

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

**ESTUDO COMPARATIVO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA NO
RESERVATÓRIO SILVESTRE *NECTOMYS SQUAMIPES* NATURALMENTE
INFECTADO E NO MODELO EXPERIMENTAL CAMUNDONGO SWISS:
ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E ULTRAESTRUTURAIIS.**

Kátia Batista do Amaral

JUIZ DE FORA

2015

Universidade Federal de Juiz de Fora
Programa de Pós-Graduação em Ecologia

**ESTUDO COMPARATIVO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA NO
RESERVATÓRIO SILVESTRE *NECTOMYS SQUAMIPES* NATURALMENTE
INFECTADO E NO MODELO EXPERIMENTAL CAMUNDONGO SWISS:
ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E ULTRAESTRUTURAIIS.**

Kátia Batista do Amaral

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ecologia Aplicada à Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rossana Correa Netto de Melo

JUIZ DE FORA

2015

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Amaral, Kátia Batista do.

Estudo comparativo da esquistossomose mansônica no reservatório silvestre *Nectomys squamipes* naturalmente infectado e no modelo experimental camundongo Swiss: análises histopatológicas, bioquímicas e ultraestruturais / Kátia Batista do Amaral. -- 2015.
254 f. : il.

Orientadora: Rossana Correa Netto de Melo
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia, 2015.

1. Esquistossomose mansônica. 2. *Nectomys squamipes*. 3. Análises histológicas. 4. Eosinófilos. 5. Corpúsculos lipídicos. I. Melo, Rossana Correa Netto de, orient. II. Título.

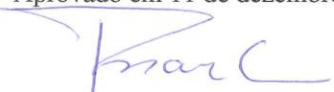
**“ ESTUDO COMPARATIVO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA NO
RESERVATÓRIO SILVESTRE NECTOMYS SQUAMIPES NATURALMENTE
INFECTADO E NO MODELO EXPERIMENTAL CAMUNDONGO SWISS:
ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS, BIOQUÍMICAS E ULTRAESTRUTURAIS.”**

KÁTIA BATISTA DO AMARAL

Orientadora: Dr.^a Rossana Corrêa Netto de Melo

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutora em Ecologia Aplicada ao Manejo e Conservação de Recursos Naturais.

Aprovado em 11 de dezembro de 2015.



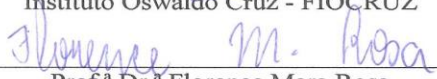
Prof.^a Dr.^a Rossana Corrêa Netto de Melo
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



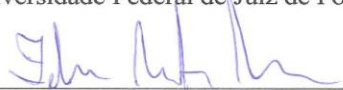
Prof. Dr. Hélio Chiarini Garcia
Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG



Prof. Dr. Arnaldo Maldonado Júnior
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ



Prof.^a Dr.^a Florence Mara Rosa
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF



Prof. Dr. Fabiano Matos Vieira
Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF

Dedico esta conquista aos meus amores,
José Nelson e Flávia.

Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas que já têm a forma do nosso corpo... e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia... e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado para sempre à margem de nós mesmos.

João Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela força e coragem durante esta caminhada.

Ao meu esposo José Nelson e à minha filha Flávia, pelo incentivo, ajuda, amor e compreensão.

Aos meus pais, Armando e Maria da Glória, pelas oportunidades oferecidas.

À Profa. Dra. Rossana Correa Netto de Melo, pela orientação e confiança em mim depositadas.

À Dra. Rosana Gentile e à equipe do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, por sua colaboração neste trabalho, auxílio e competência.

Ao Prof. Dr. Hélio Chiarini, pela ajuda na preparação das amostras para microscopia eletrônica.

À Dra. Mariana Ramos Almeida, pelo auxílio com as análises de Espectroscopia Raman.

À Profa. Dra. Florence Mara Rosa, pelo auxílio nas infecções experimentais.

À Profa. Dra. Débora Negrão, do Laboratório de Imunologia de Helminhos da UFMG, por ceder as cercarias de *Schistosoma mansoni* para as infecções experimentais.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Celular da UFJF, Aline, Daniel, Felipe, Gabriel, Juliana, Kennedy, Lívia Andressa, Lívia Teixeira e Vítor e às professoras Heloísa D'Ávila e Patrícia Elaine, pela amizade e carinho com que me receberam.

À aluna de Iniciação Científica, Kássia, por sua amizade e auxílio prestimoso durante a fase experimental.

Ao querido amigo, Thiago, pelo companheirismo, excelente convívio, incentivo e ajuda inestimável.

À querida amiga Kelly Absaid, pela ajuda e torcida sempre positiva.

Aos professores, funcionários e colegas do Curso de Pós Graduação em Ecologia da UFJF pela amizade, profissionalismo, cooperação e boa vontade em várias ocasiões.

Muito obrigada!

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Biologia Celular (LBC), do Departamento de Biologia, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Juiz de Fora, sob a orientação da Profa. Dra. Rossana Correa Netto de Melo, e com o financiamento das seguintes agências de fomento:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Também contou com o apoio e colaboração dos seguintes Laboratórios, Centros, Instituições e pesquisadores:

- Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios – IOC/FIOCRUZ/RJ – Dra. Rosana Gentile;
- Beth Israel Deaconess Medical Center/Harvard Medical School – Dr. Peter Weller e Dra. Ann May Dvorak;
- Laboratório de Nanoestruturas Plasmônicas/Departamento de Química (UFJF) – Dr. Gustavo Fernandes Souza Andrade e Dra. Mariana Ramos Almeida;
- Laboratório de Biologia Estrutural e Reprodução (LABER/UFMG) – Dr. Hélio Chiarini-Garcia;
- Laboratório de Imunofarmacologia/IOC/FIOCRUZ/RJ – Dra. Patrícia Torres Bozza;
- Laboratório de Parasitologia/UFJF – Dra. Florence Mara Rosa;
- Laboratório de Imunologia de Helmintos – ICB/UFMG – Dra. Deborah Negrão-Corrêa;
- Laboratório de Estudo e Função de proteínas/UFJF – Dra. Priscila Silva Grijó Farani;
- Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI/UFMG);
- Centro de Microscopia (UFMG).

RESUMO

O roedor *Nectomys squamipes*, também conhecido como rato d'água, é considerado o mais importante reservatório silvestre do parasito *Schistosoma mansoni* no Brasil, contribuindo para a epidemiologia da esquistossomose mansônica humana. Além disso, quando infectado, não apresenta sinais clínicos da doença, apresentando lesões teciduais extremamente brandas decorrentes da infecção. Parâmetros relacionados à infecção esquistossomótica em modelos murinos de infecção experimental já foram bem documentados; porém, em modelos de infecção natural, ainda são pouco conhecidos. A relação parasito-hospedeiro neste modelo de infecção natural é de grande relevância e motivou o desenvolvimento deste trabalho. Foi realizado estudo comparativo da esquistossomose mansônica em *N. squamipes* naturalmente infectado pelo parasito *S. mansoni* e no camundongo Swiss experimentalmente infectado, nas fases aguda e crônica da infecção, através de análises histopatológicas, bioquímicas e ultraestruturais, objetivando obter uma melhor compreensão de como o rato d'água lida com o parasitismo pelo *S. mansoni*. Foram realizadas análises de frequências e tipos de granulomas, suas áreas médias e do comprometimento tecidual dos órgãos alvos da infecção (fígado e intestinos), nos dois modelos experimentais. A participação dos eosinófilos durante a resposta inflamatória granulomatosa também foi avaliada, visto que estas células estão presentes em grandes números nos granulomas. Dosagens bioquímicas das transaminases hepáticas auxiliaram na avaliação do dano hepatocelular. Além disso, a influência da esteatose hepática neste modelo de infecção natural foi estudada, visto que seus efeitos não são conhecidos em animais silvestres. Assim, dosagens séricas de glicose, colesterol total e triglicerídeos foram importantes para avaliar o perfil glicêmico e lipídico dos animais estudados. Os tecidos hepáticos dos animais foram submetidos à espectroscopia Raman, para avaliar o grau de insaturação presente. Finalmente, análises ultraestruturais ajudaram a aprofundar o conhecimento sobre os papéis dos eosinófilos e dos corpúsculos lipídicos presentes nos hepatócitos nestes dois modelos de esquistossomose mansônica. Os resultados revelaram que *N. squamipes* apresentou excelente modulação das lesões teciduais no fígado, com baixo comprometimento tecidual neste órgão e uma reação granulomatosa mais exacerbada no intestino delgado, favorável à eliminação dos ovos do parasito nas fezes. Além disso, os níveis séricos das transaminases não se alteraram em decorrência da infecção neste roedor silvestre, ao contrário do que ocorreu no camundongo Swiss. *N. squamipes* infectados e não infectados apresentaram os maiores graus de insaturação presentes nos tecidos hepáticos. Características ultraestruturais intrigantes dos eosinófilos de *N. squamipes* foram observadas por MET. Através dos dados obtidos, concluímos que o rato d'água apresenta uma relação ecológica bem estabelecida com o parasito *S. mansoni*, sendo que esta adaptação ao parasitismo pode estar relacionada ao metabolismo lipídico deste reservatório silvestre.

Palavras-chave: *Nectomys squamipes*; reservatório silvestre; *Schistosoma mansoni*; granuloma; histopatologia; ultraestrutura, eosinófilos, corpúsculos lipídicos; esteatose hepática.

ABSTRACT

The rodent *Nectomys squamipes*, also known as water rat, is considered the most important wild reservoir of the parasite *Schistosoma mansoni* in Brazil, contributing to the epidemiology of human schistosomiasis. Furthermore, when infected, it shows no clinical signs of the disease with extremely soft tissue injuries resulting from infection. Parameters related to the infection in murine models of experimental infection have been well documented; however, in natural infection models, they are still largely unknown. The host-parasite relationship in this model of natural infection is highly relevant and motivated the development of this work. So, It was conducted a comparative study of schistosomiasis in *N. squamipes* naturally infected by the parasite *Schistosoma mansoni* and in Swiss experimentally infected mice, at the acute and chronic phases of the infection through histological, biochemical and ultrastructural analysis, aiming to gain a better understanding of how the water rat handles with parasitism by *S. mansoni*. Analysis of frequencies and types of granulomas were held, their average areas and tissue impairment of the target organs of infection (liver and intestines) in both experimental models. The involvement of eosinophils during granulomatous inflammatory response was also evaluated, as these cells are present in large numbers in the granulomas. Biochemical testing of liver transaminases contributed to the evaluation of hepatocellular damage. Furthermore, the influence of hepatic steatosis in the natural infection model was studied, since their effects are not known in wild animals. Thus, serum levels of glucose, total cholesterol and triglycerides were important to assess the glycemic and lipid profile of the animals studied. The liver tissues of animals were subjected to Raman spectroscopy, to assess the degree of unsaturation. Finally, ultrastructural analysis helped to deepen understanding of the roles of eosinophils and lipid bodies present in hepatocytes in these two models of schistosomiasis. The results revealed that *N. squamipes* showed excellent modulation of tissue lesions in the liver, with low tissue impairment and a more exacerbated granulomatous reaction in the small intestine, favoring the elimination of the parasite eggs in feces. Furthermore, serum transaminases levels did not change as a result of the infection in wild rodents, unlike what occurred in Swiss mice. *N. squamipes* infected and uninfected showed the highest degree of unsaturation present in liver tissue. Intriguing ultrastructural characteristics of *N. squamipes* eosinophils were observed by TEM. Through the data obtained, we concluded that the water rat has a well-established ecological relationship with the parasite *Schistosoma mansoni*, and this adaptation to parasitism may be related to lipid metabolism of this wild reservoir.

