amplification of ERK and cPLA2 α activation. *Blood*, 110, 561-567.
- Le, L., Hsieh, M.H. (2017). Diagnosing Urogenital Schistosomiasis: Dealing with Diminishing Returns. *Trends in Parasitology*, 33, 378–387.
- Maroun, B.K., Weimin, H., Hu, Z., Fred, E., Swayne, L.A., Blanchard, A.P., Zemin, Y., Bennett S.A.L., Figeys, D. (2010). Lipidomics era: Accomplishments and challenges. *Mass Spectrometry Reviews*, 29, 877-929.
- Masuda, S., Murakami, M., Mitsuishi, M., Komiyama, K., Ishikawa, Y., Ishii, T., Kudo, I. (2005). Expression of secretory phospholipase A₂ enzymes in lungs of humans with pneumonia and their potential prostaglandin-synthetic function in human lung-derived cells. *Biochemical Journal*, 387, 27–38.
- McKee, A.S., Pearce, E.J. (2004). CD25+CD4+ Cells Contribute to Th2 Polarization during Helminth Infection by Suppressing Th1 Response Development. *The Journal of Immunology*, 173, 1224–1231.
- McManus, D.P., Dunne, D.W., Sacko, M., Utzinger, J., Vennervald, B.J., Zhou, X.-N. (2018). Schistosomiasis. *Nature Reviews Disease Primers*, 4.
- Moore, D.L., Grove, D.I., Warren, K.S. (1977). The Schistosoma mansoni egg granuloma: Quantitation of cell populations. *The Journal of Pathology*, 121, 41–50.
- Mosmann, T. R. T Lymphocyte Subsets, Cytokines, and Effector Functions. (1992). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 664, 89–92.
- Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T., Yamamoto, K. (2011). Recent progress in phospholipase a2 research: from cells to animals to humans. *Progress in lipid research*, 50, 152–192.
- Nakazawa, M., Fantappie, M.R., Freeman Jr, G.L., Eloi-Santos, S., Olsen, N.J., Kovacs, W.J., Secor, W.E., Colley, D.G. (1997). Schistosoma mansoni: Susceptibility Differences between Male and Female Mice Can Be Mediated by Testosterone during Early Infection. *Experimental Parasitology*, 85, 233–240.
- Nation, C.S., Da'dara, A.A., Marchant, J.K., Skelly, P.J. (2020). Schistosome migration in the definitive host. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 14, e0007951.
- Organization, W.H. (2020). WHO | World Health Organization. Who.int. Disponível em: <https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html>.
- Osakunor, D.N.M., Woolhouse, M.E.J., Mutapi, F. (2018). Paediatric schistosomiasis: What we know and what we need to know. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12, e0006144.

- Rabello, Ana. (1997). Diagnosing Schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 92, 669–676.
- Ross, A.G.P., Bartley, P.B., Sleight, A.C., Olds, G.R., Li, Y., Williams, G. M., McManus, D.P. (2002). *Schistosomiasis*. *The New England Journal of Medicine*, 346, 1212–1220.
- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D., Foster, P.S. (2012). Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 13, 9–22.
- Roved, J., Westerdahl, H., Hasselquist, D. (2017). Sex differences in immune responses: Hormonal effects, antagonistic selection, and evolutionary consequences. *Hormones and Behavior*, 88, 95–105.
- Samuchiwal, S.K., Balestrieri, B. (2019). Harmful and protective roles of group V phospholipase A2: Current perspectives and future directions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1864, 819–826.
- Sandoval, G. (2018). Lipases and Phospholipases (Methods and Protocols). In: *Methods in Molecular Biology*. 1835, 69–105.
- Satake, Y., Diaz, B.L., Balestrieri, B., Lam, B.K., Kanaoka, Y., Grusby, M.J., Arm, J.P. (2004). Role of Group V Phospholipase A2 in Zymosan-induced Eicosanoid Generation and Vascular Permeability Revealed by Targeted Gene Disruption. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 16488–16494.
- Sato, H., Taketomi, Y., Ushida, A., Isogai, Y., Kojima, T., Hirabayashi, T., Miki, Y., Yamamoto, K., Nishito, Y., Kobayashi, T., Ikeda, K., Taguchi, R., Hara, S., Ida, S., Miyamoto, Y., Watanabe, M., Baba, H., Miyata, K., Oike, Y., Gelb, M.H., Murakami, M. (2014). The Adipocyte-Inducible Secreted Phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E Play Distinct Roles in Obesity. *Cell Metabolism*, 20, 119–132.
- Schwartz, C., Fallon, P.G. (2018). Schistosoma “Eggs-Itting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Frontiers in Immunology*, 9, 2492.
- Scott, P., Natovitz, P., Coffman, R.L., Pearce, E., Sher, A. (1988). Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal of Experimental Medicine*, 168, 1675–1684.
- Sharma, P., Levesque, T., Boilard, E., Park, E.A. (2014). Thyroid hormone status regulates the expression of secretory phospholipases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 444, 56–62.
- Swartz, J.M., Dyer, K.D., Cheever, A.W., Ramalingam, T., Pesnicak, L., Domachowske, J.B., Lee, J.J., Lee, N.A., Foster, P.S., Wynn, T.A., Rosenberg, H.F. (2006). Schistosoma mansoni infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*, 108, 2420–2427.
- Tchuenté, L.A.T., Fouodo, C.J.K., Ngassam, R.I.K., Sumo, L., Noumedem, C.D., Kenfack, C.M., Gipwe, N.F., Nana, E.D., Stothard, J.R., Rollinson, D. (2012). Evaluation of Circulating Cathodic Antigen (CCA) Urine-Tests for Diagnosis of Schistosoma mansoni Infection in Cameroon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6, e1758.
- Vale, N., Gouveia, M.J., Rinaldi, G., Brindley, P.J., Gartner, F., Costa, J.M.C.d. (2017). Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61, e02582-16.
- Watanabe, H., Numata, K., Ito, T., Takagi, K., Matsukawa, A. (2004). Innate immune response in th1- and th2-dominant mouse strains. *Shock*, 22, 460–466.
- Yamatomo, T., Okano, M., Ono, T., Nakayama, E., Yoshino, T., Satoskar, A. R., Harn Jr, D. A., Nishizaki, K. (2001). Sex-related differences in the initiation of allergic rhinitis in mice. *Allergy*, 56, 525–531.
- Zheng, B., Zhang, J., Chen, H., Nie, H., Miller, H., Gong, Q., Liu, C. (2020). T Lymphocyte-Mediated Liver Immunopathology of Schistosomiasis. *Frontiers in Immunology*, 11, 61–.
- Zwang, J., Olliaro, P.L. (2014). Clinical Efficacy and Tolerability of Praziquantel for Intestinal and Urinary Schistosomiasis—A Meta-analysis of Comparative and Non-comparative Clinical Trials. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, e3286.

