

CAROLINE DE SOUZA MONTENEGRO

PAPEL DA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> SECRETÓRIA DO GRUPO  
V NA INDUÇÃO DE EOSINOFILIA SISTÊMICA PELA  
INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni* EM  
CAMUNDONGOS.



**Monografia apresentada ao Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes, 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

DEZEMBRO/2018

**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 co-orientação da Mestre Camila Ribeiro Rodrigues de Pão Cunh**

757p Montenegro, Caroline de Souza  
Papel da fosfolipase A2 secretória do grupo V na indução de eosinofilia sistêmica pela infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos. / Caroline de Souza Montenegro. -- Rio de Janeiro, 2018.  
48 f.

Orientadores: Bruno Lourenço Diaz e Christianne Bandeira de Melo.

Coorientadora: Camila Ribeiro Rodrigues de Pão.  
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2018.

1. Fosfolipase A2. 2. *Schistosoma mansoni*. 3. Resposta tipo 2. 4. Eosinófilos. 5. Granuloma . I. Diaz, Bruno Lourenço, orient. II. de Melo, Christianne Bandeira, orient. III. de Pão, Camila Ribeiro Rodrigues, 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: **Caroline de Souza Montenegro**  
DRE: 115089450

BANCA EXAMINADORA: **Profa. Alessandra D' Almeida Filardy (Presidente)**  
**MSc. Kamila Guimarães Pinto**  
**Dr. Leonardo Santos de Assunção**  
**Prof. Fabiano Ferreira Dutra (Suplente)**

Título da Monografia: **"Papel da fosfolipase A2 secretória do grupo V na indução  
de eosinofilia sistêmica pela infecção por *Schistosoma mansoni* em  
camundongos"**

Local: **Sala de Reunião do Departamento de Microbiologia Geral / Instituto de  
Microbiologia Paulo de Góes / CCS / UFRJ**  
Data e hora de início: **11 de dezembro de 2018 às 10:30h**

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 9,9 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou co-orientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 11 de dezembro de 2018.

NOTA

10

9,8

10

Banca Examinadora:

Alessandra D' Almeida Filardy  
Profa. Alessandra D' Almeida Filardy

Kamila Guimarães Pinto  
MSc. Kamila Guimarães Pinto

Leonardo Santos de Assunção  
Dr. Leonardo Santos de Assunção

Prof. Fabiano Ferreira Dutra

Aluno:

Caroline de Souza Montenegro  
Caroline de Souza Montenegro

Orientador:

Bruno Lourenço Diaz  
Prof. Bruno Lourenço Diaz

Coorientador:

Camila Ribeiro Rodrigues de Pão Cunha  
MSc. Camila Ribeiro Rodrigues de Pão Cunha

Coordenador  
de TCC

Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho  
Profa. Bernadete Teixeira Ferreira Carvalho

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e a toda a espiritualidade que tornaram possível toda a minha caminhada.

A toda a minha família materna e paterna que foram meu suporte durante todos esses anos e que me apoiaram sempre em todos os momentos. Em especial a meus avós, Newton e Maria Zélia, que me deram casa e tudo que eu precisei durante esse período. As minhas irmãs, Luiza e Maria Eduarda, que são minhas confidentes e com quem eu posso contar para tudo. A minha madrinha Adriana, pela preocupação e por ter cedido o notebook para que eu conseguisse terminar de escrever meu TCC. E, principalmente, a minha mãe que desde sempre foi o meu porto seguro e tudo o que eu precisei na vida, essa conquista é para você.

A minha namorada Camila Macário, que foi um anjo que apareceu na minha vida nesse último ano. Obrigada por aguentar meus surtos de desespero e crises de ansiedade e por estar sempre comigo durante todos os momentos. Eu não teria conseguido sem você, te amo.

Aos meus melhores amigos de graduação, Julia, Victoria, Matheus, Natalia e Amanda, que foram essenciais para a minha sobrevivência durante esses quatro anos. Eu amei passar cada momento ao lado de vocês, desde os momentos tristes de choro coletivo no CA até os momentos felizes de festas e comidas. Espero que esses quatro anos que passei com vocês se multipliquem em muitos mais anos porque vocês são os melhores amigos que eu poderia ter.

Aos todos os outros amigos da faculdade e de outros lugares que estiveram presentes em muitos momentos me apoiando e me aconselhando nessa jornada.

Aos meus orientadores, Bruno Diaz e Christianne Melo, por todo conhecimento e orientação que me deram durante esse tempo. Em especial nesses últimos meses, obrigada por toda a atenção que me deram para que eu conseguisse finalizar o TCC e passar no mestrado.

A minha co-orientadora Camila Pão, que desde o primeiro dia se mostrou solícita em me ensinar tudo e que sempre me motivou a continuar e não desistir dos meus sonhos. Mesmo que eu esteja no mestrado, no meu coração você sempre será minha co-orientadora e grande amiga.

A todos do Laboratório de Inflamação, que desde o início me acolheram no laboratório e me auxiliaram em diversos momentos. Em especial ao prof Cláudio Canetti por todos os

conhecimentos e orientações e à Natália, Victor, Patrícia e Giovanna que fizeram parte do meu grupo de trabalho.

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) e PLAMOL (Plataforma de Microscopia Óptica de Luz Gustavo de Oliveira Castro).

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

“Isso de querer ser exatamente aquilo que a gente é ainda vai nos levar além.”

*Paulo Leminski*

## RESUMO

### PAPEL DA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> SECRETÓRIA DO GRUPO V NA INDUÇÃO DE EOSINOFILIA SISTÊMICA PELA INFECÇÃO POR *Schistosoma mansoni* EM CAMUNDONGOS.

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.**

Enzimas da família fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) exercem funções fundamentais em processo inflamatórios. A PLA<sub>2</sub> citosólica (cPLA<sub>2</sub>) é a principal responsável pela síntese de eicosanoides. Já a PLA<sub>2</sub> secretória do grupo V (sPLA<sub>2</sub>gV) tem papel secundário à cPLA<sub>2</sub> nessa função e parece estar mais relacionada à modulação da resposta imunológica. Em modelos murinos de infecção por *Schistosoma mansoni*, inicialmente instala-se uma resposta imunológica predominantemente de perfil tipo 1, seguida por polarização da resposta imune para o perfil tipo 2, envolvendo citocinas tais como IL-5, IL-13 e IL-4 que promovem característico aumento da eosinopoiese, níveis sistêmicos de eosinófilos e granulomas hepáticos eosinofílicos induzidos pelos ovos do parasita. Dessa forma, a infecção por *S. mansoni* corresponde à estratégia experimental interessante para se investigar o potencial papel imunomodulador da sPLA<sub>2</sub>gV, investigando sua capacidade de modular a resposta imunológica do tipo 2 através da indução de eosinofilia sistêmica durante a infecção por *S. mansoni*. Para tal, inicialmente acompanhamos o desenvolvimento da infecção por *S. mansoni* pela avaliação de diferentes parâmetros parasitológicos (carga parasitária, reação granulomatosa e eosinofilia) em animais deficientes para a enzima sPLA<sub>2</sub>gV (*Pla2g5*<sup>-/-</sup>) e selvagens, da linhagem C57BL/6. Os animais foram infectados com 60 cercárias de *S. mansoni* por via cutânea, e após 55 dias de infecção foram eutanasiados para realização das análises. A avaliação de alterações macroscópicas nos órgãos dos animais revelou que camundongos C57BL/6 infectados, WT ou *Pla2g5*<sup>-/-</sup>, apresentaram aumento no índice hepático, intestinal e esplênico quando comparados com os animais não infectados. Pela quantificação de ovos no intestino dos animais, foi possível observar aumento no número de ovos do parasito em animais *Pla2g5*<sup>-/-</sup> infectados quando comparado com animais WT. O número de granulomas hepáticos, também foi significativamente maior nos camundongos C57BL/6 *Pla2g5*<sup>-/-</sup> infectados em relação aos WT. A eosinofilia sanguínea e peritoneal, induzida pela infecção por *S. mansoni*, por sua vez mostrou-se significamente menor nos animais *Pla2g5*<sup>-/-</sup> quando comparados com os WT. Em conjunto, nossos dados indicam que a sPLA<sub>2</sub>gV apresenta um papel protetor frente a infecção por *S. mansoni* em camundongos C57BL/6 e como a ausência da enzima inibiu a eosinofilia sistêmica, também é possível sugerir que esta enzima participa na polarização da resposta imunológica para o perfil tipo 2.

**Palavras-chave:** Fosfolipase A<sub>2</sub> ; Eosinófilos; Resposta tipo 2; *Schistosoma mansoni*; Granuloma.



## ABSTRACT

### ROLE OF GROUP V SECRETORY PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> IN THE SYSTEMIC EOSINOPHILIA INDUCTION BY *S. mansoni* INFECTION IN MICE.

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.**

Enzymes of the phospholipase A<sub>2</sub> family (PLA<sub>2</sub>) play key roles in the inflammatory process. The cytosolic PLA<sub>2</sub> (cPLA<sub>2</sub>) is the main responsible for eicosanoids synthesis. On the other hand, the group V secretory PLA<sub>2</sub> (sPLA<sub>2</sub>gV) has a secondary role to cPLA<sub>2</sub> in this function and seems be more related to the modulation of the immune response. In murine models of *Schistosoma mansoni* infection, a predominantly type 1 immunological response was initially established, followed by polarization of the immune response to the type 2 profile, involving cytokines such as IL-5, IL-13 and IL-4 that promote a characteristic increase of eosinopoiesis, systemic levels of eosinophils, and eosinophilic hepatic granulomas induced by parasite eggs. Thereby, *S. mansoni* infection corresponds to the interesting experimental strategy to investigate the potential immunomodulatory role of sPLA<sub>2</sub>gV, investigating its ability to modulate the type 2 immune response through the study of induction of systemic eosinophilia during *S. mansoni* infection. For this purpose, we initially followed the development of *S. mansoni* infection through the evaluation of different parasitological parameters (parasite load, granulomatous reaction and eosinophilia) in animals deficient for the enzyme sPLA<sub>2</sub>gV (*Pla2g5*<sup>-/-</sup>) and wild type (WT) of the strain C57BL/6. The animals were infected with 60 cercariae by cutaneous route, and after 55 days of infection they were euthanized for performing the analyzes above. The evaluation of macroscopic changes in the organs of the animals revealed that infected C57BL/6 mice, WT or *Pla2g5*<sup>-/-</sup>, presented an increase in hepatic, intestinal and splenic index when compared to uninfected animals. By the quantification of eggs in the intestines of the animals, it was possible to observe an increase in the number of eggs of the parasite in infected *Pla2g5*<sup>-/-</sup> animals when compared to infected WT animals as well as the number of hepatic granulomas, which was significantly higher in the C57BL/6 mice *Pla2g5*<sup>-/-</sup> mice infected compared to the WT infected. Blood and peritoneal eosinophilia, induced by *S. mansoni* infection, in this turn showed to be significantly lower in *Pla2g5*<sup>-/-</sup> animals when compared to WT. Together, our data indicate that sPLA<sub>2</sub>gV has an interesting protective role against *S. mansoni* infection in C57BL/6 mice and, due to the inhibition of systemic eosinophilia, suggest that this enzyme participates in the polarization of the immune response to the type 2 profile.

**Key words:** Phospholipase A<sub>2</sub>; Eosinophils, Type 2 response; *Schistosoma mansoni*; Granuloma.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- AA-ácido araquidônico  
ALT-alanina amino transferase  
AST-aspartato transferase  
cPLA2-fosfolipase 2 citosólica  
cisLT (*LT<sub>cys</sub>*)-leucotrieno cisteinado  
dNTPs-desoxirribonucleotídeos fosfatados  
HE-hematoxilina e eosina  
IFN-interferon  
Ig-imunoglobulina  
IL-interleucina  
iPLA2-fosfolipase A<sub>2</sub> independente de Ca<sup>+</sup>  
KOH-hidróxido de potássio  
LT-leucotrieno  
OVA ovoalbumina  
PCR-reação em cadeia da polimerase  
PL-fosfolipase  
PG-prostaglandina  
sPLA2-fosfolipase A<sub>2</sub> secretória  
sPLA2gV-fosfolipase A2 secretória do grupo V  
TCD4-célula T CD4<sup>+</sup>  
TCD8-célula T CD8<sup>+</sup>  
Th-linfócitos T auxiliares  
TGF-β-fator de crescimento transformador  
TNF-fator de necrose tumoral  
Treg-células T regulatórias  
WT-*wild type*

**ÍNDICE**

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose	1
1.2 Esquistossomose mansônica: visão geral	3
1.3 Resposta imunológica na esquistossomose	6
1.4 Eosinófilos	9
1.5 Fosfolipase A <sub>2</sub>	10
1.6 Fosfolipase A <sub>2</sub> Secretória do Grupo V (sPLA <sub>2</sub> gV)	11
2. JUSTIFICATIVA	13
3. OBJETIVO	14
3.1 Objetivo geral	14
3.2 Objetivos específicos	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Animais	15
4.2 Genotipagem	15
4.3 Modelo de infecção experimental por <i>S. mansoni</i>	16
4.4. Quantificação de ovos de <i>S. mansoni</i> no tecido intestinal	16
4.5 Processamento Histológico	17
4.6 Análise de células presentes no sangue periférico	17
4.8 Análise de células presentes no lavado peritoneal e medular	18
4.9 Análise estatística	18
5. RESULTADOS	19

5.1. Aumento nos índices hepático, intestinal e esplênico induzido pela infecção por <i>S. mansoni</i> não são regulados pela enzima sPLA <sub>2</sub> gV.	19
5.2. A sPLA <sub>2</sub> gV protege contra o aumento da liberação de ovos no intestino de camundongos C57BL/6 machos infectados com <i>S. mansoni</i> .	20
5.3. A sPLA <sub>2</sub> gV controla a formação de granulomas hepáticos ao redor dos ovos de <i>S. mansoni</i> .	21
5.4. A sPLA <sub>2</sub> gV não parece influenciar no número de eosinófilos presentes na medula óssea 55 dias após a infecção por <i>S. mansoni</i> .	22
5.5. A sPLA <sub>2</sub> gV controla o número de eosinófilos presentes no sangue de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> .	23
5.6 A sPLA <sub>2</sub> gV controla o número de eosinófilos presentes na cavidade peritoneal de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> .	24
5.7 A sPLA <sub>2</sub> gV controla o tamanho de granulomas hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados por <i>S. mansoni</i> e participa da indução de fibrose no granuloma hepático.	25
6. DISCUSSÃO	27
7. CONCLUSÃO	32
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33