Keywords: *Nectomys squamipes*; wild reservoir; *Schistosoma mansoni*; granuloma; histopathology; ultrastructure, eosinophils, lipid body; hepatic steatosis.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidônico
ACS	Acil-CoA sintetase
ADRP	Adipose Differentiation Related Protein - Adipofilina ou Perilipina 2
AO	Ácido Oléico
APCs	Antigen Presenting Cells - Células apresentadoras de antígenos
APRIL	Ligante indutor de proliferação
CAA	Circulating Anodic Antigen - Antígeno anódico circulante
CCA	Circulating Cathodic Antigen - Antígeno catódico circulante
CCL	Quimiocina de motivo CC
CCR	Receptor de quimiocina de motivo CC
CD	Cluster of Differentiation - Molécula de superfície
C/EBP	CCAAT/Enhancer-Binding Protein - Proteínas de ligação a ativador de sequência CCAAT
Cfegs	Clusters of Free Eosinophil Granules - Aglomerados de grânulos livres de eosinófilos
CL	Corpúsculo lipídico
CLC	Proteína de Charcot-Leyden Cristal
COX	Ciclooxygenase
DAG	Diacilglicerol
DC	Dendritic cell - Célula dendrítica
DTH	Delayed-type Hypersensitivity - Hipersensibilidade do tipo tardia
EE	Esterol ésteres
ECP	Eosinophil Cationic Protein - Proteína catiônica eosinofílica
EDN	Eosinophil Derived Neurotoxin - Neurotoxina eosinofílica
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay - Ensaio imunoenzimático
EoSVs	Eosinophil sombrero vesicles - vesículas sombrero
Eotaxina-1/CCL11	Eotaxin 1/Chemokine (CC motif) ligand 11 - eotaxina 1/ligante 11 de quimiocina de motivo CC
EPO	Eosinophil Peroxidase - Peroxidase eosinofílica
ETS	E26 Transformation-Specific Family
FcεRI	Receptor de IgE de alta afinidade
FFA	Free Fatty Acid - Ácido graxo livre
GATA-1	Fator de transcrição da globina 1

GMA	Glicolmetacrilato
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HCA	Análise de componentes hierárquicos
HETEs	Ácidos hidroieicosatetraenóicos
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenase
IFN- γ	Interferon Gamma
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
IL-R	Receptor de interleucina
LDL	Low Density Lipoprotein - Lipoproteína de baixa densidade
Linfócitos T CD4 +	Linfócitos T helper ou auxiliares
Linfócitos T CD8 +	Linfócitos citotóxicos ou supressores
5-LO	5-lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTC4	Leucotrieno C4
MBP	Main Basic Protein - Proteína básica principal
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MHC classe II	Major Histocompatibility Complex II - Complexo de histocompatibilidade principal de classe II
NADPH-oxidase	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate-oxidase
NGF	Neural Growth Factor - Fator de crescimento neural
ORO	Oil Red O
PAF	Platelet Activating Factor - Fator ativador de plaquetas
PAI-2	Inibidor ativador do plasminogênio 2
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Polymerase Chain Reaction - Reação em cadeia da polimerase
PKC	Protein Kinase C - Proteína C quinase
PMA	Phorbol-12-Miristato-13-Acetato - Acetato miristato de forbol
PMD	Piecemeal Degranulation - Desgranulação por piecemeal
proMBP	Proforma da proteína básica principal (MBP)

PU.1	Fator de transcrição hematopoiético PU. 1
RANTES/CCL5	Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and presumably Secreted/ Chemokine (CC motif) ligand 5 - ligante 5 de quimiocina de motivo CC
RI	Resistência à insulina
RE	Retículo endoplasmático
ROS	Reactive Oxygen Species - Espécies reativas de oxigênio
RPM	Rotações por minuto
SEA	Soluble Egg Antigen - Antígeno solúvel do ovo
SIG	Sistemas de informação geográfica
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SNAREs	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor Attachment Receptors - Proteínas receptoras de ligação ao fator solúvel sensível N-etilmaleimida
SR	Sensoriamento remoto
STX17	Sintaxina-17
SVS/MS	Secretaria de Vigilância Sanitária/ Ministério de Saúde
TAG	Triacilglicerol
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta - Fator de transformação do crescimento beta
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
Th1, Th2, Th17, Treg	Linfócitos T helper 1, 2, 17, regulatórios
TIP47	Tail-Interacting Protein of 47 kD - Perilipina 3
TLR2	Toll-Like Receptor 2
TNF α	Tumor Necrosis Factor Alpha - Fator de necrose tumoral alfa
UCC	Umbilical Cord Cells - Células estaminais do cordão umbilical
WHO	World Health Organization

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	Distribuição geográfica da esquistossomose no mundo em 2010...	24
Figura 02	Distribuição da esquistossomose no Brasil segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos realizados no ano de 2012.....	28
Figura 03	Casal de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em cópula.....	29
Figura 04	Ciclo biológico do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	31
Figura 05	Caramujos do gênero <i>Biomphalaria</i>	32
Figura 06	Espécime de <i>Nectomys squamipes</i> (Brants, 1827), capturado em afluente do rio Paquequer, em Sumidouro, Rio de Janeiro, Brasil..	35
Figura 07	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i> em <i>Nectomys squamipes</i> ..	36
Figura 08	Curso d'água localizado na área rural de Sumidouro, RJ, em região peridomiciliar.....	38
Figura 09	Modelo esquemático de granuloma esquistossomótico.....	43
Figura 10	Resposta imune adaptativa na fibrose.....	45
Figura 11	Linha do tempo das respostas mediadas por células T em modelo murino de esquistossomose mansônica.....	48
Figura 12	Estrutura e composição de corpúsculo lipídico (CL).....	59
Figura 13	Macrófagos peritoneais isolados de camundongos cultivados ou não com <i>Trypanosoma cruzi</i>	60
Figura 14	Macrófagos murinos ricos em corpúsculos lipídicos.....	61
Figura 15	Biogênese e estrutura dos corpúsculos lipídicos.....	63
Figura 16	Imagens obtidas por tomografia eletrônica revelam membranas no interior do corpúsculo lipídico (CL) (A–F).....	64
Figura 17	Lipotoxicidade no hepatócito.....	68
Figura 18	Microscopia eletrônica de transmissão de cristais de β -hematina na superfície de corpúsculos lipídicos sintéticos.....	75
Figura 19	Representação esquemática da maturação dos grânulos dos eosinófilos com os padrões de colorações propostas.....	80
Figura 20	Características ultraestruturais de eosinófilos maduros humanos...	82
Figura 21	Processos de secreção dos eosinófilos.....	87
Figura 22	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de um eosinófilo contendo um grande vacúolo citoplasmático.....	90
Figura 23	Ultraestrutura de um eosinófilo humano ativado.....	94
Figura 24	Modelo de mobilização e transporte de citocinas dos grânulos de secreção para a membrana plasmática em eosinófilos humanos...	96
Figura 25	Ultraestrutura de eosinófilo tecidual humano sofrendo citólise.....	98
Figura 26	Os eosinófilos modulam a função de outros leucócitos.....	99
Figura 27	Efeitos biológicos das citocinas derivadas dos eosinófilos na homeostase e na doença.....	104

Figura 28	Equipamento Scanner de lâminas Panoramic Scan 3D Histech...	119
Figura 29	Fígados de <i>Nectomys squamipes</i> (A, C) e de Swiss (B, D) infectados (A, B) e não infectados (C, D) pelo parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	132
Figura 30	Fases evolutivas dos granulomas hepáticos de <i>Nectomys squamipes</i> e de Swiss nas fases aguda (55 dias de infecção) e crônica (120 dias de infecção).....	135
Figura 31	Fases evolutivas dos granulomas presentes no intestino delgado de <i>Nectomys squamipes</i> e de Swiss nas fases aguda (55 dias) e crônica (120 dias) da esquistossomose mansônica.....	137
Figura 32	Fases evolutivas dos granulomas encontrados no intestino grosso de <i>Nectomys squamipes</i> e de Swiss (fases aguda e crônica).....	139
Figura 33	Cortes histológicos dos controles negativos de <i>Nectomys squamipes</i> e de Swiss.....	141
Figura 34	Comprometimento tecidual do fígado e dos intestinos delgado e grosso de <i>Nectomys squamipes</i> e de camundongos Swiss nas fases aguda (55 dias) e crônica (120 dias) da infecção esquistossomótica.....	143
Figura 35	Trajetos dos ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> nos intestinos delgado (A, B) e grosso (C, D) nos roedores <i>Nectomys squamipes</i> (A, C) e Swiss (B, D).....	145
Figura 36	Corpúsculos lipídicos de fígados de <i>Nectomys squamipes</i> e de Swiss visualizados à microscopia de luz (A e B), corados com Hematoxilina-Eosina (HE).....	147
Figura 37	Pigmento esquistossomótico no fígado de <i>Nectomys squamipes</i> (A, C) e de Swiss (B, D) infectados por <i>Schistosoma mansoni</i>	148
Figura 38	Granulomas confluentes nos fígados e intestinos delgados e grossos de <i>Nectomys squamipes</i> e de Swiss infectados com o <i>Schistosoma mansoni</i>	150
Figura 39	Ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> em tecido hepático e intestinal de <i>Nectomys squamipes</i> e de camundongo Swiss (fases aguda e crônica) da infecção esquistossomótica.....	152
Figura 40	Corpúsculos lipídicos em hepatócitos vistos por microscopia de luz.....	169
Figura 41	Corpúsculos lipídicos em hepatócitos de <i>Nectomys squamipes</i> infectados com o <i>Schistosoma mansoni</i>	171
Figura 42	Análises ultraestruturais de corpúsculos lipídicos em hepatócitos de <i>Nectomys squamipes</i>	172
Figura 43	Corpúsculo lipídico associado a mitocôndrias e ao retículo endoplasmático em hepatócito de <i>Nectomys squamipes</i> infectado com o <i>Schistosoma mansoni</i> (A, Ai).....	173
Figura 44	Corpúsculo lipídico (CL) associado a mitocôndrias e a um autofagossomo em hepatócito de <i>Nectomys squamipes</i> infectado com o <i>Schistosoma mansoni</i>	174
Figura 45	Interação núcleo e corpúsculos lipídicos de hepatócitos de <i>Nectomys squamipes</i> infectados ou não com o parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	175
Figura 46	Fusão de corpúsculos lipídicos em hepatócitos do roedor silvestre <i>Nectomys squamipes</i> com esquistossomose.....	176

Figura 47	Corpúsculos lipídicos em hepatócitos de <i>Nectomys squamipes</i> infectados naturalmente com o parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	177
Figura 48	Índice de Lee de <i>Nectomys squamipes</i> e de camundongos Swiss, nas fases aguda e crônica, infectados ou não pelo parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	181
Figura 49	Espectros Raman de amostras de tecidos hepáticos de <i>Nectomys squamipes</i> e de camundongos Swiss (fases aguda e crônica), de animais infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i> e seus respectivos controles.....	183
Figura 50	Gráfico de barras representando a razão da intensidade das bandas em 1658 e 1458 cm ⁻¹ para as amostras de tecidos hepáticos dos animais estudados.....	184
Figura 51	Gráfico dos escores da análise dos componentes principais.....	186
Figura 52	Gráfico dos pesos das variáveis na CP1 e CP2 no modelo da PCA.....	187
Figura 53	Dendograma da análise de componentes hierárquicos (HCA).....	188
Figura 54	Imagens representativas da ocorrência de eosinófilos nas diversas fases evolutivas dos granulomas esquistossomóticos em <i>Nectomys squamipes</i> (A, C, D) e Swiss (B).....	202
Figura 55	Quantificação e proporção dos eosinófilos nas diferentes fases evolutivas dos granulomas esquistossomóticos.....	203
Figura 56	Proporção de eosinófilos em relação à população geral das células do granuloma.....	204
Figura 57	Presença de eosinófilos em granulomas de <i>Nectomys squamipes</i> e de camundongos Swiss infectados próximos aos ovos do parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	206
Figura 58	Ultraestrutura de eosinófilo de <i>Nectomys squamipes</i> infectado pelo parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	209
Figura 59	Aspectos ultraestruturais de granuloma e de eosinófilo de <i>Nectomys squamipes</i> infectado pelo parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	210
Figura 60	Ultraestrutura de eosinófilo de <i>Nectomys squamipes</i> não infectado pelo <i>Schistosoma mansoni</i> em tecido intestinal.....	211
Figura 61	Modelo de grânulo de eosinófilo de <i>Nectomys squamipes</i>	212
Figura 62	Ultraestrutura de eosinófilo de camundongo Swiss não infectado pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	213
Figura 63	Ultraestrutura de eosinófilo de Swiss infectado com o parasito <i>Schistosoma mansoni</i>	214

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Patógenos e utilização dos corpúsculos lipídicos dos hospedeiros.	71
Tabela 02	Valores séricos de Proteínas totais e frações de <i>Nectomys squamipes</i> e de Swiss (fases aguda e crônica), infectados ou não com o helminto <i>Schistosoma mansoni</i> .	153
Tabela 03	Valores séricos das aminotransferases hepáticas (TGO e TGP) em <i>Nectomys squamipes</i> e em Swiss (fases aguda e crônica), infectados ou não com o helminto <i>Schistosoma mansoni</i> .	154
Tabela 04	Valores séricos de glicose e ácido úrico em <i>Nectomys squamipes</i> e em Swiss, nas fases aguda e crônica.	179
Tabela 05	Valores séricos de colesterol total e de triglicerídeos em <i>Nectomys squamipes</i> e em Swiss, nas fases aguda e crônica.	180

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
1.1	ESQUISTOSSOMOSE.....	23
1.1.1	Aspectos Gerais.....	23
1.1.2	Epidemiologia.....	24
1.1.3	Ecologia.....	25
1.2	ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.....	27
1.2.1	Esquistossomose no Brasil.....	27
1.2.2	Agente Etiológico.....	29
1.2.3	Ciclo de Vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	30
1.2.4	Hospedeiros Intermediários.....	31
1.2.5	Hospedeiros Vertebrados.....	33
1.2.6	Reservatórios Silvestres.....	33
1.2.6.1	O rato d'água <i>Nectomys squamipes</i>	34
1.2.7	Relação Parasito-Hospedeiro.....	39
1.2.8	Imunopatogênese.....	41
1.2.8.1	Granuloma.....	41
1.2.8.2	Fibrose hepática.....	44
1.2.8.3	Imunologia.....	46
1.2.9	Modelos Experimentais.....	49
1.2.10	Manifestações Clínicas.....	50
1.2.11	Diagnóstico.....	53
1.2.12	Tratamento.....	54
1.2.13	Controle.....	56
1.3	CORPÚSCULOS LIPÍDICOS.....	57
1.3.1	Aspectos Gerais.....	57
1.3.2	Estrutura e Composição.....	58
1.3.3	Biogênese e Formação.....	62
1.3.4	Interação Com Outras Organelas.....	65
1.3.5	Corpúsculos Lipídicos e Patologias.....	66
1.3.5.1	Corpúsculos lipídicos e doenças metabólicas.....	66
1.3.5.1.1	Esteatose hepática.....	67

1.3.5.2	Corpúsculos lipídicos e doenças infecciosas.....	71
1.3.5.2.1	Corpúsculos lipídicos e esquistossomose mansônica.....	73
1.4	EOSINÓFILOS	76
1.4.1	Aspectos Gerais.....	76
1.4.2	Eosinopoiese.....	78
1.4.3	Formação das Proteínas Granulares.....	79
1.4.4	Ultraestrutura de Eosinófilos Maduros.....	80
1.4.5	Funções Efetoras dos Eosinófilos.....	83
1.4.5.1	Proteínas granulares.....	83
1.4.5.1.1	Proteína básica principal (MBP).....	83
1.4.5.1.2	Peroxidase eosinofílica (EPO).....	84
1.4.5.1.3	Proteína catiônica eosinofílica (ECP).....	84
1.4.5.1.4	Neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN).....	85
1.4.5.1.5	Proteína de Charcot-Leyden Cristal (CLC).....	85
1.4.6	Mecanismos de Secreção.....	86
1.4.6.1	Exocitose.....	88
1.4.6.2	Desgranulação por piecemeal (PMD).....	91
1.4.6.2.1	Transporte vesicular durante a PMD.....	95
1.4.6.3	Citólise.....	96
1.4.7	Funções Imunorreguladoras dos Eosinófilos.....	99
1.4.7.1	Interação com leucócitos.....	100
1.4.7.2	Secreção de citocinas.....	103
1.4.8	Eosinófilos e Infecções Helmínticas.....	105
1.4.8.1	Eosinófilos e esquistossomose mansônica.....	106
1.5	JUSTIFICATIVA	109
2	OBJETIVOS	111
2.1	OBJETIVO GERAL.....	111
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	111
3	MATERIAIS E MÉTODOS	112
3.1	ANIMAIS SILVESTRES.....	112
3.1.1	Área de Estudo.....	112

3.1.2	Captura dos Roedores.....	113
3.1.3	Eutanásia e Obtenção das Amostras.....	114
3.1.4	Licenciamento para Captura e Comitê de Ética.....	114
3.2	ANIMAIS DE LABORATÓRIO.....	115
3.2.1	Infecção Experimental.....	115
3.2.2	Eutanásia e Obtenção das Amostras.....	116
3.2.3	Comitê de Ética.....	116
3.3	ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	116
3.3.1	Preparações Histológicas e Colorações.....	116
3.3.2	Classificação dos Granulomas.....	119
3.3.3	Comprometimento Tecidual.....	120
3.3.4	Ovos nos Tecidos.....	120
3.3.5	Eosinófilos.....	121
3.4	QUANTIFICAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS DE HEPATÓCITOS POR MICROSCOPIA DE LUZ.....	122
3.5	ANÁLISES ULTRAESTRUTURAIS.....	123
3.5.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	123
3.5.2	Análises Morfométricas dos Corpúsculos Lipídicos.....	124
3.5.3	Análises Ultraestruturais dos Eosinófilos de <i>N. squamipes</i> e de Swiss.....	124
3.6	DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....	125
3.7	CÁLCULO DO ÍNDICE DE LEE.....	126
3.8	ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	127
3.8.1	Amostras.....	127
3.8.2	Espectros Raman.....	127
3.8.3	Tratamento dos Dados.....	128
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	129
4	CAPÍTULO 1- ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE ÓRGÃOS-ALVO DURANTE INFECÇÕES POR <i>SCHISTOSOMA MANSONI</i> EM <i>NECTOMYS SQUAMIPES</i> E EM CAMUNDONGOS SWISS.....	130
4.1	INTRODUÇÃO.....	130

4.2	OBJETIVOS.....	131
4.2.1	Objetivo Geral.....	131
4.2.2	Objetivos Específicos.....	131
4.3	RESULTADOS.....	132
4.3.1	Aspectos Macroscópicos.....	132
4.3.2	Frequência e Área das Fases Evolutivas dos Granulomas.....	132
4.3.2.1	Fígado.....	133
4.3.2.2	Intestino delgado.....	136
4.3.2.3	Intestino grosso.....	138
4.3.3	Comprometimento Tecidual.....	140
4.3.3.1	Tecidos controles.....	140
4.3.3.2	Análise do comprometimento tecidual.....	142
4.3.3.3	Trajetos dos ovos nos intestinos.....	144
4.3.3.4	Outras alterações do tecido hepático.....	146
4.3.3.5	Granulomas confluentes.....	149
4.3.4	Densidade dos Ovos nos Tecidos.....	151
4.3.5	Dosagens Bioquímicas.....	153
4.3.5.1	Proteínas totais e frações.....	153
4.3.5.2	Transaminases hepáticas.....	154
4.4	DISCUSSÃO.....	155
4.4.1	Frequência e Área dos Granulomas.....	155
4.4.2	Comprometimento Tecidual.....	157
4.4.3	Outras Alterações do Tecido Hepático.....	158
4.4.3.1	Hemozoína.....	158
4.4.3.2	Corpúsculos lipídicos.....	159
4.4.4	Granulomas Confluentes.....	159
4.4.5	Densidade de Ovos nos Tecidos.....	160
4.4.6	Proteínas Totais e Frações.....	161
4.4.7	Transaminases.....	162
4.5	CONCLUSÕES.....	165

5	CAPÍTULO 2 - ESTEATOSE HEPÁTICA E SUA RELAÇÃO COM A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EM MODELO NATURAL E EXPERIMENTAL.....	166
5.1	INTRODUÇÃO.....	166
5.2	OBJETIVOS.....	167
5.2.1	Objetivo Geral.....	167
5.2.2	Objetivos Específicos.....	167
5.3	RESULTADOS.....	168
5.3.1	Análises dos Corpúsculos Lipídicos por Microscopia de Luz.....	168
5.3.2	Análises Ultraestruturais dos Corpúsculos Lipídicos.....	170
5.3.3	Dosagens Bioquímicas.....	178
5.3.3.1	Glicose e ácido úrico.....	178
5.3.3.2	Colesterol total e triglicerídeos.....	179
5.3.4	Índice de Lee.....	180
5.3.5	Espectroscopia Raman.....	182
5.3.5.1	Espectros raman médios.....	182
5.3.5.2	Análise de componentes principais (PCA).....	184
5.3.5.3	Análise dos componentes hierárquicos (HCA).....	187
5.4	DISCUSSÃO.....	189
5.4.1	Corpúsculos Lipídicos.....	189
5.4.2	Dosagens Bioquímicas.....	191
5.4.2.1	Glicose e ácido úrico.....	191
5.4.2.2	Colesterol total e triglicerídeos.....	192
5.4.3	Índice de Lee.....	194
5.4.4	Espectroscopia Raman.....	195
5.5	CONCLUSÕES.....	197

6	CAPÍTULO 3 - PARTICIPAÇÃO DOS EOSINÓFILOS DURANTE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA GRANULOMATOSA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EM MODELO NATURAL E EXPERIMENTAL.....	199
6.1	INTRODUÇÃO.....	199
6.2	OBJETIVOS.....	200
6.2.1	Objetivo Geral.....	200
6.2.2	Objetivos Específicos.....	200
6.3	RESULTADOS	201
6.3.1	Quantificação de Eosinófilos nos Granulomas por Microscopia de Luz.....	201
6.3.1.1	Eosinófilos nas fases evolutivas dos granulomas.....	201
6.3.1.2	Eosinófilos em relação à população geral das células do granuloma.	205
6.3.2	Análises Ultraestruturais dos Eosinófilos de <i>Nectomys squamipes</i> e de Swiss.....	207
6.4	DISCUSSÃO	215
6.4.1	Quantificação de Eosinófilos nos Granulomas por Microscopia de Luz.....	215
6.4.1.1	Eosinófilos nas fases evolutivas dos granulomas.....	215
6.4.1.2	Eosinófilos em relação à população geral das células do granuloma	216
6.4.2	Análises Ultraestruturais dos Eosinófilos de <i>Nectomys squamipes</i> e de Swiss.....	216
6.5	CONCLUSÕES.....	218
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES.....	219
8	REFERÊNCIAS.....	222

1 INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE

1.1.1 Aspectos Gerais

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por vermes hematófagos do gênero *Schistosoma*, constituindo um grave problema de saúde pública. Atualmente, mais de 240 milhões de pessoas em todo o mundo são afetadas por esta parasitose e estima-se que mais de 700 milhões de pessoas estão em risco de infecção em 78 países e territórios de regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia, Caribe e América do Sul (Fig.1) (WHO, 2015).

Seis espécies são responsáveis por infecções humanas e em outros mamíferos: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma mekongi* e *Schistosoma guineensis*. Os vermes adultos de todas as espécies residem no interior de vasos sanguíneos do hospedeiro vertebrado. *S. haematobium* é responsável pela esquistossomose urogenital, enquanto as outras espécies afetam principalmente o fígado e os intestinos (BICA *et al.*, 2000; GRYSSELS, 2006).

A esquistossomose é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença tropical negligenciada, não ocorrendo nas áreas tropicais apenas devido às características climáticas únicas destas regiões, mas também por se tratarem das áreas mais pobres do planeta (WHO, 2008).

A ligação entre esquistossomose e pobreza é evidente, embora o nexo de causalidade provavelmente seja bidirecional, ou seja, a esquistossomose causa um comprometimento crônico da saúde que prejudica o desempenho laboral, perpetuando o estado de pobreza, enquanto a pobreza oferece as condições favoráveis à transmissão desta parasitose (KING, 2010).