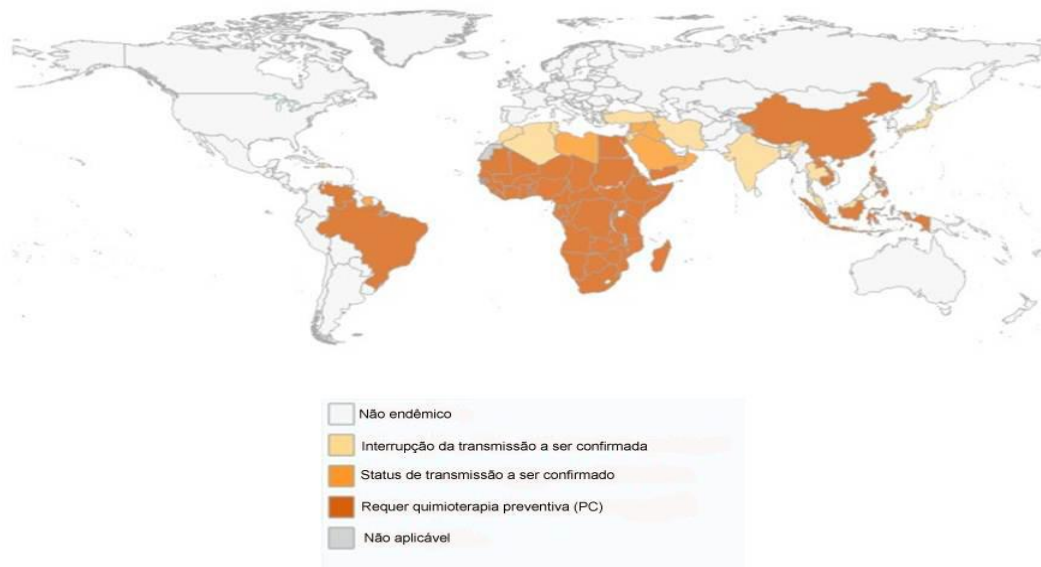
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose

A esquistossomose é uma parasitose causada por 6 espécies de trematódeos do gênero *Schistosoma*, sendo *S. haematobium* (esquistossomose urogenital) e *S. mansoni* (esquistossomose intestinal) as espécies mais predominantes (OMS, 2016,2018). É uma doença de grande relevância no cenário global, tanto pela severidade das complicações clínicas quanto pela grande prevalência (Raso *et al.*, 2007; Ribeiro *et al.*, 2009). Por ser de ocorrência tropical, atinge principalmente as regiões da África, Leste Mediterrâneo e América, sendo registrada em 54 países, principalmente no Brasil, onde estima-se que aproximadamente 1,5 milhão de pessoas estejam infectadas pelo *Schistosoma mansoni* (Ministério da Saúde, 2017). A doença afeta cerca de 200 milhões de pessoas e é uma eminente ameaça para mais de 600 milhões de indivíduos que vivem em áreas de risco, como lagos sem saneamento básico adequado que possibilitam a existência de formas infectantes do parasita (Ministério da Saúde, 2014). As estimativas mostram que a transmissão da doença foi relatada em 78 países e que pelo menos 206,5 milhões de pessoas precisaram de tratamento preventivo em 2016 (Figura 1). Por conta da importância e repercussão socioeconômica, em 2017 a Organização Mundial de Saúde (OMS) a apontou como uma das parasitoses mais disseminadas do mundo, ficando atrás apenas da malária.

Durante seu ciclo, o *S. mansoni* passa por muitas formas evolutivas, incluindo as cercárias que são a forma infectante do homem. A infecção é adquirida através da pele e mucosas em consequência do contato humano com águas contendo formas infectantes do *S. mansoni* e por isso é mais prevalente em áreas tropicais e subtropicais, especialmente em comunidades pobres sem acesso à água potável tratada e saneamento adequado (Ministério da Saúde, 2014). Com esse cenário, a esquistossomose é considerada uma das doenças que perpetuam a "armadilha da pobreza", por conta das reinfecções recorrentes entre as populações de risco (Bergquist e Whittaker, 2012; King, 2010), que conseqüentemente dificultam a capacidade das pessoas de trabalhar. Já as crianças, que são a faixa etária mais atingida pela doença, sofrem de anemia, desnutrição e tem habilidade de aprender reduzida (OMS, 2018).

Uma preocupação da OMS nos últimos anos tem sido a disseminação da doença para outras áreas, já que a migração de pessoas para áreas urbanas em busca de trabalho está introduzindo a parasitose em regiões não endêmicas. O crescimento da população e as correspondentes necessidades de energia e água geralmente resultam em modificações ambientais, para o desenvolvimento de usinas, que facilitam a transmissão (OMS, 2017). Outro dado alarmante é em relação ao impacto da doença, já que a esquistossomose ocupa o terceiro lugar entre as doenças tropicais negligenciadas (NTDs) ficando atrás das helmintíases transmitidas pelo solo e leishmanioses (Hotez *et al.* 2014).



**Figura 1: Mapa do status da esquistossomose em países endêmicos em 2016.** As estatísticas mostraram que 61.58% dos países são não endêmicos (branco), 25.62% precisaram de quimioterapia preventiva (laranja forte), 9,36% tem a interrupção transmissão a ser confirmada (laranja mais claro); 3,45% precisam confirmar o status de transmissão (laranja claro) e no restante dos países as estimativas não foram aplicáveis (cinza). Adaptado de Organização Mundial da Saúde (2017), disponível em: [http://apps.who.int/neglected\\_diseases/ntddata/sch/sch.html](http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html).

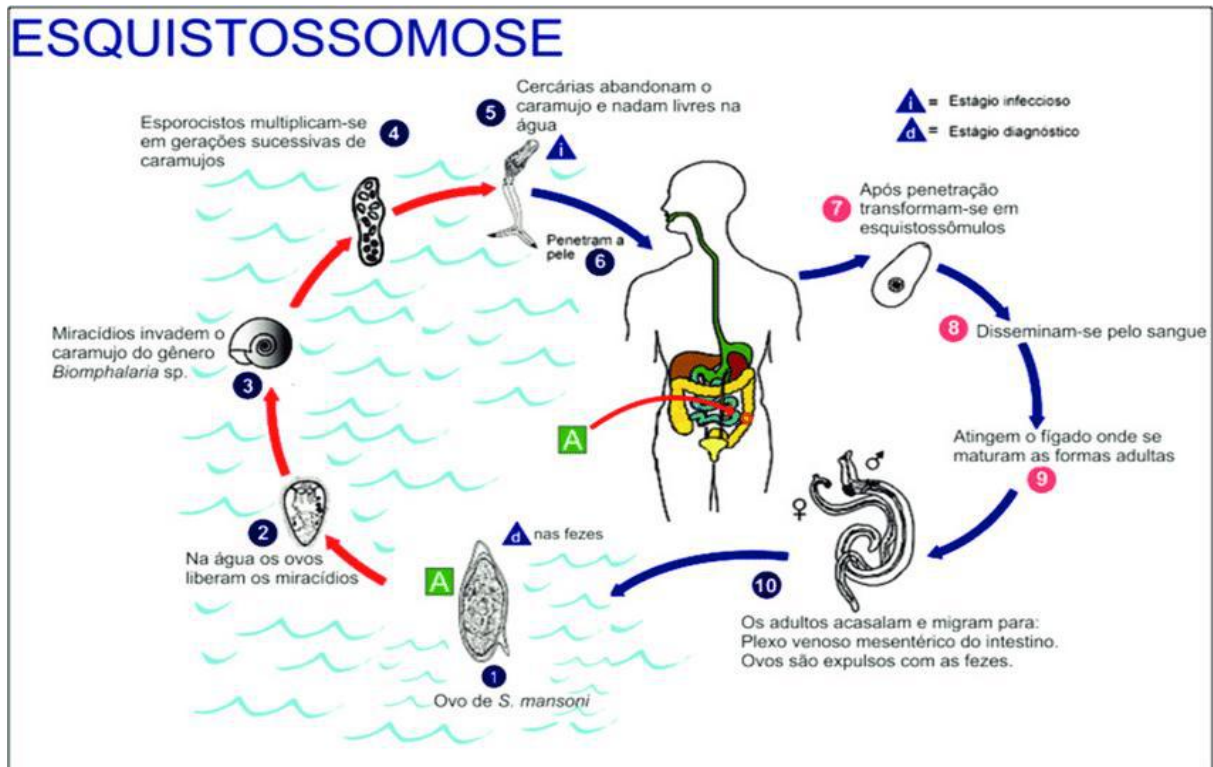
A Assembleia Mundial de Saúde (WHA), que aconteceu em 2012, propôs a meta de erradicar a esquistossomose até 2020 e desde então foi criada a Aliança Global da Esquistossomose (GSA), desenvolvida para atingir esse objetivo e atuar como parceira de

países endêmicos se concentrando nas necessidades de saúde, desigualdade e pobreza rural (Savioli *et al.*, 2011). Com essa iniciativa e com a expansão das intervenções de controle, quase 90 milhões de indivíduos foram tratados em 2016, incluindo 70,9 milhões de crianças e 18,3 milhões de adultos, o que significa um avanço na meta de erradicar a esquistossomose (OMS,2018).

## 1.2 Esquistossomose mansônica: visão geral

Para ocorrência da infecção por *S. mansoni* é preciso a presença do hospedeiro intermediário e do hospedeiro definitivo (Santos, Coelho e Lenzi, 2008). O hospedeiro intermediário é o caramujo do gênero *Biomphalaria*, principalmente da espécie *B. glabrata* (Muller e Wakelin, 2002) e embora a infecção já tenha sido observada em algumas espécies de roedores aquáticos, o homem ainda é o principal hospedeiro definitivo (Miranda *et al.* 2017).

O ciclo do *S. mansoni* começa quando um indivíduo infectado libera nas fezes ovos do parasita, na água esses ovos eclodem liberando miracídios que são a forma infectante do hospedeiro intermediário, caramujo do gênero *Biomphalaria*. Nesses caramujos os miracídios irão se transformar em esporocistos que irão se multiplicar até se desenvolverem em cercárias. O caramujo infectado libera na água cercárias, que são as formas infectantes ao homem, elas penetram o corpo humano através da pele durante atividades domésticas, ocupacionais e recreativas dos indivíduos (Grevelding *et al.*, 2017). Após a penetração as cercárias se desenvolvem em esquistossômulo, tal forma migra através das camadas superficiais da pele até atingir a derme, penetrando nos vasos sanguíneos que carregam passivamente o esquistossômulo para o coração. Do coração eles são bombeados para os pulmões e retornam ao coração para serem bombeados para a circulação sistêmica. Os esquistossômulos perfazem dois ou três ciclos até atingirem o sistema portal do fígado onde se desenvolvem em indivíduos adultos (Santos, Coelho e Lenzi, 2008). Nos vasos portais mesentéricos, ocorre a sobreposição da fêmea no canal ginecóforo do macho e, conseqüentemente, a cópula, seguida de oviposição. Os ovos depositados no mesentério migram através da corrente sanguínea para outros tecidos, onde vão produzir os miracídios em seu interior, até chegarem a luz do intestino e serem eliminados através das fezes, dando continuidade ao ciclo biológico (Figura 2).



**Figura 2: Ciclo biológico do *S. mansoni*.** (1) Liberação de Ovos de *S. mansoni* nas fezes do indivíduo infectado; (2) Eclosão dos ovos liberando miracídeos; (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 esquistossômulos; (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 expulsos com as fezes. Adaptado de Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC).

Alguns ovos não são eliminados, por não conseguirem alcançar a luz intestinal, e ficam retidos nos tecidos, principalmente fígado e intestinos. Isso contribui para a formação de granulomas que no fígado podem ocluir total ou parcialmente a passagem do sangue, causando fibrose e podendo ocasionar as manifestações das formas mais graves da doença (Ministério da Saúde, 2014).

A sintomatologia clínica da esquistossomose depende do estágio de evolução do parasita no homem, da localização, da quantidade do parasita nos diferentes órgãos, das reações do organismo humano e da resposta ao tratamento. Conforme a doença vai progredindo ela pode ser dividida em diferentes fases: fase aguda, febre Katayama, e fase crônica (Gray *et al.*, 2011). A fase aguda pode ser assintomática ou apresentar-se como dermatite cercariana, caracterizadas por micropápulas eritematosas e pruriginosas, que ocorrem até cinco dias após a infecção com as cercárias. A febre Katayama, caracterizada por linfadenopatia, febre, anorexia, dor abdominal e cefaleia, pode ocorrer de 3 a 7 semanas após



a exposição. Esses sintomas podem ser acompanhados de diarreia, náuseas, vômitos ou tosse seca, além de ocorrer hepatomegalia. Após seis meses de infecção, o quadro clínico pode evoluir para a fase crônica, onde podem ocorrer complicações como fibrose hepática, hipertensão portal, insuficiência hepática severa, hemorragia digestiva, *cor pulmonale* e glomerulonefite. A doença também pode estar associada com infecções bacterianas (salmonelas, estafilococos) e virais (hepatites B e C) e pode haver comprometimento do sistema nervoso central e de outros órgãos devido ao depósito secundário de ovos (Ministério da Saúde, 2014; 2016).

O diagnóstico clínico primário da esquistossomose deve incluir questões importantes que devem ser perguntadas na anamnese, como informações acerca da história geográfica, da exposição à água ou a alimentos potencialmente contaminados, banhos em lagoas com caramujos e viagens a áreas endêmicas, além de sinais específicos que devem ser olhados no exame físico que são normalmente os sintomas das síndromes agudas da infecção (dermatite cercariana e febre de Katayama). Isso deve ser aliado a testes e investigações laboratoriais e radiológicas (Gryseels *et al.*, 2006, Mahmoud, 2008). Para o diagnóstico laboratorial, a análise microscópica das fezes (Kato Katz) ainda é o diagnóstico mais utilizado da parasitose, ainda que com algumas limitações. Os ovos do *Schistosoma* são fáceis de detectar e identificar na microscopia devido ao seu tamanho e forma característicos e por apresentarem uma espícula lateral ou terminal (Figura 3), porém é preciso esperar pelo menos 2 meses após o último contato com a água antes de procurar por ovos, pois esse tipo de infecção demora a produzir ovos (Ross *et al.* 2002). Testes sorológicos, achados radiológicos, detecção de anticorpos séricos, de antígenos e de DNA também podem ser utilizados dependendo do estágio evolutivo do parasita (Weerakoon, 2016). Exames não específicos também podem apontar para uma suspeita de esquistossomose, como no hemograma onde a leucocitose é observada em 25% a 30% dos casos, mas é a eosinofilia acentuada (540 a 7380 cél/mm<sup>3</sup>) o achado laboratorial mais frequente na fase aguda. As enzimas hepáticas também se encontram alteradas, com predomínio da fosfatase alcalina, seguida da gama-glutamil transferase, da ALT e da AST (Santos, Coelho e Lenzi, 2008).