A maior parte dos casos da doença concentra-se na África subsaariana (mais de 90% dos casos) (Fig.1), onde encontramos as maiores taxas de prevalência e de infecção, normalmente em crianças em idade escolar, adolescentes e jovens adultos, gerando enormes impactos sociais e econômicos negativos nas áreas mais afetadas (WHO, 2011).

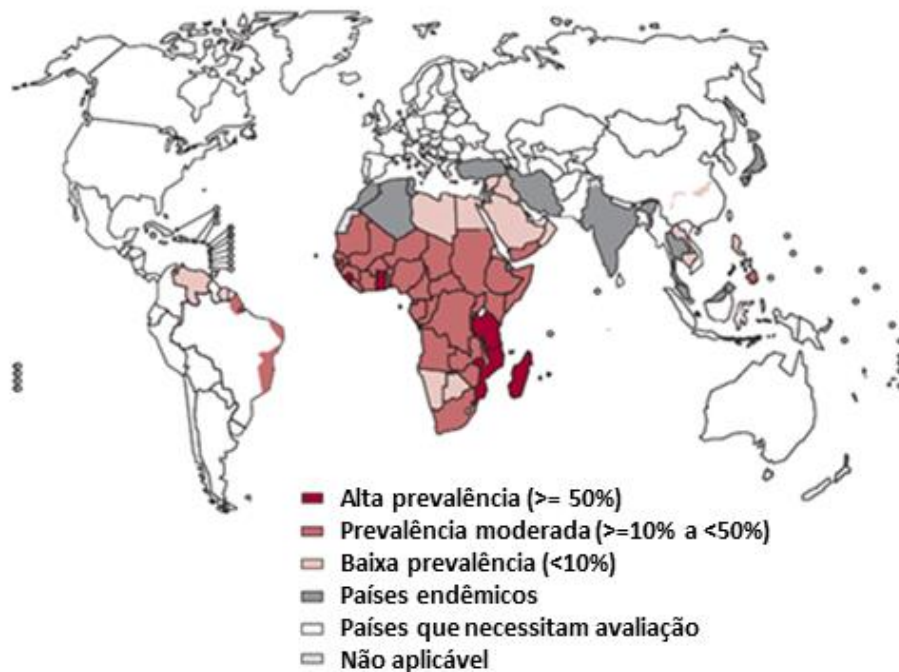


Figura 1: Distribuição geográfica da esquistossomose no mundo em 2010. Áreas de alta e média endemicidade são encontradas principalmente na região da África subsaariana. Adaptado de WHO (2011).

1.1.2 Epidemiologia

Nas comunidades endêmicas, a infecção esquistossomótica usualmente se inicia na infância, com um pico de incidência ocorrendo entre 10 e 14 anos de idade em áreas com alta prevalência desta parasitose, e no final da adolescência em populações menos intensamente infectadas. A incidência nos adultos diminui gradualmente. As diferenças nos picos de incidências relacionadas com a idade são atribuídas ao desenvolvimento gradual de imunidade e às diferenças nos níveis de exposição às águas contaminadas (WILSON *et al.*, 2011).

Uma vez que a expectativa de vida do schistosoma no organismo do hospedeiro vertebrado é de aproximadamente 5 a 10 anos, o declínio da prevalência coincide com o momento em que os vermes adquiridos na infância começam a morrer. Após a morte do verme, ocorrida naturalmente ou provocada por tratamento com drogas esquistossomicidas, os antígenos do schistosoma, normalmente não encontrados pelo hospedeiro durante a infecção crônica, são agora liberados e expostos, alterando os padrões de resposta imune e aumentando a resistência à reinfecção (BLACK *et al.*, 2010).

As áreas de maior prevalência de esquistossomose apresentam uma maior proporção de indivíduos com elevadas cargas parasitárias. Estas comunidades são frequentemente rurais e pobres, sem recursos financeiros suficientes para melhorar suas condições sanitárias. Levantamentos epidemiológicos normalmente utilizam as contagens de ovos nas fezes para a identificação de pessoas infectadas e para a quantificação das infecções (WHO, 1998).

As taxas de prevalência, a intensidade da infecção e a ocorrência das formas graves da doença variam substancialmente dentro das comunidades endêmicas. Alguns membros da comunidade têm baixa eliminação de ovos nas fezes e pouca ou nenhuma manifestação clínica da esquistossomose, enquanto outros têm infecções intensas e desenvolvem doença hepática ou intestinal grave (MOHAMED-ALI *et al.*, 1999).

A intensidade da exposição, as diferenças entre as cepas do parasito, o status imunológico dos indivíduos e a presença de outras infecções envolvendo o fígado (por exemplo, malária, hepatites virais) contribuem para as variações na gravidade e na morbidade da infecção. Finalmente, a presença de diferenças genéticas desempenha um papel importante no risco de desenvolvimento de fibrose hepática grave (DESSEIN *et al.*, 1992).

A distribuição dos vermes numa comunidade endêmica é sobredispersa, ou seja, a maioria dos indivíduos é infectada com baixas cargas parasitárias e apenas uma proporção relativamente pequena de hospedeiros altamente infectados irá apresentar alta morbidade e mortalidade. Esta característica tem sido atribuída tanto a padrões de contatos com a água quanto à imunidade inata e adquirida dos hospedeiros. Padrões relacionados com o sexo variam em relação a fatores comportamentais, profissionais, culturais e religiosos (GURARIE e SETO, 2009).

1.1.3 Ecologia

O ambiente natural modificado e degradado pelo homem desempenha um papel crucial na transmissão de helmintos parasitos (GAZZINELLI *et al.*, 2012). A perda de biodiversidade, devido à expansão da agricultura, pecuária e urbanização, e a crescente poluição ambiental levam à criação de novos locais de transmissão de parasitoses (KEESING *et al.*, 2010).

Por exemplo, para atender à crescente demanda por alimentos e energia devido ao aumento populacional, cada vez mais são construídos sistemas de irrigação e barragens. No entanto, o desenvolvimento e a gestão de recursos hídricos em zonas de clima tropical e subtropical têm resultado no aumento da transmissão ou na introdução de doenças como a esquistossomose em áreas anteriormente não endêmicas. A criação de reservatórios de barragens e a implantação de sistemas de irrigação podem levar a uma expansão dos habitats dos caramujos hospedeiros intermediários e, portanto, ao surgimento de novos focos de transmissão de esquistossomose (STEINMANN *et al.*, 2006). Estudos realizados em diferentes países, principalmente nos africanos, confirmam a influência dos projetos de irrigação tanto no aumento da prevalência quanto no estabelecimento de novos focos de transmissão de esquistossomose (MASABA *et al.*, 1983; KLOOS, 1985; MARTINS JR e BARRETO, 2003).

Outro aspecto ecológico importante na transmissão da esquistossomose é que algumas espécies de *Schistosoma* que infectam os seres humanos também infectam hospedeiros vertebrados silvestres. Geralmente, estes reservatórios mantêm a infecção, aumentando a probabilidade de que os seres humanos encontrem os parasitos no meio natural. Regiões tropicais, onde existem números abundantes de hospedeiros reservatórios, são conhecidas como “hot spots”. Nestas zonas ecológicas, ocorrem as maiores taxas de infecção em humanos, devido à convergência de fatores ambientais que favorecem a transmissão, como o habitat ideal do caramujo, a presença dos reservatórios silvestres do parasito, ambos em proximidade com um grande número de pessoas (DESPOMMIER *et al.*, 2005).

Em relação às alterações climáticas observadas mais recentemente, acredita-se que o aumento das temperaturas e as maiores flutuações das chuvas possam desencadear alterações nos sistemas físicos e biológicos, induzindo a mudanças na distribuição espaço-temporal de vetores de doenças e de hospedeiros intermediários. No caso específico da esquistossomose, as mudanças climáticas podem afetar a distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários caramujos de água doce e de reservatórios silvestres do parasito, alterando a transmissão e a epidemiologia da doença (SUTHERST, 2004).

1.2 ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

1.2.1 Esquistossomose no Brasil

O *Schistosoma mansoni* é a única espécie do gênero *Schistosoma* que ocorre no Brasil. Este parasito foi introduzido em nosso país durante o período colonial, através do tráfico de escravos africanos parasitados, e se instalou aqui devido à presença de caramujos hospedeiros intermediários suscetíveis. Os fluxos migratórios foram responsáveis por espalhar esta parasitose das regiões litorâneas para o interior do país. Entretanto, o primeiro relato de sua ocorrência no Brasil somente foi feito no ano de 1908, por Pirajá da Silva, no Estado da Bahia. Sua importância epidemiológica só foi evidenciada na década de 50 com a realização, por Pellon e Teixeira, de um grande inquérito coproscópico nacional para descobrir a prevalência da doença em território brasileiro (COURA e AMARAL, 2004; BRASIL, 2010).

O clima tropical do país, associado à enorme variedade de habitats aquáticos, às altas temperaturas e à luminosidade intensa contribuem para a propagação dos moluscos hospedeiros intermediários do parasito. Além disso, fatores como falta de educação sanitária e de saneamento básico da população são fundamentais para o estabelecimento de focos de transmissão (COURA e AMARAL, 2004).

Com a implantação dos programas de controle da esquistossomose desde a década de 1970, ocorreu uma importante mudança no perfil desta parasitose no país. Estes programas têm contribuído para a redução da prevalência e da morbidade, mas não impediram o surgimento de novos focos da doença (VASCONCELOS *et al.*, 2009).

Durante as últimas décadas, a distribuição geográfica da esquistossomose tem se expandido para as periferias dos grandes centros urbanos, onde as condições sanitárias são precárias, principalmente devido aos movimentos migratórios humanos (CARVALHO *et al.*, 2010). Por outro lado, atividades de turismo e lazer rurais em áreas endêmicas, por pessoas residentes em áreas urbanas, têm ocasionado o aparecimento de surtos agudos da doença (MASSARA *et al.*, 2008; ENK *et al.*, 2010).

Atualmente, no Brasil, estima-se que existam aproximadamente seis milhões de indivíduos infectados com o *S. mansoni* e 25 milhões em risco de contrair a infecção. As áreas endêmicas abrangem grande parte dos estados da região nordeste (Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia), região norte (Pará e Rondônia) e na região sudeste, os estados do Espírito Santo e Minas Gerais. Em alguns estados como Maranhão, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, a distribuição da doença é focal. Os índices de prevalência mais elevados ocorrem em municípios dos estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais (Fig.2) (BRASIL, 2009; BRASIL, 2010; BRASIL, 2014).

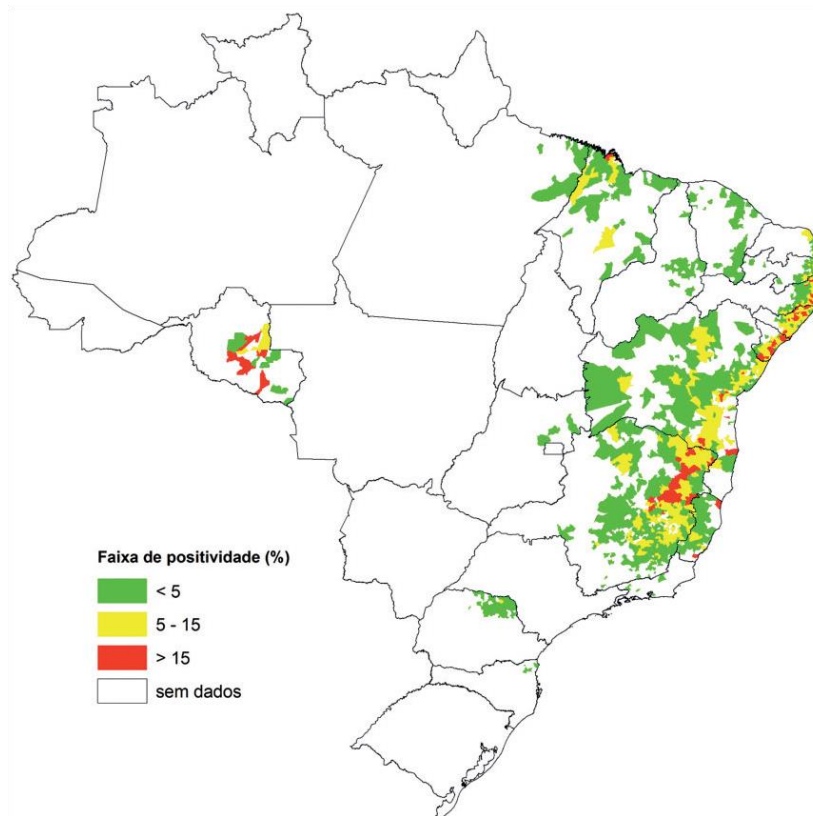


Figura 2: Distribuição da esquistossomose no Brasil segundo percentual de positividade em inquéritos coproscópicos realizados no ano de 2012. A maioria das regiões brasileiras onde a esquistossomose ocorre é considerada de baixa endemicidade (< 5%) devido à eficácia dos programas de controle da doença no país. Fonte: SVS/MS (BRASIL, 2014).

Apesar dos esforços, o controle da esquistossomose em um país como o Brasil, com sua extensa área territorial, ampla distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários e dos reservatórios silvestres, além da migração frequente da população, é considerado um processo difícil, que requer

intensificação, adaptação e continuidade dos programas de controle (KLOOS *et al.*, 2010).

1.2.2 Agente Etiológico

O agente etiológico da esquistossomose mansônica é o *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, um helminto pertencente à classe dos Trematoda, família Schistosomatidae e gênero *Schistosoma*. São vermes digenéticos, delgados, de coloração branca e sexos separados, onde a fêmea adulta, mais alongada, aloja-se no canal ginecóforo do macho (Fig.3). Os vermes adultos habitam os vasos mesentéricos do hospedeiro definitivo e as formas intermediárias se desenvolvem em caramujos gastrópodes aquáticos do gênero *Biomphalaria* (BRASIL, 2014).

O parasito *S. mansoni* é endêmico na América Latina (Brasil, algumas ilhas do Caribe, Suriname e Venezuela), Oriente Médio (Egito, Líbia, Sudão), África subsaariana (Mauritânia, Senegal) e áreas do sul da África (CHITSULO *et al.*, 2000).

Quanto à sua variabilidade genética, esta pode ser influenciada pela heterogeneidade espacial, pela exposição a hospedeiros suscetíveis, pela dinâmica populacional e pelo comportamento dos hospedeiros (LE *et al.*, 2000). Entretanto, no Brasil, a análise filogeográfica de cepas de *S. mansoni* provenientes de oito localidades brasileiras mostrou pouca variação entre as cepas estudadas (MORGAN *et al.*, 2005).



Figura 3: Casal de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* em cópula. Micrografia obtida em microscópio de luz após coloração com Carmim. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/ioc/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infoid=1314&sid=32&tpl=prnterview>

1.2.3 Ciclo de Vida do *Schistosoma mansoni*

O parasito *S. mansoni* apresenta duas fases no seu ciclo de vida: uma fase sexuada, que se passa no hospedeiro vertebrado, os seres humanos e outros mamíferos, e uma fase assexuada, que ocorre no hospedeiro intermediário, o caramujo de água doce (Fig.4) (GRYSSELS *et al.*, 2006).

Os ovos do parasito excretados pelo hospedeiro definitivo juntamente com as fezes, em águas doces e pouco movimentadas, contêm miracídios ciliados que eclodem e nadam ativamente em busca do caramujo suscetível. Ao penetrar no caramujo, o miracídio perde seu glicocálix e se transforma em esporocisto primário. Suas células germinais replicam e formam esporocistos secundários. Estes, por sua vez, originam milhares de cercarias (Fig.4) (BRASIL, 2014).

Estas formas larvais de cauda bifurcada são liberadas em resposta à luz solar e têm de 48 a 72 horas para encontrar um hospedeiro vertebrado. A emissão de cercarias ocorre principalmente durante o dia, nos horários mais quentes (entre 10 e 16 horas). A penetração percutânea no hospedeiro vertebrado é alcançada por esforço mecânico e pela atuação de enzimas proteolíticas. Ao migrarem através da derme, as cercarias perdem a cauda bifurcada, transformando-se em esquistossômulos, que migram, através da circulação venosa, para o coração e, em seguida, para os pulmões, onde residem e continuam a amadurecer durante 2 a 3 semanas. Os vermes jovens eventualmente atingem o lado esquerdo do coração e são transportados para o sistema porta hepático, onde completam sua maturação (Fig.4) (GRYSSELS, 2012).

Vermes machos e fêmeas acasalam e atingem a maturidade sexual, com a fêmea se instalando no canal ginecóforo do macho. Os vermes adultos permanecem em um estado de cópula contínua no interior dos vasos e acabam migrando para o plexo venoso mesentérico, onde sobrevivem em média de 5 a 10 anos. Aproximadamente de 4 a 6 semanas após a penetração das cercarias, a oviposição é iniciada. As fêmeas de *S. mansoni* produzem de 100 a 300 ovos por dia. Estes ovos, ou migram através da parede vascular, na submucosa intestinal, ou chegam ao fígado pela circulação portal. A resposta inflamatória mediada por linfócitos T CD4 + facilita a passagem dos ovos para o lúmen intestinal, onde serão eliminados juntamente com as fezes nas coleções de água doce, completando o ciclo do parasito (Fig.4) (BRASIL, 2014).

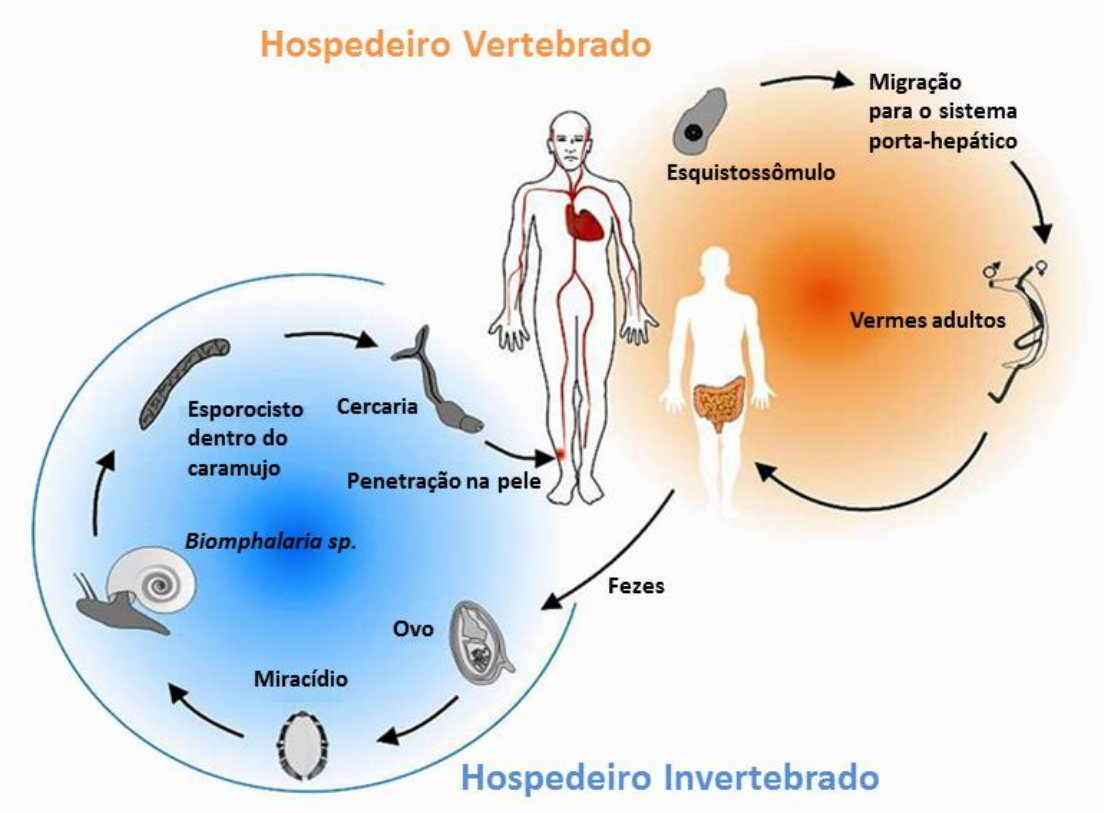


Figura 4: Ciclo biológico do parasito *Schistosoma mansoni*. Este parasito apresenta duas fases no seu ciclo de vida, uma sexuada (em vermelho), que ocorre no hospedeiro vertebrado, e uma assexuada (em azul), que se passa no molusco de água doce. Disponível em: <http://rgmg.cpqrr.fiocruz.br/content/schistosoma-mansoni-transcriptome-project>

1.2.4 Hospedeiros Intermediários

O ciclo biológico do *S. mansoni* depende da presença do hospedeiro intermediário no ambiente. Os caramujos gastrópodes aquáticos, pertencentes à família Planorbidae e ao gênero *Biomphalaria*, possibilitam a reprodução assexuada do helminto. No Brasil, *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* são os hospedeiros intermediários deste parasito (Fig.5), sendo que a *B. glabrata* é considerada a espécie mais importante devido à sua ampla distribuição geográfica e alta suscetibilidade à infecção (BRASIL, 2008).



Figura 5: Caramujos do gênero *Biomphalaria*. Da esquerda para a direita: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Fonte: SVS/MS (BRASIL, 2008).

Em geral, estes caramujos habitam córregos e riachos com pouca correnteza, estando presentes em águas rasas com penetração moderada de luz, turbidez mínima, um substrato de lama rico em matéria orgânica, ficando submersos ou aderidos à vegetação aquática (MICHELSON e MOTA, 1982).

A ocupação das margens dos cursos d'água com habitações, levando a processos de erosão e de assoreamento, além de alterações de origem doméstica, como descarte de lixo e de esgoto (importantes fontes de matéria orgânica que servem de alimento para os caramujos) e a presença de cobertura vegetal nos leitos dos riachos favorecem a proliferação e a fixação dos moluscos nos ambientes de água doce (BRASIL, 2008).

A presença de habitats aquáticos adequados para a sobrevivência dos caramujos é, pois, regida por fatores ambientais e climáticos, tais como vegetação, temperatura, precipitações, características dos corpos d'água, topografia e uso do solo. Qualquer mudança em um desses fatores pode alterar a distribuição dos caramujos e, portanto, as dinâmicas de transmissão da esquistossomose (ANDRADE DE SOUZA e LANE DE MELO, 2012).

Em relação às taxas de infecção dos moluscos pelo parasito *S. mansoni*, FLORIN e GILBERTSON (1984) observaram que existe uma relação linear entre a temperatura da água e a taxa de desenvolvimento de *S. mansoni* em *B. glabrata*; os limites de desenvolvimento são de 16°C a 32°C, com um ponto nulo de 14,2°C no qual as cercarias não são produzidas.

Em outro estudo realizado por COELHO e BEZERRA (2006), os resultados também mostraram que a diminuição da temperatura da água exerceu uma influência substancial sobre o desenvolvimento da infecção por *S. mansoni* em *B. glabrata*. Estes dados são importantes para uma melhor compreensão dos aspectos epidemiológicos da esquistossomose.

1.2.5 Hospedeiros Vertebrados

O homem é o principal hospedeiro definitivo do *S. mansoni* e abriga as formas adultas do parasito, que se reproduzem sexuadamente. Por meio da eliminação dos ovos do parasito no ambiente, juntamente com as fezes, promove a contaminação das coleções de água doce. Animais silvestres, ao entrarem em contato com águas contaminadas com as larvas do parasito, podem eventualmente se infectar. Alguns primatas, marsupiais (gambá), ruminantes e roedores são considerados hospedeiros permissivos ou reservatórios, porém, não está clara a participação de muitos destes animais na transmissão e na epidemiologia da esquistossomose (GRYSSELS, 2012).

1.2.6 Reservatórios Silvestres

No Brasil, mamíferos encontrados com infecção natural em áreas endêmicas são geralmente roedores, a maioria da família Cricetidae (15 espécies) e alguns das famílias Echimyidae (*Trinomys*, *Proechimys*), Muridae (*Rattus*) e Caviidae (*Cavia*). Marsupiais já foram encontrados ocasionalmente infectados e até mesmo o gado bovino (REY, 1993).