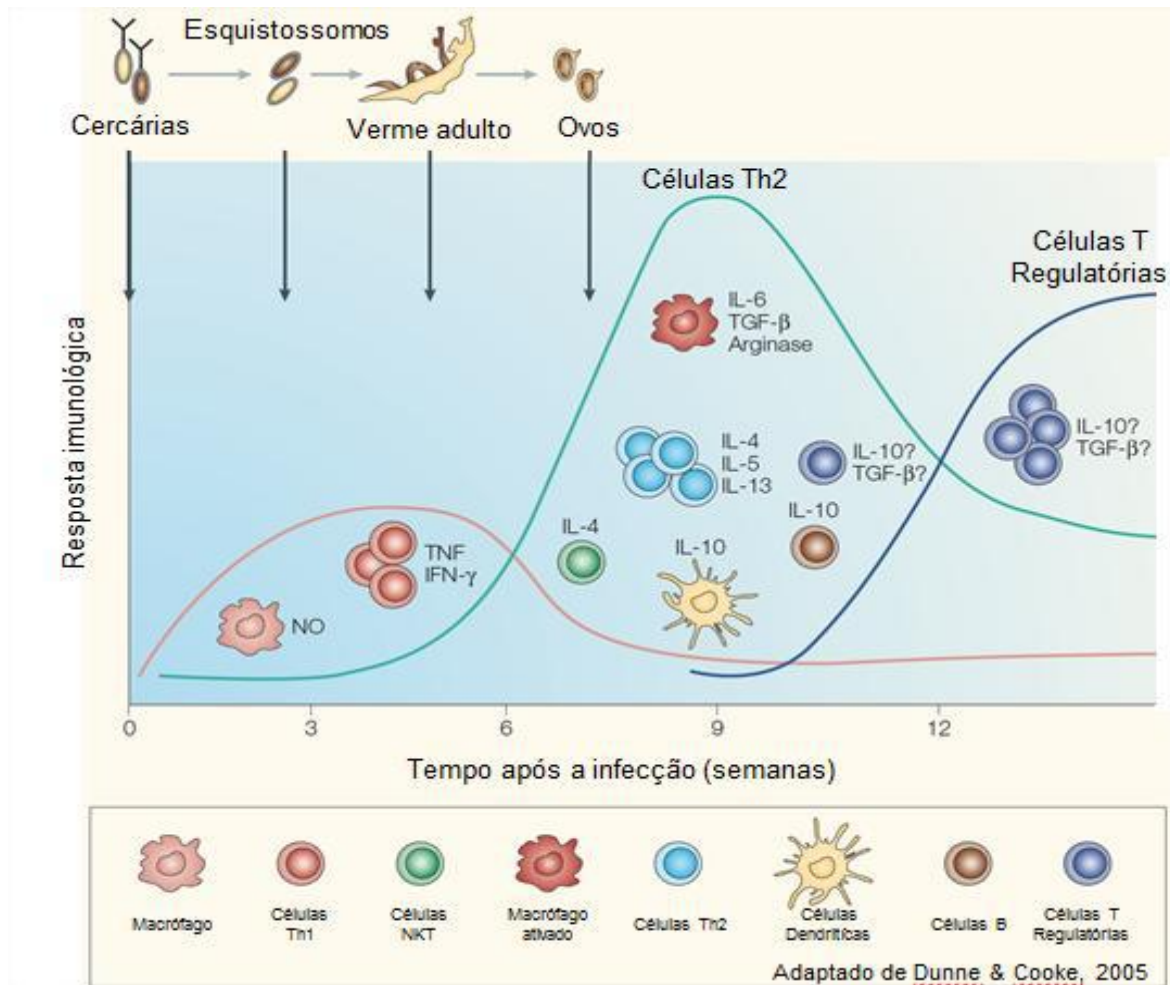
**Figura 3: Ovos de *S. mansoni* em diferentes fases evolutivas.** Da esquerda para direita, ovo em fase inicial de desenvolvimento, começo da formação dos embrião(miracídio)e fase final do desenvolvimento (embrião formado). Reparar na espícula lateral inferior esquerda característica do ovo deste parasita. Fonte: José Roberto Machado e Silva – UERJ, Renata Heisler Neves e Delir Corrêa Gomes – IOC (2008). Retirado de: Vigilância da Esquistossomose Mansoní: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde Disponível em: [www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs).

O principal fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose é o praziquantel. O tempo de administração do tratamento deve ser levado em consideração, porque o medicamento é mais efetivo contra as formas adultas do parasita. Em viajantes, o tratamento deve ser feito até 6-8 semanas depois da exposição à água potencialmente contaminada e embora um pequeno curso de tratamento seja usualmente efetivo, a resposta ao tratamento com praziquantel pode mudar de acordo com a resposta imune do indivíduo. Por exemplo, indivíduos levemente infectados podem ter uma resposta imune menos robusta, sendo então necessária a repetição do tratamento após 2 a 4 semanas para aumentar a efetividade (CDC, 2012). Há estudos que reportam resistência do parasita ao medicamento, porém a difusão clínica dessa resistência não foi devidamente verificada (Brotos e Bennett, 2007).

### 1.3 Resposta imunológica na esquistossomose

Durante a fase de infecção aguda por *S. mansoni*, que ocorre antes do aparecimento de ovos nas fezes, a resposta imunológica é predominantemente de perfil Th1, com a presença de macrófagos secretando óxido nítrico (NO) e linfócitos liberando citocinas TNF e IFN- $\gamma$  com o objetivo de eliminar as formas adultas do parasita. Na fase de acasalamento das formas adultas com posterior liberação de ovos a resposta imunológica sofre alterações caracterizadas pelo decréscimo da resposta tipo 1 em paralelo com o surgimento de células com perfil de tipo 2, como macrófagos M2 e linfócitos Th2 (Pearce e MacDonald, 2002) que liberam citocinas ,como IL-4, IL-13 e IL-5, que irão favorecer recrutamento de eosinófilos para o local da infecção. A partir da décima segunda semana de infecção a resposta tem caráter mais

regulatório com a liberação de citocinas como IL-10 e TGF- $\beta$  (Wynn *et al.*, 2004; Wilson *et al.*, 2007)(Figura 4).



**Figura 4: Resposta imunológica durante a infecção por *S. mansoni*.** Nas primeiras semanas de infecção, antes da liberação dos ovos, a resposta imunológica é prioritariamente de tipo 1 com a presença de macrófagos secretando óxido nítrico (NO) e linfócitos liberando citocinas TNF e IFN- $\gamma$ . Enquanto que após a liberação dos ovos a resposta é polarizada para o tipo 2 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- $\beta$  (adaptado de Dunne e Cook, 2005).

As respostas Th1 e Th2 são distinguidas de acordo com o padrão de citocinas produzidas pelas respectivas células. Linfócitos Th1 secretam interferon (IFN)- $\gamma$ , interleucina (IL)-2 e fator de necrose tumoral- $\beta$  (TNF- $\beta$ ). Essas citocinas participam na ativação de macrófagos e no atraso das reações de hipersensibilidade. Por sua vez, linfócitos Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13, induzindo a produção de muco e ajudando na resposta imune humoral pela estimulação da proliferação de linfócitos B, produção de

imunoglobulina E (IgE) e imunoglobulina G (IgG) e maturação de eosinófilos e mastócitos (Abbas, Murphy e Sher, 1996; Mohrs *et al.*, 2007).

No geral, a resposta imune durante a esquistossomose é, predominantemente, marcada pela presença de níveis elevados de IgE e eosinofilia no sangue e tecidos (Capron e Dessaint, 1992). Além disso, os ovos de *S. mansoni* depositados nos tecidos induzem a formação de granulomas que são ao mesmo tempo a causa da patologia e proteção contra a infecção, dependendo da carga parasitária (Hams *et al.*, 2013). A formação do granuloma é o resultado de uma resposta imune mediada por célula a antígenos dos ovos de *Schistosoma*, esse tipo de resposta granulomatosa tem pico entre a oitava e a décima semana depois da exposição, em camundongos C57BL/6. O estágio agudo do granuloma é caracterizado pela densa celularidade e máxima produção de citocinas tipo 2 e conforme a infecção progride para o estágio crônico (16 a 20 semanas pós-infecção), a produção de citocinas e celularidade diminuem, enquanto que componentes fibróticos, como fibras colágenas, aumentam (Boros, Pelley, e Warren, 1975; Doughty e Phillips, 1982; Boros, 1989). As células TCD4<sup>+</sup> são as principais células que orquestram a resposta granulomatosa em volta do ovo de *S. mansoni*. Entretanto células TCD8<sup>+</sup>, células B e macrófagos M2 têm mostrado envolvimento na formação do granuloma (Fallon *et al.*, 1998; Jankovic *et al.*, 1998; Herbert *et al.*, 2004). Em adição, podem-se destacar os eosinófilos como a principal população celular constituinte do granuloma (Moore *et al.*, 1977). Esta infiltração eosinofílica é mediada por citocinas do tipo 2, tais como IL-5 e IL-13 (Lenzi e Sobral 1987).

É importante destacar que a resposta imune do tipo 2 é a principal responsável pela proteção do hospedeiro definitivo contra o *S. mansoni*, esta proteção se dá pelo aumento de linfócitos Th2, macrófagos M2, citocinas IL-4, IL-13 e IL-5 e de eosinófilos (Akutsu *et al.*, 1995; Schwartz *et al.*, 2014). Um artigo recente feito com camundongos deficientes para o receptor alfa de IL-4 (IL-4R $\alpha$ ) demonstrou a importância desse receptor na manutenção da imunidade celular durante a esquistossomose (Ndlovu *et al.*, 2018), já que os camundongos IL-4R $\alpha$  deficientes apresentaram deficiência na produção de citocinas Th2 por conta da redução no número de células TCD4<sup>+</sup>. Tal dado enfatiza ainda mais a importância de citocinas tipo 2 e da resposta imune tipo 2 no geral, na proteção contra o *S. mansoni*. Essa função protetora pode controlar o parasitismo, a disfunção hepática causada pela intensa reação granulomatosa e pode proteger contra a mortalidade, tanto em modelos clínicos como experimentais.

#### 1.4 Eosinófilos

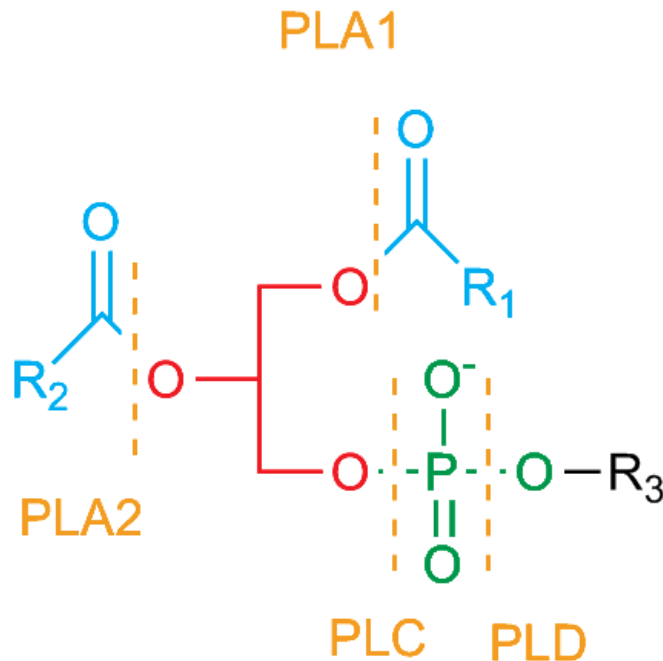
Os eosinófilos são células frequentemente associadas à resposta protetora contra helmintos. Essas células apresentam uma série de grânulos contendo proteínas tais como proteína eosinofílica básica principal (MBP), proteína eosinofílica catiônica (ECP), peroxidase eosinofílica (EPO) e neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN) que serão importantes no processo de proteção contra infecções parasitárias, como a esquistossomose (Rosenberg, Dyer e Foster 2013). Já foi demonstrado que a ECP *in vitro* provoca a ruptura e a fragmentação do esquistossômulo e que a EPO combinada com peróxido de hidrogênio provoca a morte do esquistossômulo (Jong, Mahmoud e Klebanoff , 1981). Entretanto, estudos com camundongos nocautes para eosinófilos demonstraram que o eosinófilo não parece exercer um papel fundamental no controle do desenvolvimento da infecção por *S. mansoni* (Swartz *et al.*; 2006).

Em contrapartida, os eosinófilos apresentam uma variedade de receptores e produzem uma gama de quimiocinas e citocinas que agem como moléculas regulatórias em diferentes processos fisiológicos e patológicos (Shamri *et al.* 2011;Rosenberg *et al.*, 2013). Linfócitos Th2 produzem IL-5 que tem papel central na ativação e recrutamento de eosinófilo para o local da infecção. Por serem as principais células presentes nesse tipo de resposta os eosinófilos são considerados as células efetoras “downstream” da ativação da resposta Th2 (Capron *et al.*, 1979; Buys *et al.*,1981). Um estudo demonstrou que após a injeção intraperitoneal de ovos de *S. mansoni*, eosinófilos murinos são recrutados para o local da infecção (Sabin *et al.*,1996), confirmando que eosinófilos estão em abundância em respostas imunes do tipo 2, sendo assim, importantes marcadores deste tipo de resposta (Basten *et al.*; 1970).

Os eosinófilos também são potentes produtores de mediadores lipídicos que são importantes em contextos inflamatórios (Gleich e Adolpson 1986; Weller, 1994). Por exemplo, estudo de Secor e colaboradores (1998) demonstraram o envolvimento de leucotrienos na fisiopatologia esquistossomótica (Secor *et al.*1998).

### 1.5 Fosfolipase A<sub>2</sub>

As fosfolipases (PL) são enzimas capazes de clivar os componentes estruturais das membranas celulares, como os fosfolipídios. As PLs são subdivididas em quatro famílias: A (A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub>), B, C e D, que se diferenciam de acordo com o ponto de clivagem do fosfolipídio (Figura 5). Vale ressaltar que as enzimas que apresentam ao mesmo tempo a atividade da PLA<sub>1</sub> e PLA<sub>2</sub> são denominadas de fosfolipase B (PLB).



**Figura 5: Sítios de clivagem dos tipos de fosfolipases.** No esquema vemos os diferentes tipos de fosfolipases classificadas de acordo com o ponto de clivagem no fosfolipídio. Fonte: <https://it.wikipedia.org/wiki/Fosfolipasi>

Nos mamíferos foram encontradas mais de 25 isoformas de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) que se dividem em três principais classes: dependente de Ca<sup>2+</sup> citosólico (cPLA<sub>2</sub>), independente de Ca<sup>2+</sup> intracelular (iPLA<sub>2</sub>) e secretória (sPLA<sub>2</sub>) (Boilard *et al.*, 2010). A cPLA<sub>2</sub> exerce um papel fundamental em processos inflamatórios, pois é a principal enzima responsável pela mobilização de AA para síntese de eicosanoides (Henderson *et al.*, 2013). Quanto a sPLA<sub>2</sub>, já foram encontrados 10 genes para esta enzima no genoma humano (Henderson *et al.*, 2013), no entanto o papel dessas enzimas no metabolismo lipídico ainda não foi totalmente elucidado (Murakami *et al.*, 2015). Recentemente, foram gerados camundongos transgênicos ou *knockout*(KO) para as 5 isoformas de sPLA<sub>2</sub> (grupos IB, IIA, III, V e X) e tem se tornado evidente que as sPLA<sub>2</sub>s individuais tem distintas contribuições em vários eventos biológicos como digestão, inflamação, dano tecidual, aterosclerose, defesa do hospedeiro, reprodução e

homeostase da pele (Lambeau e Gelb, 2008; Murakami *et al.*, 2011). De forma geral as sPLA<sub>2</sub>s podem participar de uma gama de processos biológicos de modo distintos, podendo ser redundantes, complementares ou regulatórios (Murakami *et al.*, 2011).

### 1.6 Fosfolipase A<sub>2</sub> Secretória do Grupo V (sPLA<sub>2</sub>gV)

Em 1994, Chen e colaboradores clonaram pela primeira vez a fosfolipase A<sub>2</sub> do grupo V (sPLA<sub>2</sub>gV) e a descreveram como uma enzima pertencente ao grupo das fosfolipases A<sub>2</sub> secretórias, dependentes de Ca<sup>+</sup> e que tem funcionamento ótimo em pH alcalino. Em camundongos, seu gene está localizado no cromossomo 4 (*Pla2g5*) e em humanos no cromossomo 1 (*PLA2G5*).

O RNA para sPLA<sub>2</sub>gV foi identificado no tecido cardíaco, placenta e pulmão, assim como em diferentes tipos celulares como: mastócitos da medula óssea de camundongos (Bingham *et al.*, 1999), macrófagos da linhagem P388D1 (Balboa *et al.*, 1996), macrófagos peritoneais de camundongos (Satake *et al.*, 2004), neutrófilos humanos (Degousee *et al.*, 2002), astrócitos (Thomas *et al.*, 2000) e em células Th2 ativadas (Ho *et al.*, 2001).

Quanto as formas de atuação, o papel da sPLA<sub>2</sub>gV ainda não é bem estabelecido, embora grandes avanços tenham sido alcançados na caracterização dos impactos funcionais da enzima em função do desenvolvimento de animais deficientes para a sPLA<sub>2</sub>gV (*vide infra*). Alguns trabalhos descrevem que o papel desta enzima está ligado à síntese de importantes mediadores lipídicos, como leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) (Muñoz *et al.*, 2006) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) (Masuda *et al.*, 2005), em processos inflamatórios no tecido pulmonar. Entretanto, outros trabalhos demonstraram que o papel da sPLA<sub>2</sub>gV na síntese desses mediadores é secundário ao da cPLA<sub>2</sub> (grupo IV). Esses estudos mostram que, de fato, em função do tipo celular e estímulo estudados, a participação da sPLA<sub>2</sub>gV na síntese de eicosanoides pode depender da indução de aumento da expressão e atividade de enzimas envolvidas na cascata de síntese desses mediadores, incluindo a própria cPLA<sub>2</sub> e COX-2 (Diaz *et al.*, 2006; Kikawada *et al.*, 2007).

Na literatura já foram descritos diferentes papéis para a sPLA<sub>2</sub>gV. Alguns trabalhos descrevem o papel dela na resposta imune inata, regulando a fagocitose de fungos e hidrólise de bactérias gram-negativas (Degousee *et al.*, 2002; Balestrieri *et al.*, 2006). A sPLA<sub>2</sub>gV também tem papel importante na obesidade e isso foi demonstrado através de estudo utilizando camundongos *sPla2g5*<sup>-/-</sup> que revelou que a obesidade induzida por dieta nesses

animais foi aumentada em relação aos camundongos *wild type* (WT). O mesmo grupo também demonstrou que a sPLA<sub>2</sub>gV tem papel anti-inflamatório ao polarizar os macrófagos para o perfil M2, diminuindo assim a inflamação no tecido adiposo, a resistência a insulina, a hiperlipidemia e a obesidade (Sato H. *et.al*, 2014). Aparentemente, a sPLA<sub>2</sub>gV também desempenha um papel pró-inflamatório em outros modelos. Por exemplo, em modelo de peritonite induzida por zimosan, a fase inicial da síntese pró-inflamatória de leucotrienos cisteinados (cysLT), foi parcialmente reduzida em camundongos *Pla2g5<sup>-/-</sup>* (Satake, Y. *et al.*, 2004). Alguns autores também destacam a sPLA<sub>2</sub>gV como importante no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, através da hidrólise de fosfolipídios presentes em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Boyanovsky *et al.*, 2004; Bostrom *et al.*, 2007; Prukanski, Kopilov e Kuksis, 2016). Em modelos de inflamação induzida por OVA, camundongos nocautes para sPLA<sub>2</sub>gV (*Pla2g5<sup>-/-</sup>*) apresentam redução na hiperresponsividade e no infiltrado leucocitário, reações presentes em camundongos positivos para a sPLA<sub>2</sub>gV (*Pla2g5<sup>+/+</sup>*) após o estímulo com OVA. Dessa forma, os estudos sugerem provavelmente houve uma redução da resposta imunológica, devido a uma baixa produção de citocinas Th2 (Muñoz *et al.*, 2007; Giannattasio *et al.*, 2010; Henderson *et al.*, 2013). Vale também destacar o papel dessa enzima em infecções parasitárias, como a leishmaniose. Um trabalho feito com camundongos *Pla2g5<sup>-/-</sup>* infectados por *L. major* revelou que a ausência da enzima provoca redução nos níveis de IL-4 e redução da lesão causada por *L. major* (Zamith-Miranda *et al.*, manuscrito em preparação)

Em suma, todos os dados indicam que a sPLA<sub>2</sub>gV desempenha múltiplos papéis em diferentes contextos. Na maioria dos casos, parece que a função dessa enzima está relacionada com a regulação do estabelecimento de respostas imunológicas do tipo 2. Entretanto, estudos sobre como a sPLA<sub>2</sub>gV age, bem como seu papel em outros modelos de infecção, ainda são escassos. Esse trabalho, então, visa investigar o potencial papel imunoregulatório da sPLA<sub>2</sub>gV usando o modelo de infecção por *Schistosoma mansoni* que tem resposta imunológica caracterizada por proeminente resposta do tipo 2.



## 2. JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é um grave problema de saúde pública que acomete principalmente populações de áreas rurais e periferias urbanas. A única forma de tratamento da doença tem sido eficaz, porém o controle da infecção tem sido um desafio e é extremamente importante a procura de novas terapias que diminuam a incidência da doença. No contexto da busca por novos alvos terapêuticos, a enzima sPLA<sub>2</sub>gV tem emergido como uma importante molécula no estabelecimento de respostas de tipo 2 para diferentes condições patológicas. Dessa forma, postulamos a participação desta enzima em respostas a infecções por parasitos multicelulares, como o *S. mansoni*. Portanto, a compreensão do papel da sPLA<sub>2</sub>gV na regulação da resposta imunológica do tipo 2 durante a infecção por *S. mansoni* poderá levar a identificação desta enzima como novo alvo terapêutico para esta patologia. Para tal avaliaremos o parâmetro da eosinofilia sistêmica como estratégia experimental para identificação da resposta imune do tipo 2 em animais deficientes para sPLA<sub>2</sub>gV.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo geral**

Compreender o papel da sPLA<sub>2</sub> do grupo V na infecção por *Schistosoma mansoni* empregando modelo experimental murino, com ênfase nos impactos da enzima sobre os aspectos parasitológicos esquistossomóticos e instalação da reação eosinofílica característica da resposta imune do tipo 2.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Caracterizar a infecção por *S. mansoni* em animais deficientes para a enzima sPLA<sub>2</sub>gV, analisando a presença de ovos no intestino e formação de granuloma hepático.
- Avaliar o envolvimento da sPLA<sub>2</sub>gV no estabelecimento da resposta eosinofílica, através da análise de eosinofilia medular, peritoneal e sanguínea em animais deficientes para a enzima sPLA<sub>2</sub>gV.

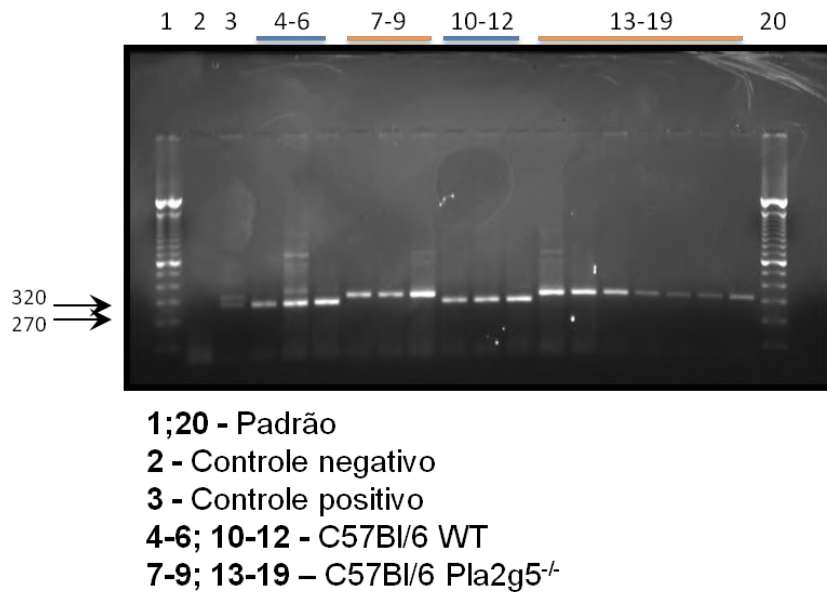
## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Animais

Para a realização deste projeto foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com *alelos* selvagem e mutados para a enzima fosfolipase A<sub>2</sub> do grupo V (WT e *Pla2g5*<sup>-/-</sup>, respectivamente) (Satake *et al*, 2006), pesando entre 20 e 25 g, provenientes do biotério do Laboratório de Inflamação do IBCCF e/ou do Laboratório de Animais Transgênicos (LAT) do CCS, ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Os procedimentos experimentais envolvendo os animais 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). Durante o tempo de infecção os animais foram mantidos em condições de temperatura e luz controladas, com oferta de ração e água *ad libitum*.

### 4.2 Genotipagem

A fim de confirmar o genótipo dos animais transgênicos, foi feita a genotipagem dos animais em acasalamento. 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* senso específicos para o gene *Pla2g5* (WT) e para o cassete de resistência a neomicina (NEO) inserido por recombinação homóloga no *exon 3* do gene *Pla2g5* dos animais deficientes para sPLA<sub>2</sub>V. O primer anti-senso é comum para ambos os produtos, o que permite a identificação de ambos os alelos em uma mesma reação. Os produtos do PCR foram submetidos à eletroforese (Figura 6) em gel de agarose 2%, a fim de confirmar o tamanho dos fragmentos amplificados, cujo tamanho esperado é 270pb para camundongos WT e 320pb para camundongos *Pla2g5*<sup>-/-</sup>. 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 acrescido ao mix para PCR que possui os *primers*, solução tampão para Taq Polimerase [10X], dNTP's [2,5 mM] e a própria Taq Polimerase [5U/μl].



**Figura 6: Revelação por eletroforese dos produtos de PCR.** Colunas 1 e 20 representam o padrão de tamanho de bandas; Colunas 2 e 3 representam controles negativo e positivo, respectivamente; Colunas 4-6 e 10-12 representam camundongos positivos para o genótipo WT; Colunas 7-9 e 13-19 representam camundongos positivos para o genótipo KO.

### 4.3 Modelo de infecção experimental por *S. mansoni*

Os camundongos C57BL/6, selvagens (WT) e deficientes para a fosfolipase A<sub>2</sub> do grupo V (*Pla2g5*<sup>-/-</sup>) foram infectados com cerca de 60 cercárias, previamente quantificadas, de *Schistosoma mansoni* por via percutânea. As cercárias são provenientes de caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, oriundas do Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Antes da infecção os animais foram colocados em lava pés com 50 ml de água destilada, por 30 min com objetivo de evitar possíveis interferências de fezes e urina no processo de penetração das cercárias. No momento da infecção, os animais foram colocados em copos do tipo americano de 300 ml contendo a solução com as cercárias, sendo mantidos ali por 40 min. Os animais não infectados passaram pelo mesmo processo que os infectados, porém no copo tinha apenas água. Os grupos foram eutanasiados em câmara de CO<sub>2</sub> no 55º dia após a infecção para realização das análises. Os órgãos (fígado, baço e intestino) dos animais foram retirados e pesados em balança calibrada.

### 4.4. Quantificação de ovos de *S. mansoni* no tecido intestinal

Os intestinos dos camundongos selvagens e *Pla2g5*<sup>-/-</sup> infectados ou não infectados foram digeridos em solução de hidróxido de potássio 4%, segundo o protocolo

(Cheever,1969), para fazer a contagem de ovos no tecido intestinal. Durante o procedimento, os intestinos foram pesados e colocados individualmente em recipiente de vidro, contendo 40 ml da solução de KOH 4%, e foram mantidos *overnight* (12 h a 16 h) em capela de exaustão. No dia seguinte, os recipientes foram colocados em banho-maria a 40° C por 1 h e em seguida foram preparadas as placas para contagem de ovos. Nas placas de 96 poços foram colocados 80 µL de água destilada e 20 µL da amostra em cada poço, sendo feita octuplicatas para cada amostra. A contagem dos ovos de *S. mansoni* foi feita em microscópio invertido (40x) e os resultados foram expressos em número de ovos/grama de tecido.

#### **4.5 Processamento Histológico**

Os fígados dos animais selvagens e *Pla2g5<sup>-/-</sup>* infectados e não infectados retirados no 55° dia de infecção, foram preservados em solução Miloning (formol 40%, fosfato de sódio monobásico, hidróxido de sódio, pH:7,2), fragmentados e enviados para processamento histológico no Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ. Os materiais selecionados para histologia foram identificados e acondicionamos em cassetes, em seguida preservados em solução de formol tamponado a 10%. Após 48 h, os tecidos foram desidratados em concentrações crescentes de etanol e emblocados em parafina, em seguida cortados com micrótomo e corados pelo método de hematoxilina-eosina (HE) clássico ou Picrosirius-red modificada para confocal (Puchtler *et al.*, 1973). Após o preparo das lâminas, foram avaliados os aspectos morfológicos e quantificadas tanto as áreas dos granulomas com presença de ovos de *S. mansoni* através do programa Panoramic Viewer (3DHistech) quanto os número de granulomas em volta de ovos de *S. mansoni* por campo de tecido hepático em microscópio ótico. Também foram avaliados os conteúdos de fibras colágenas nos granulomas hepáticos corados com Picrosirius-red ao redor dos ovos de *S. mansoni* por microscopia confocal (Zeiss live cell observe).

#### **4.6 Análise de células presentes no sangue periférico**

Os leucócitos totais circulantes foram contados em câmara de Neubauer ,diluídos em solução de Turk (ácido acético glacial 2% e cristal violeta), a partir de 10 µL de sangue coletados da cauda dos camundongos. Para a análise diferencial em esfregaços sanguíneos corados com Panótico (LaborClin), foram contados 100 leucócitos, determinando o percentual

de eosinófilos. A análise dos leucócitos presentes no sangue periférico dos camundongos foi feita 55 dias após a infecção.

#### **4.8 Análise de células presentes no lavado peritoneal e medular**

Leucócitos totais foram contados em câmara de Neubauer (diluídos em solução de Turk) a partir do lavado peritoneal ou medular de camundongos. O lavado peritoneal foi feito com injeção intraperitoneal de 700 $\mu$ L PBS+EDTA e posterior recuperação do líquido contendo as células da cavidade + solução PBS+EDTA. Para o lavado medular foram retirados o fêmur e a tíbia, esses ossos foram centrifugados e o líquido medular foi ressuspendido em 500  $\mu$ L de PBS + EDTA. Ambos os líquidos recolhidos nos lavados foram centrifugado a 1500 rpm durante 10 min a 4°C, o sobrenadante foi armazenado e o material sedimentado ressuspendido em 250  $\mu$ L de PBS + EDTA para contagem de leucócitos totais, enquanto para a análise diferencial foi feito um citocentrifugado, com o auxílio de citocentrífuga (Cientech), em uma rotação de 350 rpm durante 5 min, em seguida as lâminas foram coradas com Panótico (LaborClin). A avaliação foi realizada com auxílio de microscopia de campo claro com objetiva (100 x) sob imersão em óleo, onde foram contadas 100 células.