Entretanto, alguns hospedeiros vertebrados são considerados sem importância epidemiológica na transmissão da esquistossomose pelas seguintes razões: incapacidade dos vermes para amadurecer e produzir ovos viáveis em seus organismos; localização inadequada dos vermes, tornando a expulsão dos ovos através das fezes limitada ou inviável; vida curta dos parasitos nos hospedeiros imunologicamente resistentes. *Cavia aperea* (preá) e o rato doméstico são espécies representativas dessas situações. Outras razões ecológicas poderiam ser: pouco contato do hospedeiro com os corpos d'água contaminados, ou hábitos de defecação com riscos limitados de poluição da água (*Didelphis*, por exemplo) (REY, 1993).

Do ponto de vista epidemiológico, os reservatórios mais importantes, encontrados naturalmente infectados com o *S. mansoni*, em áreas endêmicas de esquistossomose humana, são os ratos silvestres *Nectomys squamipes* e *Holochilus*

brasiliensis, por causa de seus hábitos semi-aquáticos e sua ampla distribuição geográfica, apresentando altas taxas de infecção (REY, 1993).

1.2.6.1 O rato d'água *Nectomys squamipes*

- A espécie *Nectomys squamipes*:

Nectomys squamipes é um roedor silvestre pertencente à família Cricetidae, subfamília Sigmodontinae, sendo encontrado especialmente na Mata Atlântica, do estado de Pernambuco ao norte do Rio Grande do Sul, nas bacias dos rios São Francisco, Paraíba do Sul e Paraná e em pequenas bacias do leste do Brasil. Os animais adultos pesam entre 100 e 420 g e medem, em média, de 165 a 245 mm (cabeça e corpo) (Fig.6) (BONVICINO *et al.*, 2008). A idade dos animais em estudos de campo pode ser estimada a partir de uma curva de crescimento de tamanho corporal obtida para *N. squamipes* criados em laboratório (D'ANDREA *et al.*, 1996).

A espécie possui hábitos semi-aquáticos, vivendo em estreito contato com coleções de água doce, como córregos e riachos. Suas fezes são normalmente depositadas nas margens ou diretamente nas águas, fato que contribui para o ciclo de transmissão do parasito *S. mansoni*, caso os animais se encontrem infectados (REY, 1993). As principais adaptações morfológicas à vida semi-aquática são as membranas interdigitais presentes nas patas traseiras (ERNEST e MARES, 1986) e a pelagem resistente à absorção de água (SANTORI, 2008).

Segundo LIMA (2009), *N. squamipes* distribui sua movimentação igualmente entre os ambientes de água e terra ao exercer suas atividades de forrageamento, busca por parceiros sexuais, locomoção e utilização de abrigos. Além disso, apresenta limitada área de exploração do habitat, sendo considerado um animal sedentário (REY, 1993). Alimenta-se principalmente de frutas, sementes, insetos e artrópodes, obtidos no ambiente terrestre, e caramujos, girinos e peixes, encontrados na água.

Em estudo realizado na bacia do rio Águas Claras, situada no estado do Rio de Janeiro, foi observada a ausência de um período de real escassez de alimentos para este animal, pois, nos momentos em que ocorreu falta de recursos no ambiente terrestre, *N. squamipes* intensificou a busca por presas aquáticas, as quais pareceram ser menos influenciadas pela sazonalidade climática, reproduzindo-se o ano todo (LIMA, 2009).

Sua atividade é crepuscular e noturna (ERNEST e MARES, 1986). *N. squamipes* possui dimorfismo sexual (D'ANDREA *et al.*, 1996) e um sistema de acasalamento promíscuo (BERGALLO e MAGNUSSON, 2004). A reprodução é desencadeada pela maior disponibilidade de recursos, de acordo com os padrões de precipitação; entretanto, a espécie pode se reproduzir o ano todo (GENTILE *et al.*, 2000).



Figura 6: Espécime de *Nectomys squamipes* (Brants, 1827), capturado em afluente do rio Paquequer, em Sumidouro, Rio de Janeiro, Brasil. A armadilha é do tipo Tomahawk, usada para captura de mamíferos vivos de pequeno porte, colocada nas margens de pequenos cursos d'água.

- A participação de *N. squamipes* no ciclo de transmissão do *S. mansoni*:

O primeiro encontro de espécimes do roedor *N. squamipes* infectados pelo parasito *S. mansoni* foi feito por AMORIM (1953). A partir de então, vários estudos foram realizados para compreender a participação do rato d'água no ciclo de transmissão do *S. mansoni*.

Observou-se que *N. squamipes* foi capaz de completar o ciclo de transmissão do *S. mansoni* sem a presença humana (Fig.7) (ANTUNES *et al.*, 1971; PICOT, 1992), podendo eliminar ovos viáveis nas fezes em grandes quantidades durante todo o seu tempo de vida (COSTA-SILVA, 2000). Este roedor é considerado o mais importante reservatório silvestre do *Schistosoma mansoni* no Brasil, participando

ativamente da transmissão do parasito nos ecossistemas naturais (Fig.7) (GENTILE *et al.*, 2010).

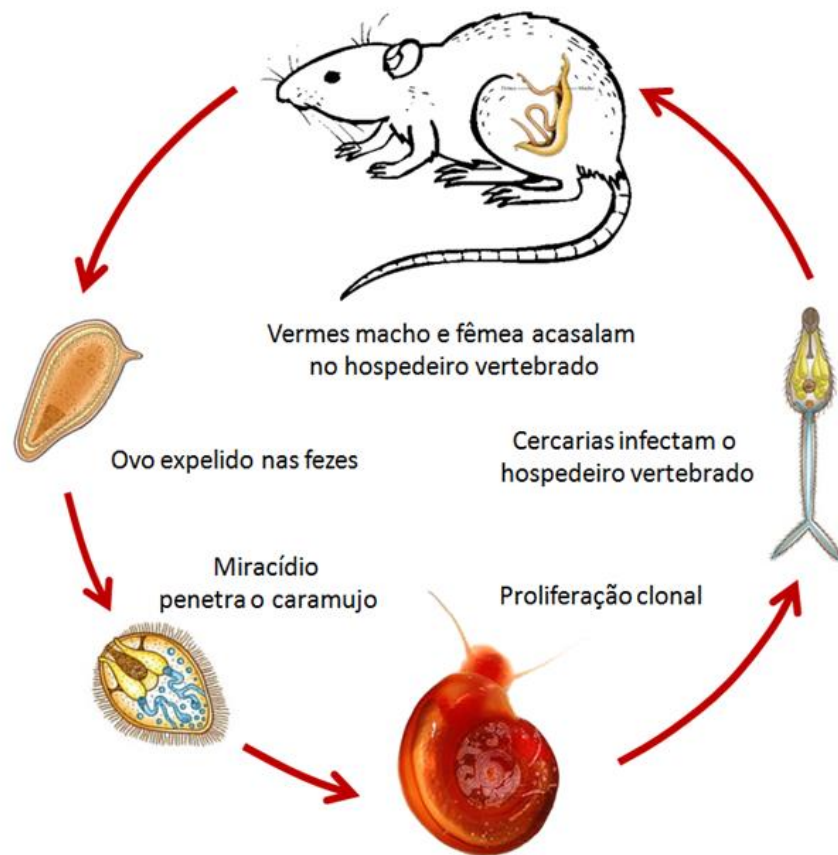


Figura 7: Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni* em *Nectomys squamipes*. O rato d'água mantém o ciclo do parasito no meio natural, promovendo a contaminação dos ambientes aquáticos com os ovos do parasito.

Sua elevada suscetibilidade à infecção por *S. mansoni* (SOUZA *et al.*, 1992; MALDONADO JR. *et al.*, 1994; D'ANDREA *et al.*, 2000), sua suscetibilidade às diferentes cepas do parasito (MARTINEZ, 1998; COSTA-SILVA, 2000), além da sua capacidade de manter populações permanentes e de tamanhos consideráveis (GENTILE *et al.*, 2000) e de tolerar bem a presença humana, podendo habitar em regiões de peridomicílio (D'ANDREA *et al.*, 1999) confirmam seu potencial para atuar como reservatório natural do parasito em áreas endêmicas.

Também já foi observado que *N. squamipes* desenvolve baixas cargas parasitárias (em torno de 10%) quando infectado experimentalmente, independentemente da cepa do parasito ou da via de inoculação utilizadas.

Provavelmente, este roedor consegue tolerar bem os schistosomas e, durante o curso da infecção, elimina parcialmente sua carga parasitária (RODRIGUES-SILVA *et al.*, 1992).

O rato d'água apresenta forte adaptação ao parasitismo (MACHADO-SILVA *et al.*, 1994), desenvolvendo patologia extremamente branda (SILVA e ANDRADE, 1989). A este respeito, CARVALHO (1982) observou que a maioria dos animais não apresenta lesões graves devidas à infecção, sugerindo alta compatibilidade na relação parasito-hospedeiro. Estudos histopatológicos mostraram que *N. squamipes* apresenta eficiente modulação das lesões peri-ovulares (RODRIGUES-SILVA, 1988; SILVA e ANDRADE, 1989).

Além disso, um estudo bioquímico mostrou não haver alteração no conteúdo de glicogênio do fígado dos animais naturalmente infectados por *S. mansoni* em relação aos animais não infectados. Entretanto, as glicemias divergiram, sendo que *N. squamipes* infectados apresentaram níveis séricos de glicose 25,27% maiores do que nos roedores não infectados (COSTA-NETO *et al.*, 2013). Estes resultados sugerem que este roedor pode apresentar adaptações fisiológicas à infecção por *S. mansoni*.

Para uma melhor compreensão sobre a participação do *N. squamipes* na transmissão da esquistossomose mansônica, foi desenvolvido um projeto multidisciplinar no município de Sumidouro, estado do Rio de Janeiro, considerado região endêmica desta parasitose, durante quinze anos, pela Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil (D'ANDREA *et al.*, 2000; GIOVANELLI *et al.*, 2001; D'ANDREA *et al.*, 2002; GENTILE *et al.*, 2006; MALDONADO JR *et al.*, 2006; BONECKER *et al.*, 2009; PERALTA *et al.*, 2009; GENTILE *et al.*, 2012).

Estes estudos foram realizados em localidades da área rural de Sumidouro, caracterizadas pela presença de pequenas propriedades rurais, entrecortadas por cursos d'água, onde a população humana utiliza as fontes d'água presentes principalmente para irrigação, captação de água para consumo doméstico e lazer. Os roedores visitam estes locais diariamente em suas atividades de deslocamento e de forrageamento (Fig.8).



Figura 8: Curso d'água localizado na área rural de Sumidouro, RJ, em região peridomiciliar. Trata-se de uma região endêmica de esquistossomose mansônica humana (A) onde são capturados exemplares de *N. squamipes* durante trabalhos de monitoramento (B).

A partir dos dados obtidos, sugeriu-se que este roedor pode potencializar a transmissão desta parasitose nas áreas endêmicas, sendo também capaz de transportar o *S. mansoni* para locais onde não há transmissão, criando novos focos e dificultando o controle da doença (D'ANDREA *et al.*, 2000); além disso, pode ser utilizado como um indicador biológico de focos naturais de transmissão (GENTILE *et al.*, 2006).

Nos estudos realizados em Sumidouro, foi observada a ocorrência de um pico crepuscular de emissão de cercarias, coincidente com o período de atividade do roedor, sugerindo a possibilidade de um processo adaptativo do *S. mansoni* a este hospedeiro (D'ANDREA *et al.*, 2002).

Em relação à helmintofauna presente em *N. squamipes*, MALDONADO JR. *et al.* (2006) encontraram neste roedor os nematódeos *Physaloptera bispiculata*, *Hassastrongylus epsilon*, *Syphacia venteli*, *Litomosoides chagasfilhoi*, o cestódeo *Raillietina sp.* e os trematódeos *S. mansoni* e *Echinostoma paraensei*. Também observaram não existir interação antagônica ou sinérgica entre o *S. mansoni* e as outras espécies de helmintos, sendo este parasito considerado um helminto bem estabelecido na comunidade natural do rato d'água.