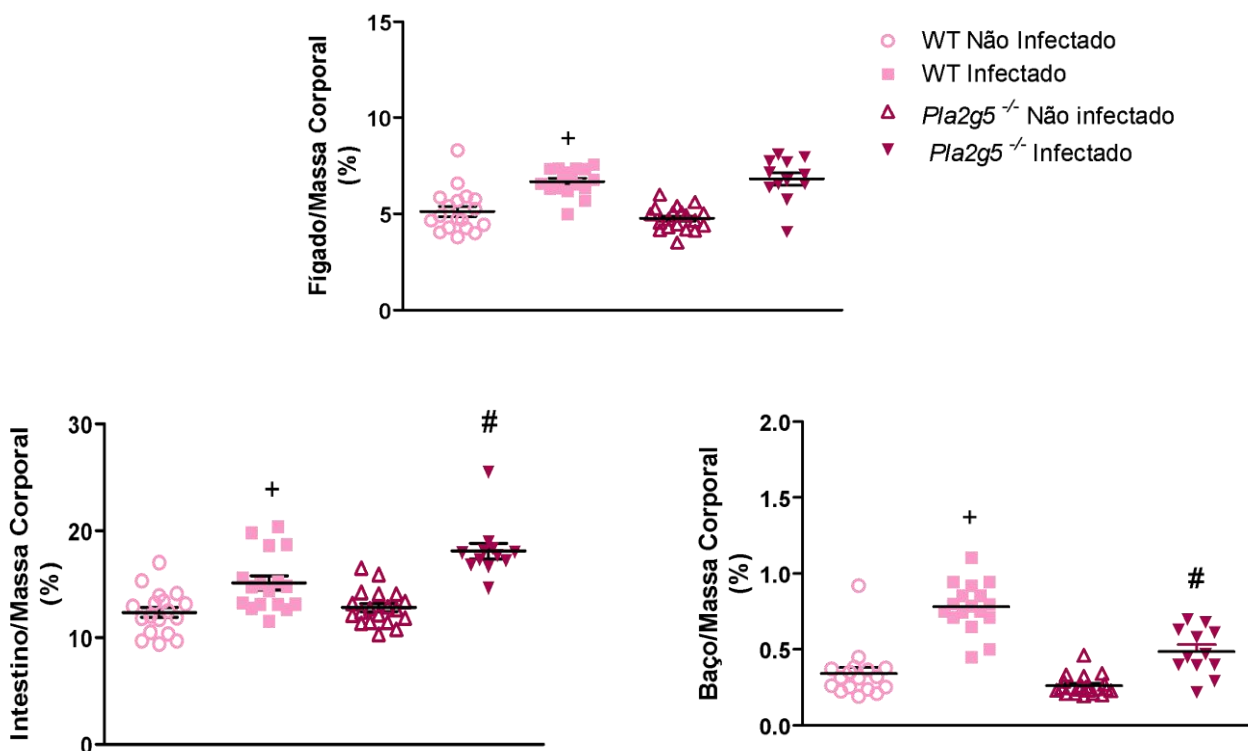
#### **4.9 Análise estatística**

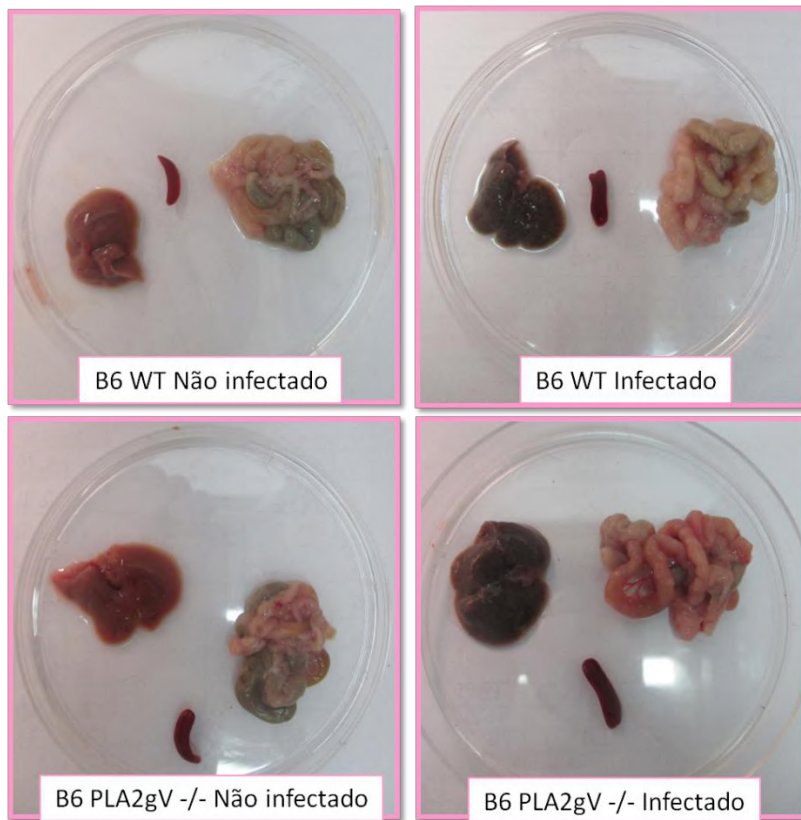
As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. Os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A significância estatística foi avaliada através do teste de análise de variância *one-way* ANOVA, seguido pelo teste Newman-Keuls sendo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

## 5. RESULTADOS

### 5.1. A infecção por *S. mansoni* induz aumento nos índices hepático, intestinal e esplênico, enquanto que a enzima sPLA<sub>2</sub>gV regula individualmente os índices nesses órgãos.

Com o objetivo de analisar o quadro de hepatoesplenomegalia característico da infecção, avaliamos possíveis alterações macroscópicas nesses órgãos (fígado, baço e intestino). Após 55 dias da infecção, foram realizadas as pesagens do fígado, baço e intestino de camundongos C57BL/6 WT e *Pla2g5*<sup>-/-</sup> não infectados e infectados por *S. mansoni*. O peso dos órgãos foi correlacionado com o peso corporal, para a obtenção do índice hepático, esplênico e intestinal. Com base nesses dados, foi possível observar que camundongos C57BL/6 infectados, WT ou *Pla2g5*<sup>-/-</sup>, apresentaram aumento no índice hepático, intestinal e esplênico (Figura 7 A e B) quando comparados com os animais não infectados. Esse resultado indica um quadro de hepatomegalia e esplenomegalia, nos animais da cepa C57BL/6. Esses parâmetros são características clássicas da infecção por *S. mansoni*. Na figura 7B também é interessante observar alterações na coloração do fígado de camundongos C57BL/6 infectados WT ou *Pla2g5*<sup>-/-</sup>, devido à deposição de ovos do parasita nesse tecido. É importante notar que a ausência da enzima não parece modificar as alterações no índice hepático, aumenta o índice intestinal e diminui o esplênico, indicando potencial impacto da enzima sobre a população linfocitária dos animais infectados (Figura 7A).



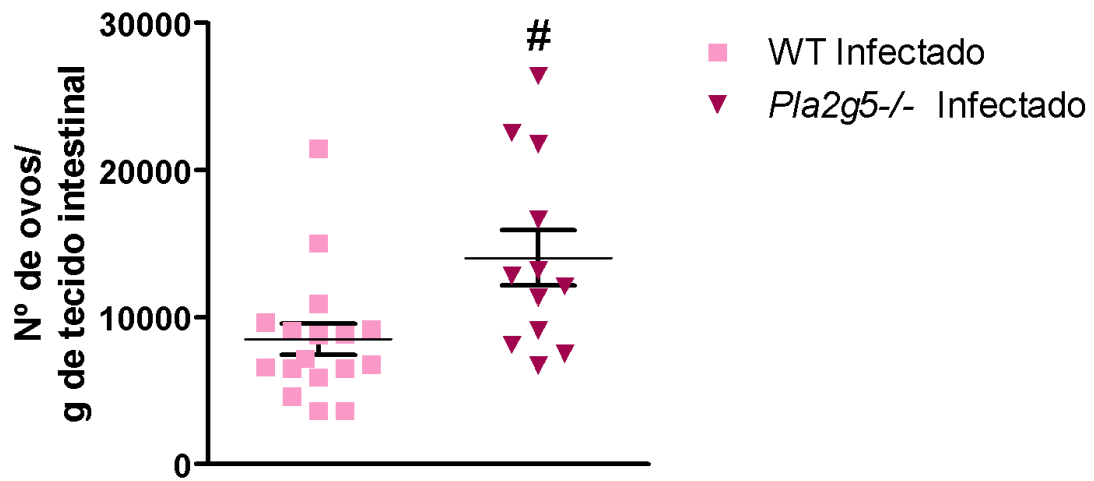


**Figura7: A infecção por *S. mansoni* induz aumento nos índices hepático, intestinal e esplênico, enquanto que a enzima sPLA<sub>2</sub>gV regula individualmente os índices nesses órgãos.** (A) O índice hepático, esplênico e intestinal foi feito correlacionando o peso do fígado, baço, ou intestino e massa corporal de camundongos C57BL/6 não infectados ou infectados por *S. mansoni*. (B) Visualização macroscópica das alterações do fígado, baço e intestino de camundongos C57BL/6 não infectados ou infectados por *S. mansoni*. Os valores foram representados como média  $\pm$  EPM. +  $p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo WT não infectado por *S. mansoni*. #  $p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo WT infectado por *S. mansoni*.

## 5.2. A sPLA<sub>2</sub>gV protege regula a liberação de ovos no intestino de camundongos C57BL/6 machos infectados com *S. mansoni*.

Com o objetivo de verificar o por quê das alterações nos índices hepático e intestinal, avaliamos a carga parasitária nos camundongos C57BL/6 infectados. Foi realizada a quantificação de ovos de *S. mansoni* no intestino, após digestão tecidual. Com isso foi observado aumento no número de ovos do parasito em animais *Pla2g5*<sup>-/-</sup> infectados quando comparados com animais WT infectados. Os grupos não infectados também foram analisados e não apresentaram ovos no intestino (Figura 8).

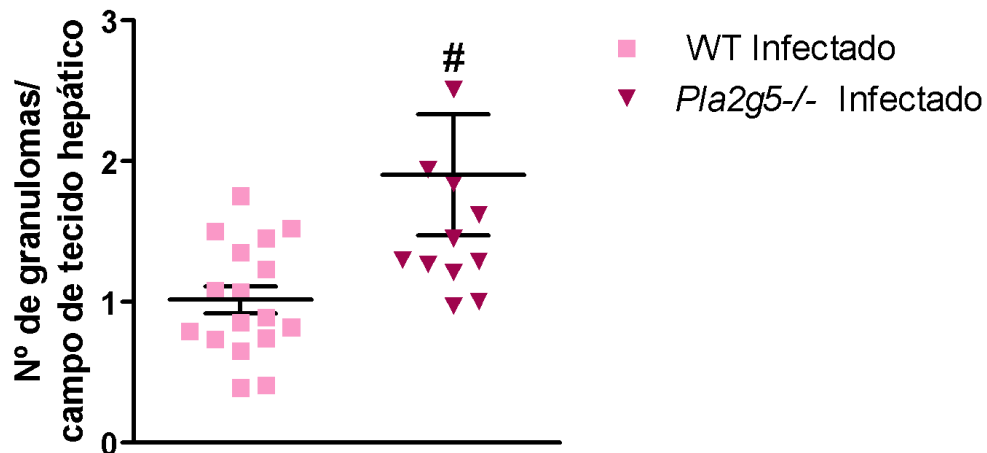




**Figura 8:** A sPLA2gV regula a liberação de ovos no intestino de camundongos C57BL/6 machos infectados com *S. mansoni*. Os gráficos representam o número de ovos de *S. mansoni*, no tecido intestinal e nas fezes de camundongos C57BL/6 WT ou *Pla2g5*<sup>-/-</sup> infectados. (A) Os animais foram eutanasiados 55 após a infecção e seus intestinos foram digeridos por uma solução de KOH 4% como descrito por Cheever (1968). Os valores foram representados como média ± EPM. Onde #  $p < 0,05$  com relação ao grupo C57BL/6 WT Infectado.

### 5.3. A sPLA2gV controla a formação de granulomas hepáticos ao redor dos ovos de *S. mansoni*.

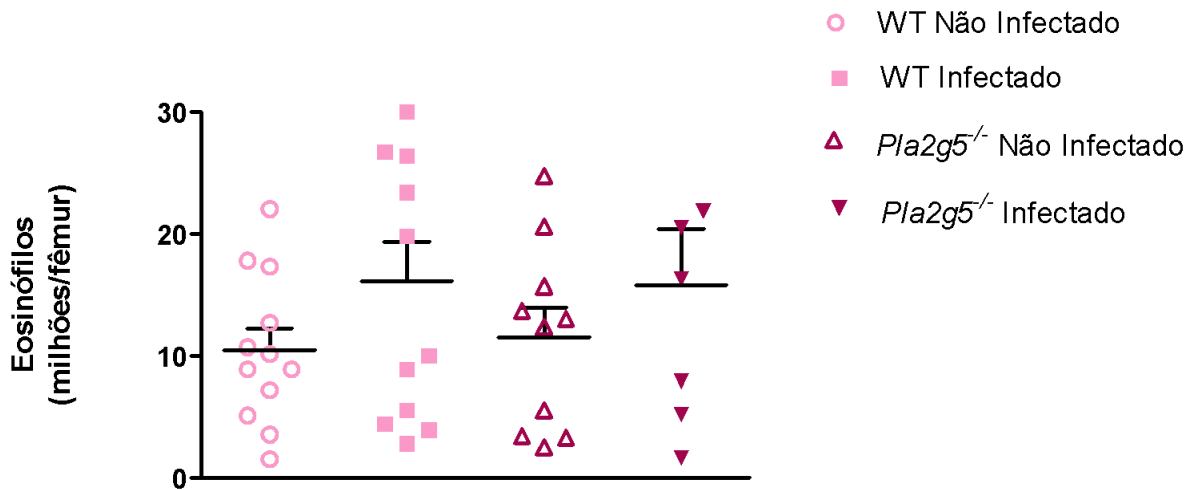
Foi de nosso interesse também ver a carga parasitária no fígado, através da contagem de granulomas hepáticos por campo. Foi possível observar que camundongos C57BL/6 *Pla2g5*<sup>-/-</sup> infectados mostraram um aumento no número de reações granulomatosas contendo ovos de *S. mansoni* presentes no fígado quando comparamos com animais WT infectados (Figura 9), assim como observado na quantificação de ovos no intestino (Figura 8). Os grupos não infectados foram analisados e não apresentaram granulomas esquistossomóticos no fígado.



**Figura 9:** A sPLA<sub>2</sub>gV protege contra a formação de granulomas hepáticos ao redor dos ovos de *S. mansoni*. O gráfico representa a contagem de granulomas com ovos de *S. mansoni* por campo tecido hepático de camundongos C57BL/6. Os cortes histológicos foram corados com corante Hematoxilina eosina (HE), de forma que se pode observar o granuloma com o ovo do parasita em seu interior. Os valores foram representados como média ± EPM, sendo #  $p < 0.05$  com relação ao grupo C57BL/6 WT Infectado.

#### 5.4. A sPLA<sub>2</sub>gV não parece influenciar no número de eosinófilos presentes na medula óssea 55 dias após a infecção por *S. mansoni*.

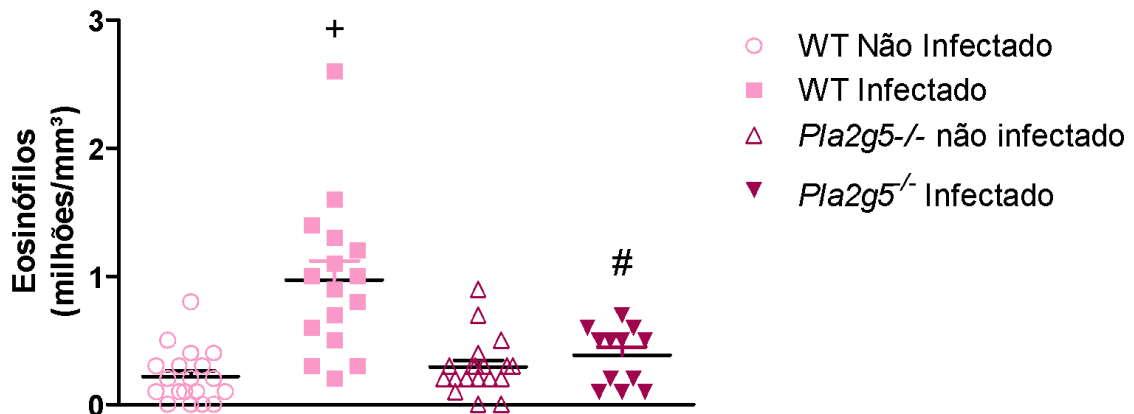
Para avaliar a segunda parte dos nossos objetivos, avaliamos se a enzima sPLA<sub>2</sub>gV seria capaz de regular a eosinofilia nos principais sítios de resposta imune contra a infecção (medula, corrente sanguínea e cavidade peritoneal). Para isso, os animais C57BL/6 WT ou *Pla2g5*<sup>-/-</sup> infectados por *S. mansoni* foram eutanasiados no dia 55 após infecção, e neste dia foi feito lavado medular para avaliação da celularidade na medula desses camundongos. Muito embora a eosinofilia medular corresponda a uma característica clássica da infecção por *S. mansoni*, no tempo de infecção avaliado foi possível observar apenas um discreto aumento não significativo no número de eosinófilos medulares nos camundongos WT infectados em comparação aos animais não infectados (Figura 10). A ausência da enzima nos animais *Pla2g5*<sup>-/-</sup> não pareceu afetar o número de eosinófilos presentes na medula dos camundongos neste tempo analisado, quando comparados aos WT.



**Figura 10:** A sPLA<sub>2gV</sub> não parece influenciar no número de eosinófilos presentes na medula óssea 55 dias após a infecção por *S. mansoni*. A avaliação da eosinofilia foi feita após 55 dias de infecção, a partir do lavado medular dos camundongos. A quantificação foi feita por contagem diferencial de lâminas coradas com corante Panótico. Foram contadas 100 células por lâmina, diferenciando eosinófilos, mononucleares e neutrófilos. Os valores foram representados como média ± EPM.

### 5.5. A sPLA<sub>2gV</sub> controla o número de eosinófilos presentes no sangue de camundongos infectados por *S. mansoni*.

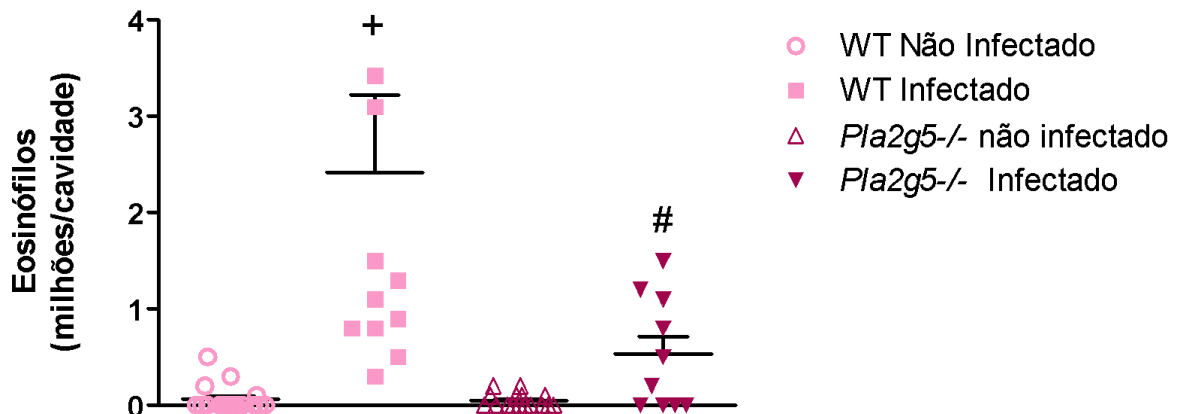
Avaliamos também a quantidade de eosinófilos presentes no sangue de camundongos infectados por *S. mansoni*. Para isso, os leucócitos sanguíneos foram analisados 55 dias após a infecção por *S. mansoni*. Como observado na Figura 11, a infecção por *S. mansoni* induziu eosinofilia sanguínea no tempo de 55 dias de infecção em animais WT. Já os animais *Pla2g5*<sup>-/-</sup> infectados com *S. mansoni* mostram números de eosinófilos circulantes significativamente menores do que aqueles encontrados em animais WT infectados.



**Figura 11: A sPLA2gV controla o número de eosinófilos presentes no sangue de camundongos infectados por *S. mansoni*.** A eosinofilia sanguínea foi avaliada no 55º dia de infecção através da retirada do sangue da cauda dos animais. A quantificação foi feita por contagem diferencial de lâminas coradas com corante Panótico. Foram contadas 100 células por lâmina, diferenciando eosinófilos, mononucleares e neutrófilos. Os valores foram representados como média  $\pm$  EPM. +  $p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo WT não infectado por *S. mansoni*. #  $p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo WT infectado por *S. mansoni*.

### 5.6 A sPLA2gV controla o número de eosinófilos presentes na cavidade peritoneal de camundongos infectados por *S. mansoni*.

As células presentes na cavidade peritoneal também foram avaliadas para ver se o perfil observado no sangue se repetia. Para isso, as células do lavado peritoneal foram quantificadas 55 dias após a infecção por *S. mansoni*. Camundongos C57BL/6 WT e *Pla2g5*<sup>-/-</sup> infectados apresentaram aumento no número de leucócitos totais do lavado peritoneal quando comparados com animais C57Black/6 WT e *Pla2g5*<sup>-/-</sup> não infectados. Verificamos que este aumento da celularidade peritoneal foi devido em parte a um acúmulo de células mononucleares, migração de neutrófilos (dados não mostrados), mas principalmente de eosinófilos (Figura 12). Além disso, como observado na Figura 12, a eosinofilia peritoneal induzida pela infecção por *S. mansoni* em animais selvagens mostrou-se significativamente maior do que aquela encontrada na cavidade peritoneal de animais *Pla2g5*<sup>-/-</sup>.

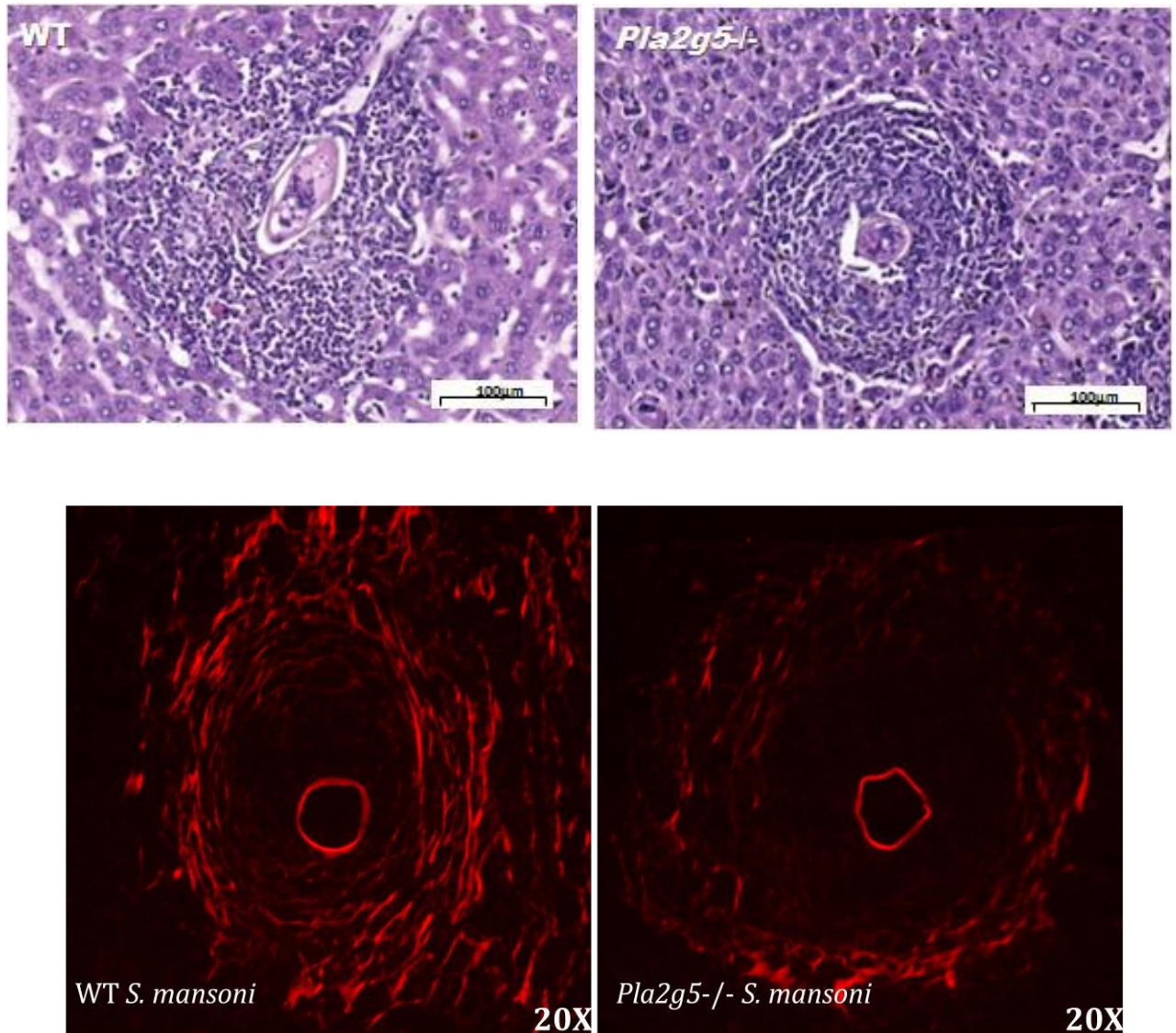


**Figura 12:** A sPLA2gV controla o número de eosinófilos presentes na cavidade peritoneal de camundongos infectados por *S. mansoni*. A avaliação da eosinofilia peritoneal foi feita a partir do lavado peritoneal dos animais eutanasiados no dia 55. A quantificação foi feita por contagem diferencial de lâminas coradas com corante Panótico. Foram contadas 100 células por lâmina. Os valores foram representados como média  $\pm$  EPM. +  $p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo WT não infectado por *S. mansoni*. #  $p < 0,05$  representa diferença significativa em relação ao grupo WT infectado.

### 5.7 A sPLA2gV controla o tamanho de granulomas hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni* e participa da indução de fibrose no granuloma hepático.

Os granulomas quantificados na figura 9 também foram avaliados qualitativamente por análises histológicas, das lâminas coradas com Hematoxilina-eosina e com Picrosirius-red, para se observar características morfológicas e na composição de fibras. Para isso, as lâminas de tecido hepático coradas com Hematoxilina-eosina foram escaneadas em microscópio Panoramic Midi (3DHitech), onde foi possível fotografar os granulomas em volta de ovos de *S. mansoni*. Como ilustrado nas imagens da Figura 13A, for possível observar que os granulomas de camundongos C57BL/6 *Pla2g5<sup>-/-</sup>* infectados por *S. mansoni* apresentam área significativamente menor do que aqueles granulomas encontrados no fígado dos animais que expressam a enzima ( $0,9 \pm 0,1$  versus  $0,7 \pm 0,1 \times 10^5 \mu\text{m}^2/\text{granuloma}$ ; média  $\pm$  EPM, WT infectado versus *Pla2g5<sup>-/-</sup>* infectado, respectivamente). A análise morfológica das imagens revela também que os granulomas hepáticos encontrados nos animais *Pla2g5<sup>-/-</sup>* infectados apresentam um menor número de células totais em comparação ao granuloma de camundongos C57BL/6 WT (Figura 13A). Além disso, a análise do tecido hepático corados

com Picosirius-red também revelou um conteúdo menor de fibras colágenas presentes nos granulomas em volta de ovos de *S. mansoni* em animais *Pla2g5<sup>-/-</sup>* infectados quando comparados com os granulomas de animais WT infectados (Figura 13B).



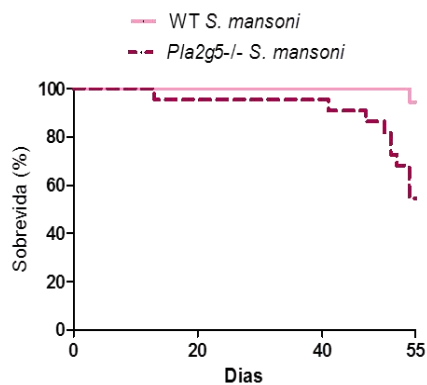
**Figura 13:** A sPLA2gV controla o tamanho de granulomas hepáticos de camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni* e participa da indução de fibrose no granuloma hepático. Imagens representativas das diferenças morfológicas de granulomas hepáticos de camundongos C57BL/6 *Pla2g5<sup>-/-</sup>* e WT ambos infectados por *S. mansoni*. (A) Lâmina de corte histológico corada com HE, escaneada e fotografada com auxílio de microscópio Panoramic Midi. (B) Cortes histológicos hepáticos corados por coloração de Picosirius-red modificada, analisadas em microscópio confocal. Aumento 20X.

## 6. DISCUSSÃO

As PLA<sub>2</sub>s integram uma família de enzimas que tem importantes funções em contextos imunológicos e inflamatórios. Enquanto a PLA<sub>2</sub> citosólica (grupo IV) apresenta função primordial e bem estabelecida na síntese de eicosanoides (Diaz e Arm, 2003; Leslie, C., 2015), uma análise cuidadosa da literatura nos mostrou que, de forma distinta à cPLA<sub>2</sub>, a sPLA<sub>2</sub>gV parece ter seu papel funcional mais voltado para a regulação do estabelecimento da resposta imune do tipo 2 (Giannattasio *et. al*, 2010; . Munoz *et. al*, 2007; Henderson *et. al*, 2013; Sato H. *et. al*, 2014; Yamaguchi *et al.*, 2018). Entretanto, nenhum estudo feito até agora avaliou de forma direta a hipótese de que a sPLA<sub>2</sub>gV atua como um fator regulador da resposta imune do tipo 2. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estudar o papel imunoregulatório da sPLA<sub>2</sub>gV usando modelo de infecção experimental por *S. mansoni* que é caracterizado por intensa resposta imune do tipo 2, analisando parâmetros parasitológicos e de eosinofilia sistêmica em camundongos que expressam ou são deficientes para a enzima. A análise da eosinofilia sistêmica foi empregada como parâmetro marcador deste tipo de resposta imune durante a infecção por *S. mansoni*, visto que é um aspecto clássico da imunidade tipo 2 rica em citocinas como IL-4, IL-13, e relevante para o estudo, IL-5. Confirmando nossa hipótese, a ausência da enzima nos animais deficientes para sPLA<sub>2</sub>gV determinou um parasitismo mais robusto enquanto promoveu estabelecimento de resposta eosinofílica bastante discreta quando comparados aos animais que expressam a enzima, indicando que esta enzima é importante para a resposta imune do tipo 2 e, dessa forma, controla o parasitismo por *S. mansoni*.