Em relação ao parasitismo pelo *S. mansoni*, observou-se que este não afeta a sobrevivência do roedor nem reduz sua capacidade reprodutiva ou sua movimentação (D'ANDREA *et al.*, 2000).

Em suma, o entendimento da dinâmica populacional do *N. squamipes* e dos fatores que a influenciam parece ser de fundamental importância para a tomada de decisões no que diz respeito ao controle da esquistossomose, visto que esta é uma

espécie de grande interesse epidemiológico, por ser um importante reservatório silvestre do *S. mansoni* em várias regiões brasileiras (GENTILE *et al.*, 2012).

1.2.7 Relação Parasito-Hospedeiro

A resposta imune do hospedeiro induzida pela presença do parasito invasor é considerada o produto de um longo e dinâmico confronto coevolutivo entre ambas as espécies. O parasito invasor ocupa um nicho específico, como ocorre com as espécies de vida livre, mas, neste caso, em um micro-habitat do hospedeiro. A ecologia do parasito difere da de espécies de vida livre porque, em seu ambiente, o hospedeiro também precisa reagir de forma adaptativa, numa tentativa de controlar a infecção (GAUSE *et al.*, 2003).

Parasito e hospedeiro se esforçam para otimizar seus potenciais reprodutivos, e embora ambos necessitem da sobrevivência do hospedeiro, há um esforço constante por recursos limitados. É vantajoso para o hospedeiro produzir uma resposta imune que irá controlar o parasito, mas que não produza danos às suas próprias estruturas, e também é necessário preservar a sua capacidade de responder eficazmente a outros patógenos. Do ponto de vista do parasito, é vantajoso manter o hospedeiro vivo por tempo suficiente para que ele possa completar seu ciclo de vida, possivelmente suprimindo a resposta imune do hospedeiro ou, alternativamente, modificando-a para produzir uma resposta ineficaz (GAUSE *et al.*, 2003).

Schistosomas desenvolveram evolutivamente excelentes mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro. A principal consequência é que os schistosomas conseguem viver por longos períodos no interior de seus hospedeiros e tendem a provocar infecções crônicas e debilitantes, ao invés de doença aguda e fatal (DOENHOFF *et al.*, 1986).

Notavelmente, uma infecção esquistossomótica primária ocorre sem praticamente nenhuma resistência do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. De fato, ao longo do seu desenvolvimento desde esquistossômulo até verme adulto, os schistosomas impedem ativamente o reconhecimento imunológico por uma variedade de mecanismos, que incluem a indução de moléculas anti-inflamatórias (RAMASWAMY *et al.*, 2000), a incapacitação de células linfoides (ANGELI *et al.*, 2001) e o revestimento de suas superfícies com antígenos do

hospedeiro (LOUKAS *et al.*, 2001). Apesar destas estratégias iniciais de evasão, o sistema imunológico eventualmente reage contra os vermes, mas não consegue destruí-los. No entanto, ele irá oferecer proteção contra subseqüentes reinfecções.

Existem vários fenômenos enigmáticos associados à biologia dos schistosomas. Primeiramente, os vermes adultos habitam a corrente sanguínea dos hospedeiros vertebrados, que pode ser considerada um nicho ecológico extremamente hostil do ponto de vista imunológico. A sobrevivência dos vermes é assegurada pela sua capacidade de adquirir antígenos do hospedeiro, um mecanismo conhecido como disfarce antigênico (DOENHOFF *et al.*, 1986, KUSEL *et al.*, 2007), sendo os glicolipídios as principais moléculas do hospedeiro envolvidas nesta adaptação (MCLAREN e TERRY, 1982).

Em segundo lugar, o ovo do parasito induz uma resposta inflamatória no hospedeiro que, ao mesmo tempo em que pretende isolar o ovo dos tecidos adjacentes, evitando um maior dano tecidual, também auxilia a passagem do ovo através dos tecidos para alcançar o meio externo (DOENHOFF *et al.*, 1986).

Em terceiro lugar, os schistosomas são parasitos complexos, que apresentam várias fases de vida, cada uma delas ocupando um nicho anatômico diferente dentro do hospedeiro e expressando diferentes antígenos. Assim, diferentes respostas imunológicas são necessárias para eliminar cada fase de vida deste parasito (DOENHOFF *et al.*, 1986).

Em relação ao seu metabolismo, sabe-se que o *S. mansoni* requer glicose, colesterol, ferro, ácidos graxos essenciais, purinas, aminoácidos essenciais e vitaminas, os quais ele adquire a partir da corrente sanguínea do hospedeiro (VAN HELLEMOND *et al.*, 2006).

Adicionalmente, a hematofagia, que representa sua principal via de aquisição de nutrientes, é um processo que espolia o hospedeiro, podendo gerar anemias. O catabolismo da hemoglobina libera o grupo heme tóxico, que é neutralizado no intestino do verme através da sua cristalização em hemozoína. Cristais de hemozoína envolvem espontaneamente as superfícies de corpúsculos lipídicos neutros e crescem formando agregados esféricos característicos que são posteriormente regurgitados para a circulação e se acumulam no fígado do hospedeiro. TRUSCOTT *et al.* (2013) propuseram que a hemozoína seria capaz de modular importantes eventos imunopatogênicos no fígado durante a esquistossomose crônica.

1.2.8 Imunopatogênese

1.2.8.1 Granuloma

A característica histopatológica marcante da esquistossomose mansônica é o desenvolvimento de granulomas em torno de ovos maduros do parasito *Schistosoma mansoni*, que ficam presos no fígado e nos intestinos dos hospedeiros imunologicamente competentes (CHEEVER *et al.*, 1998).

Os granulomas são agregados bem circunscritos de células inflamatórias, compostos principalmente por eosinófilos, linfócitos e macrófagos, inseridos em uma matriz extracelular rica em colágeno (Fig.9) (PEARCE e MACDONALD, 2002).

O sítio anatômico predileto dos vermes adultos de *S. mansoni* nos hospedeiros vertebrados é a vasculatura mesentérica. Os ovos que não conseguem atravessar com sucesso a mucosa intestinal, no sentido do lúmen, ficam retidos nas camadas intestinais ou são levados pelo fluxo sanguíneo da veia porta para o fígado, onde ficam presos devido ao diâmetro insuficiente dos sinusoides (PEARCE, 2005).

Na esquistossomose mansônica, o principal papel da reação granulomatosa é o de proteger os tecidos do hospedeiro, isolando as toxinas secretadas pelo ovo. Antígenos do ovo são glicoproteínas imunogênicas para o hospedeiro, incluindo os ativamente secretados e os liberados após a morte da larva miracídio. Após a deposição dos ovos nos tecidos, estes são rapidamente cercados por infiltrados de células inflamatórias, resultando no granuloma (HAMS *et al.*, 2013).

Paradoxalmente, a resposta granulomatosa é também responsável pela patogênese da doença, causando inflamação acentuada, eosinofilia tecidual, deposição de colágeno, fibrose e hipertensão portal (ABATH *et al.*, 2006).

Além disso, o granuloma parece ser fundamental para a transmissão dos ovos viáveis ao facilitar o acesso destes ao lúmen intestinal para que sejam eliminados juntamente com as fezes para o exterior, completando o ciclo de vida do parasito (HAMS *et al.*, 2013).

Segundo LENZI *et al.* (1999), o granuloma esquistossomótico não deve ser considerado um simples emaranhado de células individuais e fibras, mas uma estrutura organizada, onde o arranjo tridimensional das fibras colágenas oferece

maior integridade ao tecido, distribui mais eficazmente os compostos solúveis e funciona como uma base estável para as células.

Os granulomas hepáticos possuem tamanho e composição celular variáveis, dependendo das fases evolutivas em que se encontram. Com relação às fases evolutivas, várias classificações já foram propostas.

Por exemplo, RASO e BOGLIOLO (1970) consideraram as seguintes fases na evolução dos granulomas: necrótico-exsudativa, exsudativa, produtiva e de cura por fibrose.

Segundo LENZI *et al.* (1998), os granulomas apresentam os seguintes estágios de maturação e de involução durante seu desenvolvimento: estágios pré-granulomatosos, subdivididos em pré-granulomatoso inicial e pré-granulomatoso exsudativo e seus subtipos; e estágios granulomatosos: granuloma exsudativo-produtivo, granuloma produtivo e granuloma involucional e seus subtipos. Segundo estes autores, as fases pré-granulomatosas têm um caráter lítico, preparando o espaço através da destruição do parênquima para a criação e a organização do granuloma. Nas fases granulomatosas, a adesão celular e a triagem desempenham um papel importante, visto que tipos celulares diferentes exibem graus distintos de adesão, organizando-se em padrões específicos e criando zonas diferentes na estrutura dos granulomas.

LINS *et al.* (2008) propuseram uma classificação das fases evolutivas dos granulomas hepáticos baseada na distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases. Os autores apresentaram uma classificação composta de duas fases pré-granulomatosas e três fases granulomatosas. São elas: pré-granulomatosa de reação inicial, caracterizada por um infiltrado inflamatório insipiente; pré-granulomatosa exsudativa, formando um infiltrado de células inflamatórias ao redor do ovo; granuloma necrótico-exsudativo, caracterizado por uma área de necrose entre o ovo e a camada de células inflamatórias; granuloma produtivo, rico em fibras colágenas, de aspecto circunferencial; e granuloma em fase de cura por fibrose, onde se observa uma faixa espessa de fibras colágenas entre o ovo e algumas células inflamatórias na periferia. A partir daí, o granuloma pode envolver até desaparecer ou gerar uma cicatriz.

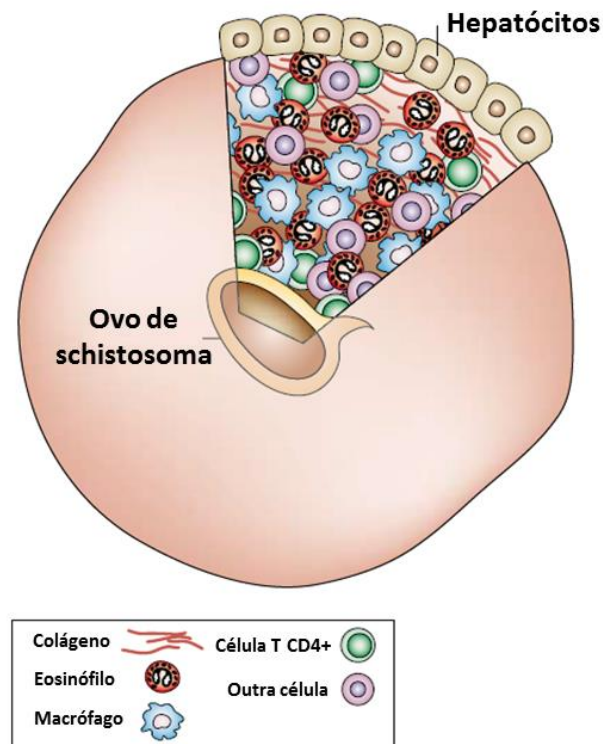


Figura 9: Modelo esquemático de granuloma esquistossomótico. No centro do granuloma, encontra-se o ovo do parasito, em torno do qual o granuloma é formado por várias células do sistema imune e fibras colágenas. Adaptado de PEARCE e MACDONALD (2002).