O estudo dos aspectos parasitológicos da infecção por *S. mansoni*, realizado aqui empregando como estratégia experimental animais deficientes para sPLA<sub>2</sub>gV, revelou importante papel regulador desta enzima no mecanismo do hospedeiro de controlar a disseminação do parasita em modelo experimental murino. Animais *Pla<sub>2</sub>g5<sup>-/-</sup>* infectados apresentaram, em relação aos WT, número superior de ovos de *S. mansoni* presentes no intestino e fígado (com presença de granulomas hepáticos). Estes granulomas, por sua vez, se mostraram menores em camundongos *Pla<sub>2</sub>g5<sup>-/-</sup>* infectados em comparação com aqueles dos animais WT infectados. Ao analisarmos estes dados e as imagens dos granulomas hepáticos, postulamos que esta diminuição de área granulomatosa circundando os ovos esquistossomóticos aprisionados no tecido hepático nos animais deficientes para a enzima, parece estar relacionada tanto a um menor número de células totais (provavelmente devido

**Quadro Complementar 1: A sPLA<sub>2</sub>gV protege contra letalidade induzida pela infecção por *S. mansoni* em camundongos C57BL/6.**



O gráfico representa o percentual de sobrevivência de animais camundongos C57BL/6 WT e PLA<sub>2</sub>gV<sup>-/-</sup> infectados por *S. mansoni*. Os animais foram acompanhados por 55 dias após a infecção e o percentual de sobrevivência foi avaliado. N= 18;22, respectivamente.

(Adaptado de Tese de Doutorado de Camila Pão, 2018).

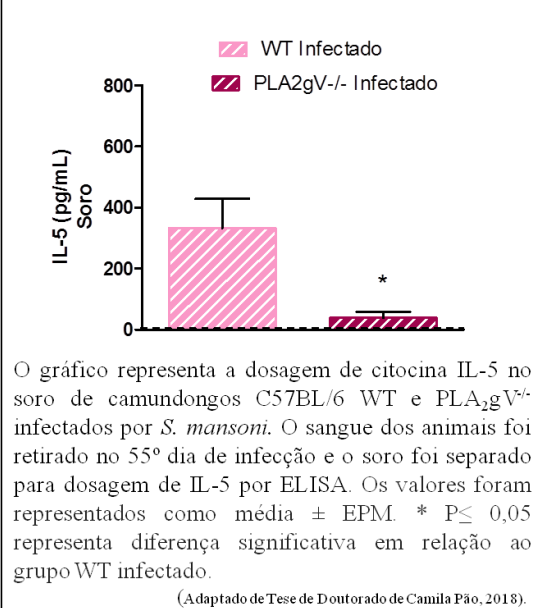
principalmente a um menor número de eosinófilos no granuloma; ver abaixo) quanto à redução da fibrose característica destes granulomas. Análises quantitativas da celularidade e de fibras colágenas serão realizadas para investigarmos esta teoria. Este controle mediado pela enzima sobre os aspectos parasitológicos da infecção esquistossomótica corrobora dados da Tese de Doutorado da aluna Camila Pão (2018; em preparação) em relação à mortalidade de camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni*. Foi possível observar que o percentual de sobrevivência em camundongos *Pla2g5*<sup>-/-</sup> infectados é menor do que a encontrada para os camundongos WT infectados (54,5% e 94,4%, respectivamente; (**Quadro Complementar 1**). Assim sendo, os dados em conjunto revelam que a sPLA<sub>2</sub>gV apresenta papel protetor contra o parasita *S. mansoni*, conferindo resistência à infecção.

Na busca pelo mecanismo envolvido na proteção do hospedeiro contra a infecção por *S. mansoni* promovido pela enzima sPLA<sub>2</sub>gV, investigamos a potencial ação da enzima como molécula promotora do estabelecimento da resposta imune do tipo 2. Este tipo de resposta, caracterizada por níveis aumentados de linfócitos Th2, macrófagos alternativamente ativados (M2) e citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13, é reconhecidamente responsável por conferir resistência frente à infecção por *S. mansoni* (Oeser, Schwartz e Voehringer, 2014). Como estratégia de análise da presença de resposta tipo 2, avaliamos a eosinofilia sistêmica presente neste tipo de infecção, visto que esta funciona como excelente marcadora do estabelecimento deste tipo de resposta imune. Muito embora eosinófilos não tenham, como se postulou no passado, uma função protetora contra este parasita (Swartz *et.al*; 2006), a indução de eosinofilia sistêmica é um componente clássico da infecção por *S. mansoni*, sendo empregado como marcador desta condição (Basten *et. al*; 1970).



Encontra-se bem estabelecido que os níveis aumentados de eosinófilos são determinados em função de resposta imunológica do tipo 2 robusta observada durante infecção parasitária por helmintos como a induzida por *S. mansoni*, principalmente devido à ação específica da citocina IL-5. A IL-5 é o principal fator eosinopoiético na medula óssea, pois controla sua diferenciação medular, bem como faz a manutenção da eosinofilia sistêmica por aumentar a sobrevivência destas células nos diferentes tecidos nos quais esta célula se acumula (Akutsu *et.al*, 1995). Nossos dados indicam que a ausência da sPLA<sub>2</sub>gV provoca redução do número de eosinófilos na circulação sanguínea e na cavidade peritoneal, indicando o envolvimento da enzima no estabelecimento/manutenção da eosinofilia sistêmica induzida pela infecção. Aqui vale ressaltar que, para o intervalo de tempo analisado (55 dias de infecção), não detectamos a eosinofilia medular característica desta infecção mesmo em animais que expressam a enzima. Podemos especular que a falta de eosinofilia medular detectável em animais com óbvia infecção em curso possa ser devido à dinâmica dos processos de produção/mobilização/migração/sobrevivência dos eosinófilos durante a infecção. Para o tempo analisado, os eosinófilos que foram produzidos na medula durante a infecção, podem estar sendo rapidamente mobilizados para a circulação, onde encontram-se apenas de passagem para atingir sítios como a cavidade peritoneal e granulomas hepáticos. A avaliação da eosinofilia nos granulomas hepáticos ainda se faz necessária. Similar ao observado para os compartimentos sanguíneo e peritoneal, supomos que também no granuloma hepático a população de eosinófilos seja menor em animais deficientes para a enzima, visto que os eosinófilos são as células reconhecidamente mais abundantes nos granulomas hepáticos e estes apresentam áreas menores nos animais que não expressam a enzima. Naturalmente análises específicas para detecção e quantificação de eosinófilos presentes no granuloma precisam ainda ser realizadas, e para tal empregaremos coloração modificada de Sirius Red e/ou imunomarcação para Siglec-F. Mais ainda, sabendo-se que a eosinofilia esquistossomótica é completamente dependente do estabelecimento da resposta imune do tipo 2, nossos dados indicam que a enzima sPLA<sub>2</sub>gV exibe potencial papel regulador para estabelecimento desta resposta, sabidamente caracterizada por níveis elevados de IL-5, por exemplo.

**Quadro Complementar 2: sPLA<sub>2</sub>gV participa da produção de IL-5 durante infecção por *S. mansoni* em camundongos C57Bl/6.**



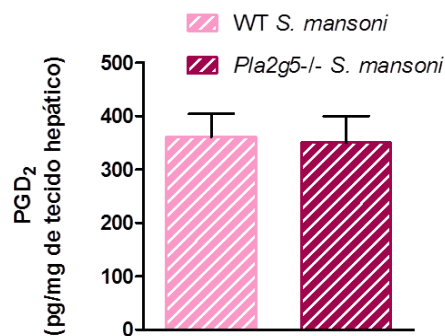
para a enzima pode ser explicado pela ausência da citocina IL-5 nesses animais, visto que é sabido que a IL-5 é fundamental para o estabelecimento da fibrose granulomatosa esquistossomótica (Akutsu *et. al*, 1995).

Outro possível mecanismo que poderíamos postular estar envolvido tanto no estabelecimento da resposta imune do tipo 2 (evidenciado pela análise da eosinofilia) quanto na consequente resistência à infecção por *S. mansoni* promovidos pela enzima sPLA<sub>2</sub>gV seria a atividade enzimática da sPLA<sub>2</sub>gV como fornecedora de ácido araquidônico para a geração de lipídios biologicamente ativos, como os eicosanoides. Leucotrienos e prostanoídes são moléculas que parecem ter algum papel na fisiopatologia esquistossomótica (Secor *et al.*, 1998) (Bellas e colaboradores; manuscrito em preparação). Entretanto, dados do grupo (Camila Pão e colaboradores, 2018; tese em preparação), demonstram que a sPLA<sub>2</sub>gV não parece atuar como fornecedora de ácido araquidônico durante a infecção por *S. mansoni*, visto que animais WT e *Pla2g5*<sup>-/-</sup> produziram quantidades equivalentes de PGD<sub>2</sub> no tecido hepático em resposta à infecção esquistossomótica (**Quadro Complementar 3**).

Em conformidade com nossos dados e hipótese, Camila Pão e colaboradores (2018; tese de doutorado em preparação) demonstraram que os níveis de IL-5 na circulação (**Quadro Complementar 2**) e na cavidade peritoneal (não mostrado) de camundongos *Pla2g5*<sup>-/-</sup> infectados por *S. mansoni* são inferiores àqueles encontrados em animais que expressam a enzima, confirmando que a sPLA<sub>2</sub>gV é de fato fundamental para o estabelecimento da resposta imune do tipo 2. Aqui vale ainda destacar que, o conteúdo discreto de fibras colágenas encontrado nos granulomas hepáticos dos animais deficientes

É relevante mencionar que a  $PGD_2$  é um importante fator indutor da instalação das eosinofílias peritoneais e de granuloma hepático durante a infecção por *S. mansoni* (Bellas e colaboradores, em preparação). Ao apreciarmos em conjunto que no animal deficiente para a enzima observa-se níveis normais de  $PGD_2$  em paralelo a um comprometimento da capacidade de estabelecer uma resposta imune do tipo 2 (eosinofilia sistêmica discreta e baixos níveis de IL-5), pode-se concluir que a enzima sPLA<sub>2</sub>gV confere proteção contra à infecção por *S. mansoni* (controla parasitismo, disfunção hepática, e subsequente letalidade) por mecanismo que independe da síntese de eicosanoides enquanto envolve indução da resposta imune efetora do tipo 2.

**Quadro Complementar 3: A sPLA<sub>2</sub>gV não participa da cascata enzimática de síntese de  $PGD_2$  durante infecção por *S. mansoni*.**



Os gráficos representam a quantidade de  $PGD_2$  no tecido hepático de camundongos C57BL/6 WT e  $PLA_2gV^{-/-}$  infectados por *S. mansoni*. A dosagem de  $PGD_2$  foi feita por EIA, a partir do sobrenadante do macerado de fígado. Os valores foram representados como média  $\pm$  EPM.

(Adaptado de Tese de Doutorado de Camila Pão, 2018).

## 7. CONCLUSÃO

Tomados em conjunto, nossos dados indicam que a enzima sPLA<sub>2</sub>gV tem papel protetor frente à infecção por *S. mansoni*, por controlar o parasitismo e a disfunção hepática e por controlar a eosinofilia sistêmica, é possível inferir que ela tenha papel no estabelecimento da resposta imunológica do tipo 2 durante a infecção por *S. mansoni*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbas, A.K., Murphy, K.M. e Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383, 787.
- Abou-El-Naga, I.F. (2018). Towards elimination of schistosomiasis after 5000 years of endemicity in Egypt. *Acta Tropica*, 181, 112-121.
- Akutsu, I., Kojima, T., Kariyone, A., Fukuda, T., Makino, S., e Takatsu, K. (1995). Antibody against interleukin-5 prevents antigen-induced eosinophil infiltration and bronchial hyperreactivity in the guinea pig airways. *Immunology letters*, 45(1-2), 109-116.
- Balboa, M.A., Balsinde, J., Winstead, M.V., Tischfield, J.A. e 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.
- Balestrieri, B. e Arm, J.P. (2006). Group V sPLA2: classical and novel functions. *Biochimica et biophysica Acta*, 1761, 1280-1288.
- Basten, A., Boyer, M. H., e Beeson, P. B. (1970). Mechanism of eosinophilia: I. Factors affecting the eosinophil response of rats to *Trichinella spiralis*. *Journal of Experimental Medicine*, 131(6), 1271-1287.
- Bergquist, R. e Whittaker, M. (2012). Control of neglected tropical diseases in Asia Pacific: implications for health information priorities. *Infectious Diseases of Poverty*, 1, 3.
- Bingham, C.O., Fijneman, R.J.A., Friend, D.S., Goddeau, R.P., Rogers, R.A., Austen, K.F. e Arm, J.P. (1999). Low Molecular Weight Group IIA and Group V Phospholipase A2 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 A<sub>2</sub> immune complex-mediated arthritis. *EMBO Molecular Medicine*, 2, 172-187.
- Boros, D.L. (1989). Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2, 250-269.
- Boros, D. L., Pelley, R. P., & Warren, K. S. (1975). Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni. *The Journal of Immunology*, 114(5), 1437-1441.
- Botros, S.S. e Bennett, J.L. (2007). Praziquantel resistance. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2, S35-S40.
- Capron A. e Dessaint, J.P. (1992). Immunologic Aspects of Schistosomiasis. *Annual Review of Medicine*, 43, 209-218.
- Chen, J., Engle, S. J., Seilhamer, J. J., e Tischfield, J. A. (1994). Cloning, expression and partial characterization of a novel rat phospholipase A2. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 1215(1-2), 115-120.
- Da Paz, V.R.F., Sequeira, D. e Pyrrho, A. (2017). Infection by *Schistosoma mansoni* during pregnancy: Effects on offspring immunity. *Life Sciences*, 185, 46-52.
- 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. e 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.
- Dennis, E.A., Rhee, S.G., Billah, M.M. e Hannun, Y.A. (1991). Role of phospholipase in generating lipid second messengers in signal transduction. *The FASEB Journal*, 5, 2068-2077.
- Diaz, B. L., Satake, Y., Kikawada, E., Balestrieri, B., e Arm, J. P. (2006). Group V secretory phospholipase A 2 amplifies the induction of cyclooxygenase 2 and delayed prostaglandin D 2 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(12), 1489-1497.
- Diaz, B. L., e Arm, J. P. (2003). Phospholipase A2. Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids, 69(2-3), 87-97.

- Doughty, B.L., Ottesen, E.A., Nash, T.E. e Phillips, S.M. (1984). Delayed hypersensitivity granuloma formation around *Schistosoma mansoni* eggs in vitro. III. Granuloma formation and modulation in human Schistosomiasis mansoni. *The Journal of Immunology*, 133, 993-997.
- Fallon, P.G. e Dunne, D.W. (1999). Tolerization of Mice to *Schistosoma mansoni* Egg Antigens Causes Elevated Type 1 and Diminished Type 2 Cytokine Responses and Increased Mortality in Acute Infection. *The Journal of Immunology*, 162, 4122-4132.
- Giannattasio, G., Fujioka, D., Xing, W., Katz, H.R., Boyce, J.A. e Balestrieri, B. (2010). Group V Secretory Phospholipase A<sub>2</sub> Reveals Its Role in House Dust Mite-Induced Allergic Pulmonary Inflammation by Regulation of Dendritic Cell Function. *The Journal of Immunology*, 185, 4430-4438.
- Gleich, G.J. e Adolphson, C.R. (1986). The Eosinophilic Leukocyte: Structure and Function. In: *Advances in Immunology*. F.J. Dixon, K.F. Austen, L.E. Hood e J.W. Uhr eds. (Academic Press), pp. 177-253).
- Gomes Casavechia, M.T., de Melo, G.d.A.N., Da Silva Fernandes, A.C.B., De Castro, K.R., Pedrosa, R.B., Da Silva Santos, T. e Teixeira, J.J.V. (2018). Systematic review and meta-analysis on *Schistosoma mansoni* infection prevalence, and associated risk factors in Brazil. *Parasitology*, 1-15.
- Gray, D.J., Ross, A.G., Li, Y.-S. e McManus, D.P. (2011). Diagnosis and management of schistosomiasis. *BMJ*, 342.
- Grevelding, C.G., Langner, S. e Dissous, C. (2018). Kinases: Molecular Stage Directors for Schistosome Development and Differentiation. *Trends in Parasitology*, 34, 246-260.
- Grogan, J. L., Kremsner, P. G., Deelder, A. M., e Yazdanbakhsh, M. (1998). The effect of anti- IL- 10 on proliferation and cytokine production in human schistosomiasis: fresh versus cryopreserved cells. *Parasite immunology*, 20(7), 345-349.
- Hams, E., Aviello, G. e Fallon, P. (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. e 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.
- Herbert, D.B.R., Hölscher, C., Mohrs, M., Arendse, B., Schwegmann, A., Radwanska, M., Leeto, M., Kirsch, R., Hall, P., Mossmann, H., Claussen, B., Förster, I. e Brombacher, F. (2004). Alternative Macrophage Activation Is Essential for Survival during Schistosomiasis and Downmodulates T Helper 1 Responses and Immunopathology. *Immunity*, 20, 623-635.
- Hirohito, K. (2011). Eosinophils: multifaceted biological properties and roles in health and disease. *Immunological Reviews*, 242, 161-177.
- Ho, I.-C., Arm, J.P., Bingham, C.O., Choi, A., Austen, K.F. e Glimcher, L.H. (2001). A Novel Group of Phospholipase A<sub>2</sub>s Preferentially Expressed in Type 2 Helper T Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 18321-18326.
- Hotez, P.J., Alvarado, M., Basáñez, M.-G., Bolliger, I., Bourne, R., Boussinesq, M., Brooker, S.J., Brown, A.S., Buckle, G., Budke, C.M., Carabin, H., Coffeng, L.E., Fèvre, E.M., Fürst, T., Halasa, Y.A., Jasrasaria, R., Johns, N.E., Keiser, J., King, C.H., Lozano, R., Murdoch, M.E., O'Hanlon, S., Pion, S.D.S., Pullan, R.L., Ramaiah, K.D., Roberts, T., Shepard, D.S., Smith, J.L., Stolk, W.A., Undurraga, E.A., Utzinger, J., Wang, M., Murray, C.J.L. e Naghavi, M. (2014). The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8, e2865.
- Huang, L., e Appleton, J. A. (2016). Eosinophils in helminth infection: defenders and dupes. *Trends in parasitology*, 32(10), 798-807.
- Ito, M., Ishikawa, Y., Kiguchi, H., Komiyama, K., Murakami, M., Kudo, I., Akasaka, Y. e Ishii, T. (2004). Distribution of type V secretory phospholipase A2 expression in human hepatocytes damaged by liver disease. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 19, 1140-1149.
- Jankovic, D., Cheever, A.W., Kullberg, M.C., Wynn, T.A., Yap, G., Caspar, P., Lewis, F.A., Clynes, R., Ravetch, J.V. e Sher, A. (1998). CD4<sup>+</sup> T Cell-mediated Granulomatous Pathology in Schistosomiasis Is Downregulated by a B Cell-dependent Mechanism Requiring Fc Receptor Signaling. *The Journal of Experimental Medicine*, 187, 619-629.

- Jannie, B., Ron, W., Rien, v.S. e Joost, R.E. (1981). The killing of newborn larvae of *Trichinella spiralis* by eosinophil peroxidase in vitro. *European Journal of Immunology*, 11, 843-845.
- Kikawada, E., Bonventre, J. V., e Arm, J. P. (2007). Group V secretory PLA2 regulates TLR2-dependent eicosanoid generation in mouse mast cells through amplification of ERK and cPLA2 $\alpha$  activation. *Blood*, 110(2), 561-567.
- Lambeau, G. e Gelb, M.H. (2008). Biochemistry and Physiology of Mammalian Secreted Phospholipases A2. *Annual Review of Biochemistry*, 77, 495-520.
- Lenzi, H. L., Jurberg, A. D., Coelho, P. M. Z. e Lenzi, J. A. (2008). Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Carvalho, O. S., Coelho, P.M. Z. e Lenzi, H. L., eds. (FIOCRUZ), pp.85-145.
- Lenzi, H.L., Sobral, A.C.L. e Lenzi, J.A. (1987). In vivo kinetics of eosinophils and mast cells in experimental murine Schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82, 67-76.
- Leslie, C. C. (2015). Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. *Journal of lipid research*.
- Maroun, B.K., Weimin, H., Hu, Z., Fred, E., Anne, S.L., P., B.A., Zemin, Y., A.L., B.S. e Daniel, F. (2010). Lipidomics era: Accomplishments and challenges. *Mass Spectrometry Reviews*, 29, 877-929.
- Masuda, S., Murakami, M., Mitsuishi, M., Komiyama, K., Ishikawa, Y., Ishii, T. E Kudo, I. (2005). Expression of secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes in lungs of humans with pneumonia and their potential prostaglandin-synthetic function in human lung-derived cells. *Biochemical Journal*, 387, 27-38.
- Ministério da Saúde (2016). Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde: volume 3, Esquistossomose, 578-589. Disponível em: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia\\_vigilancia\\_saude\\_led\\_atual.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_led_atual.pdf)
- Ministério da Saúde (2014). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância da Esquistossomose Mansoni: diretrizes técnicas. Disponível em: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia\\_esquistossome\\_mansoni\\_diretrizes\\_tecnicas.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/vigilancia_esquistossome_mansoni_diretrizes_tecnicas.pdf)
- Ministério da Saúde (2010). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso, Esquistossomose Mansônica, 172-175. Disponível em: [http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/doencas\\_infecciosas\\_parasitaria\\_gui\\_bolso.pdf](http://bvsm.sau.gov.br/bvs/publicacoes/doencas_infecciosas_parasitaria_gui_bolso.pdf)
- Miranda, G.S., Miranda, B.S., Rodrigues, J.G.M., Lira, M.G.S., Nogueira, R.A., Viegas-Melo, D. e Silva-Souza, N. (2017). Research Note. The wild water-rats and their relevance in the context of schistosomiasis mansoni in Brazil: what we know and recommendations for further research. 54, 165.
- Moore, D. L., Grove, D. I., e Warren, K. S. (1977). The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantitation of cell populations. *The Journal of pathology*, 121(1), 41-50.
- Muñoz, N.M., Meliton, A.Y., Arm, J.P., Bonventre, J.V., Cho, W. e Leff, A.R. (2007). Deletion of Secretory Group V Phospholipase A<sub>2</sub> Attenuates Cell Migration and Airway Hyperresponsiveness in Immunosensitized Mice. *The Journal of Immunology*, 179, 4800-4807.
- Murakami, M., Taketomi, Y., Miki, Y., Sato, H., Hirabayashi, T. e Yamamoto, K. (2011). Recent progress in phospholipase A2 research: From cells to animals to humans. *Progress in Lipid Research*, 50, 152-192.
- Makoto Murakami, Hiroyasu Sato, Yoshimi Miki, Kei Yamamoto, and Yoshitaka Taketomi (2015) Phospholipases: Central Role in Lipid Signaling and Disease: A new era of secreted phospholipase A2 *J. Lipid Res.* 2015 56:(7) 1248-1261.
- Ndlovu, H., Nono, J. K., Nieuwenhuizen, N. E., e Brombacher, F. (2018) IL- 4R $\alpha$ - expressing CD11c+ cells contribute to driving optimal cellular responses during *Schistosoma mansoni* infection in mice. *Journal of Leukocyte Biology*.
- Oeser, K., Schwartz, C., e Voehringer, D. (2015). Conditional IL-4/IL-13-deficient mice reveal a critical role of innate immune cells for protective immunity against gastrointestinal helminths. *Mucosal immunology*, 8(3), 672.

- OMS (2016). Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, Geneva, 2000-2015. Disponível em: [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/estimates/en/index1.html](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html)
- OMS (2018). Fact Sheet. Disponível em: <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>  
Acesso em: 19 de abril de 2018.
- OMS (2017). Weekly Epidemiological Record: Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: number of people treated in 2016, pp 749-760. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/259593/1/WER9249.pdf?ua=1>
- Pão, C.R.R. (2015). Papel da Fosfolipase A<sub>2</sub> gV na infecção por *S. mansoni*: impacto no balanço de citocinas Th1/Th2 e ativação eosinofílica. Projeto de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Pão, C. R. R. (2018). Papel da Fosfolipase A<sub>2</sub> grupo V na infecção por *Schistosoma mansoni*: impacto na resposta imune do tipo 2. Tese de doutorado (em preparação), Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Pearce, E.J. e MacDonald, A.S. (2002). The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology*, 2, 499.
- Rabello, A., Pontes, L.A., Enk, M. J., Montenegro, S.M.L, Morais, C.N.L.(2008). Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da Esquistossomose mansoni. In: *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Carvalho, O.S., Coelho, P.M.Z. e Lenzi, H.L., eds. (FIOCRUZ), pp.895-925.
- Rosenberg, H.F., Dyer, K.D. e Foster, P.S. (2012). Eosinophils: changing perspectives in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 13, 9.
- Ross, A.G.P., Bartley, P.B., Sleight, A.C., Olds, G.R., Li, Y., Williams, G.M. e McManus, D.P. (2002). Schistosomiasis. *New England Journal of Medicine*, 346, 1212-1220.
- Rumbley, C.A., Zekavat, S.A., Sugaya, H., Perrin, P.J., Ramadan, M.A. e Phillips, S.M. (1998). The Schistosome Granuloma: Characterization of Lymphocyte Migration, Activation, and Cytokine Production. *The Journal of Immunology*, 161, 4129-4137.
- Sabin, E.A., Kopf, M.A. e Pearce, E.J. (1996). *Schistosoma mansoni* egg-induced early IL-4 production is dependent upon IL-5 and eosinophils. *The Journal of Experimental Medicine*, 184, 1871-1878.
- Samuchiwal, S. K., e Balestrieri, B. (2018). 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*.
- Santos, I.B.C.d. (2015). Papel da prostaglandina D2 endógena murina na infecção por *Schistosoma mansoni*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 81f.
- Satake, Y., Diaz, B.L., Balestrieri, B., Lam, B.K., Kanaoka, Y., Grusby, M.J. e 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. e Ikeda, K. (2014). The adipocyte-inducible secreted phospholipases PLA2G5 and PLA2G2E play distinct roles in obesity. *Cell metabolism*, 20(1), 119-132.
- Savioli, L., Albonico, M., Colley, D.G., Correa-Oliveira, R., Fenwick, A., Green, W., Kabatereine, N., Kabore, A., Katz, N., Klohe, K., LoVerde, P.T., Rollinson, D., Stothard, J.R., Tchuem Tchuente, L.-A., Waltz, J. e Zhou, X.-N. (2017). Building a global schistosomiasis alliance: an opportunity to join forces to fight inequality and rural poverty. *Infectious Diseases of Poverty*, 6, 65.
- Schneeberger, P.H.H., Coulibaly, J.T., Panic, G., Daubenberger, C., Gueuning, M., Frey, J.E. e Keiser, J. (2018). Investigations on the interplays between *Schistosoma mansoni*, praziquantel and the gut microbiome. *Parasites & Vectors*, 11, 168.
- Scholz, T. e Ditrich, O. (2002). Schistosomes. In: *Worms and Human Disease*. Muller, R. e Wakelin, D. eds (CABi), pp-9-17.
- Schramm, G., Mohrs, K., Wodrich, M., Doenhoff, M.J., Pearce, E.J., Haas, H. e Mohrs, M. (2007). Cutting Edge: IPSE/alpha-1, a Glycoprotein from *Schistosoma mansoni* Eggs, Induces IgE-Dependent,



- Antigen-Independent IL-4 Production by Murine Basophils In Vivo. *The Journal of Immunology*, 178, 6023-6027.
- Schwartz, C., Oeser, K., da Costa, C. P., Layland, L. E., e Voehringer, D. (2014). T Cell-Derived IL-4/IL-13 Protects Mice against Fatal *Schistosoma mansoni* Infection Independently of Basophils. *The Journal of Immunology*, 1401155.
- Shamri, R., Xenakis, J.J. e Spencer, L.A. (2011). Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell and Tissue Research*, 343, 57-83.
- Swartz, J. M., Dyer, K. D., Cheever, A. W., Ramalingam, T., Pesnicak, L., Domachowske, J. B. e Rosenberg, H. F. (2006). *Schistosoma mansoni* infection in eosinophil lineage-ablated mice. *Blood*, 108(7), 2420-2427.
- Thomas, G., Bertrand, F. e Saunier, B. (2000). The Differential Regulation of Group IIA and Group V Low Molecular Weight Phospholipases A2 in Cultured Rat Astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 10876-10886.
- van der Kleij, D., Latz, E., Brouwers, J.F.H.M., Kruize, Y.C.M., Schmitz, M., Kurt-Jones, E.A., Espevik, T., de Jong, E.C., Kapsenberg, M.L., Golenbock, D.T., Tielens, A.G.M. e Yazdanbakhsh, M. (2002). A Novel Host-Parasite Lipid Cross-talk: Schistosomal Lyso-Phosphatidylserine Activates Toll-Like Receptor 2 And Affects Immune Polarization. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 48122-48129.
- Vitorino, R.R., Souza, F.P.C.d., Costa, A.d.P., Faria Júnior, F.C.d., Santana, L.A. e Gomes, A.P. (2012). Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. *Rev. Soc. Bras. Clín. Méd.*, 10.
- Webb, L. M., e Wojno, E. D. T. (2017). The role of rare innate immune cells in Type 2 immune activation against parasitic helminths. *Parasitology*, 144(10), 1288-1301.
- Weerakoon, K.G. e McManus, D.P. (2016). Cell-Free DNA as a Diagnostic Tool for Human Parasitic Infections. *Trends in Parasitology*, 32, 378-391.
- Weller, P.F., Rand, T.H., Barrett, T., Elovic, A., Wong, D.T. e Finberg, R.W. (1993). Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR-dependent, MHC-restricted antigen-presentation and IL-1 alpha expression. *The Journal of Immunology*, 150, 2554-2562.
- Wilson, M. S., Mentink- Kane, M. M., Pesce, J. T., Ramalingam, T. R., Thompson, R., e Wynn, T. A. (2007). Immunopathology of schistosomiasis. *Immunology and cell biology*, 85(2), 148-154.
- Wynn, T. A., Thompson, R. W., Cheever, A. W., e Mentink- Kane, M. M. (2004). Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunological reviews*, 201(1), 156-167.
- Xiong, S., Guo, R., Yang, Z., Xu, L., Du, L., Li, R., e Pan, X. (2015). Treg depletion attenuates irradiation-induced pulmonary fibrosis by reducing fibrocyte accumulation, inducing Th17 response, and shifting IFN- $\gamma$ , IL-12/IL-4, IL-5 balance. *Immunobiology*, 220(11), 1284-1291.