O processo de formação dos granulomas é complexo e dinâmico, podendo ser dividido em quatro fases: iniciação, acumulação, fase efetora e fase de resolução. Cada uma dessas fases envolve as células T, que são absolutamente necessárias para a formação da reação granulomatosa de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH). Durante a iniciação, macrófagos são atraídos pelo estímulo inflamatório persistente, e, atuando como células apresentadoras de antígenos (APCs), ativam linfócitos T CD4 +, iniciando a nucleação da lesão granulomatosa. Na acumulação, as células T CD4 + se acumulam no local e recrutam outras células efetoras, incluindo mais células T, macrófagos e eosinófilos, importantes para destruir o agente patogênico e reforçar a estrutura do granuloma. Durante a fase efetora, as células T CD4 + atuam através de mecanismos efetores diretos contra o parasito, bem como indiretamente através do recrutamento e modulação de outras células efetoras (CO *et al.*, 2004). Os eosinófilos são frequentemente encontrados nos granulomas e constituem por si só uma fonte de citocinas (HANNA *et al.*, 2005). Finalmente, uma vez que o agente patogênico tenha sido eliminado, a população de células infiltrantes é reduzida e a formação de tecido cicatricial é induzida. Nas fases

tardias da esquistossomose, os granulomas diminuem de tamanho, sendo que as citocinas TGF- β e IL-10 demonstraram desempenhar um papel regulador neste processo. A resolução dos granulomas termina em fibrose, que serve para “cimentar” o conteúdo do granuloma. Duas citocinas têm sido implicadas na fibrose granulomatosa, TGF- β e IL-13, ambas produzidas por uma população de células T residentes do granuloma (CO *et al.*, 2004).

1.2.8.2 Fibrose hepática

A fibrose é definida como uma deposição excessiva de colágeno e de outros componentes da matriz extracelular nos tecidos danificados, como consequência da ativação e da proliferação de fibroblastos e miofibroblastos em processos reparadores (WICK *et al.*, 2013).

É frequente nas infecções parasitárias. Por exemplo, o parasito *S. mansoni* exerce importantes efeitos sobre a morbidade e a mortalidade de seus hospedeiros, principalmente através do desenvolvimento de uma resposta inflamatória crônica e consequente formação de tecido cicatricial em torno das lesões causadas pelos ovos do parasito (ANDRADE, 2009).

Na esquistossomose mansônica, uma fase inflamatória aguda inicial é seguida por uma inflamação crônica e, finalmente, as células estreladas hepáticas, estimuladas por citocinas como a TGF- β , respondem aos antígenos do schistosoma e se transdiferenciam em miofibroblastos, produzindo quantidades excessivas de colágeno dos tipos I, III, IV, causando fibrose hepática (ANTHONY *et al.*, 2010).

Considerando que um desequilíbrio entre as respostas Th17 e Treg promove uma inflamação crônica, o desequilíbrio de Th1 / Th2 conduz a um aumento da produção de citocinas pró-fibróticas que induzem à migração, proliferação e ativação de fibroblastos, fibrócitos, células epiteliais, células endoteliais e células estreladas do fígado, que se transdiferenciam em miofibroblastos. Os miofibroblastos ativados, por sua vez, produzem maiores quantidades de matriz extracelular, resultando em fibrose (Fig.10) (WYNN, 2004).

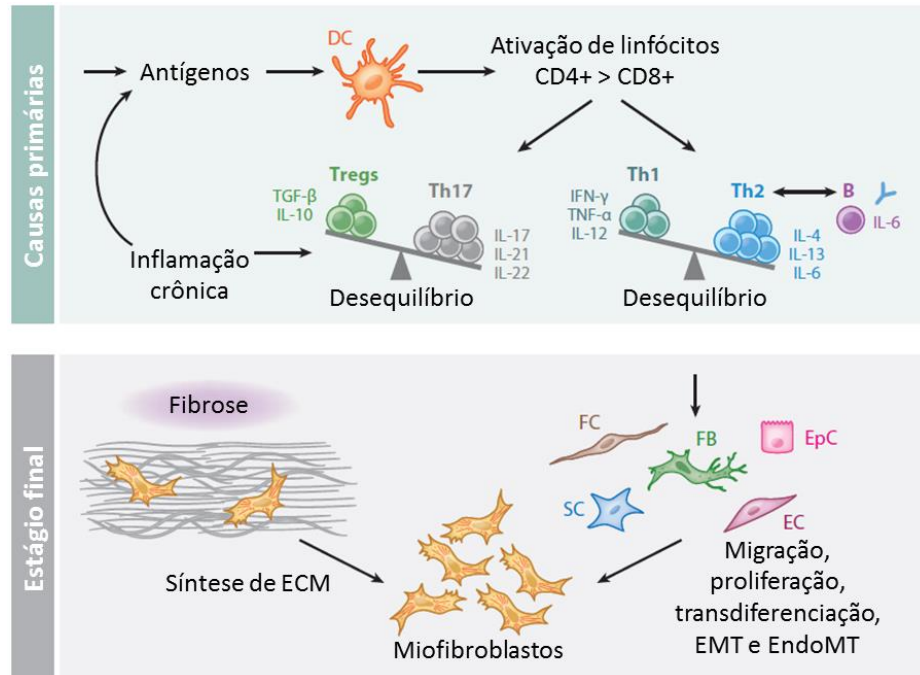


Figura 10: Resposta imune adaptativa na fibrose. A inflamação crônica associada a um perfil de resposta imune predominantemente Th2 leva a um aumento na produção de citocinas pró-fibróticas. Estas induzem à migração, proliferação e ativação de vários tipos celulares envolvidos na produção de componentes da matriz extracelular, o que resulta em fibrose tecidual no local da lesão inicial. Abreviaturas: (DC) células dendríticas; (Th) células T helper; (EMT) transição epitelial-mesenquimal; (EndoMT) transição endotelial-mesenquimal; (ECM) matriz extracelular; (FB) fibroblastos; (FC) fibrócitos; (EpC) células epiteliais; (EC) células endoteliais; (SC) células esteladas. Adaptada de WICK *et al.* (2013).

A ativação das células T e B leva à produção de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibróticas. Citocinas Th2, e, em particular, a IL-13 e seus receptores (IL-13Ra2) parecem desempenhar um papel-chave na fibrogênese hepática associada com a infecção esquistossomótica (WYNN, 2004).

O papel fibrogênico da interleucina-13 parece resultar de sua capacidade, em conjunto com a IL-4, para induzir a expressão da arginase em macrófagos. A arginase utiliza a L-arginina como substrato para produzir L-ornitina, que é convertida em prolina pela ornitino aminotransferase. A prolina é um aminoácido essencial, envolvido na produção de colágeno e, por conseguinte, no desenvolvimento de fibrose (PEARCE e MACDONALD, 2002).

É amplamente aceito que as células de Kupffer têm um papel na fibrogênese do fígado. Na fibrose hepática, o número de macrófagos aumenta e eles são encontrados em torno das áreas de danos nos tecidos e da fibrose. Macrófagos alternativamente ativados produzem prolina e arginase-1, que contribuem para a síntese de colágeno (WYNN, 2004).

Quatro fases foram sugeridas para explicar o processo de fibrose na esquistossomose. São elas: o recrutamento de fibroblastos e/ou a transdiferenciação das células estreladas hepáticas; a proliferação destas células; a secreção de moléculas da matriz; e a remodelação (GRIMAUD, 1987).

ANTHONY *et al.* (2010) realizaram experimentos *in vitro* com ovos viáveis de *S. mansoni* e observaram que os antígenos do ovo foram capazes de regular o processo de transdiferenciação das células estreladas hepáticas. O estudo da célula estrelada hepática (ou célula de Ito) e de suas interações com os antígenos derivados do parasito pode ser fundamental para a compreensão da patologia associada com a esquistossomose.

A infecção pelo *S. mansoni* invariavelmente resulta em fibrose no fígado do hospedeiro. Esta fibrose pode ser representada por pequenas áreas focais de inflamação crônica e excesso de matriz extracelular depositada em granulomas periovulares, distribuídos em números variáveis, na periferia da veia porta. Este resultado é encontrado em 90% da população infectada em áreas endêmicas. Por outro lado, uma minoria de indivíduos infectados desenvolve doença extensa, com numerosos granulomas ao longo de toda a extensão dos espaços porta. Esta última situação é dependente, sobretudo, de mudanças especiais na hemodinâmica, causadas por uma carga parasitária pesada, com a subsequente produção de numerosos ovos e representa uma forma grave de hepatopatia crônica, conhecida como fibrose de Symmers. As principais consequências funcionais são a hipertensão portal, seguida por esplenomegalia e circulação porto-sistêmica colateral, gerando varizes esofágicas que podem romper-se espontaneamente e levar o hospedeiro à morte (ANDRADE, 2009).

1.2.8.3 Imunologia

Em um modelo murino de infecção experimental, a injeção subcutânea de cercarias de *S. mansoni* em camundongos leva ao desenvolvimento de vermes adultos e à produção de ovos em torno de 4-5 semanas. A resposta imune inata e adaptativa precoce aos antígenos do verme adulto é dominada por citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (TNF α , IL-12 e IFN- γ). Seguindo esta reação inicial, as células T CD4 + entram na lesão e liberam citocinas como IL-2 e IFN- γ , iniciando a formação dos granulomas. Com a deposição dos ovos nos tecidos, a larva miracídio

libera antígenos solúveis do ovo (SEA), induzindo a uma rápida transição de perfil da resposta imune do tipo Th1 para Th2 (Fig.11) (LUNDY e LUKACS, 2013).

A resposta Th2 é caracterizada pelo aumento nos níveis de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, a produção de anticorpos por células B e o recrutamento de eosinófilos. Estes, por sua vez, são uma importante fonte de IL-4, servindo para manter a resposta imune protetora Th2 e para induzir as APCs por via alternativa a secretar outras citocinas (LUNDY e LUKACS, 2013). A mudança de perfil de resposta imune é acompanhada por alterações na celularidade do granuloma, com um intenso influxo de eosinófilos, macrófagos e fibroblastos em direção à lesão, o que resulta em granulomas maiores e em aumento da fibrose (Fig.11) (RUMBLEY *et al.*, 1998).

A resposta Th2 é vital para o hospedeiro, pois sua ausência está associada a uma doença letal caracterizada por inflamação hepática grave com lesão hepatocelular e necrose. Além disso, uma resposta Th2 bem estabelecida é necessária para precipitar, dentro de duas ou três semanas subsequentes da infecção, uma regulação para baixo das células T CD4+ e da imunopatologia associada, mecanismo conhecido como “imunomodulação” (Fig.11) (CHEEVER, 1997).

PERRIN e PHILLIPS (1989) demonstraram que as células T CD8 (linfócitos supressores) desempenham um papel importante no declínio da resposta inflamatória granulomatosa. Embora a resposta aos novos ovos recém-chegados aos órgãos seja menor, danos cumulativos ocorrem à medida que lesões mais antigas involuem, deixando cicatrizes fibrosas. Assim, as taxas de danos diminuem, mas o dano acumulado pode aumentar; este equilíbrio será determinado pela capacidade variável do hospedeiro para eliminar os vermes, inibir sua fecundidade, destruir os ovos e reparar os danos nos tecidos (CHEEVER *et al.*, 2002).

Estudos revelaram tal modulação como um fenômeno exclusivamente hepático, já que os granulomas intestinais formados em torno dos ovos maduros não alteram seu tamanho ou morfologia com o tempo (SILVA *et al.*, 2000).

Entretanto, respostas Th2 prolongadas contribuem para o desenvolvimento de fibrose hepática grave. A principal citocina de perfil Th2 responsável pela formação de fibrose é a IL-13 (PEARCE e MACDONALD, 2002).

A IL-10 regula tanto a resposta Th1 quanto a resposta Th2 em relação aos antígenos esquistossomóticos. A produção de IL-10 em resposta ao SEA tem sido atribuída às células T, células B e monócitos (LUNDY e LUKACS, 2013).

O pico de formação do granuloma ocorre entre 8 e 10 semanas de infecção (fase aguda). À medida que a infecção progride para a fase crônica (16-20 semanas após a infecção), a produção de citocinas e a celularidade diminuem, aumentando a produção de componentes fibróticos. O processo de imunomodulação é transitório, começando por volta do dia 90 após a infecção e terminando em torno de 120 dias após a infecção (Fig.11). Nesta ocasião, a histopatologia define os granulomas como típicos de fase crônica (RUMBLEY *et al.*, 1998).

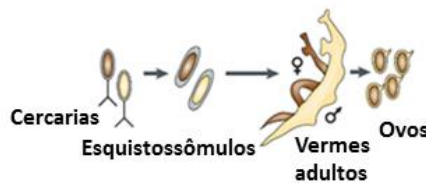
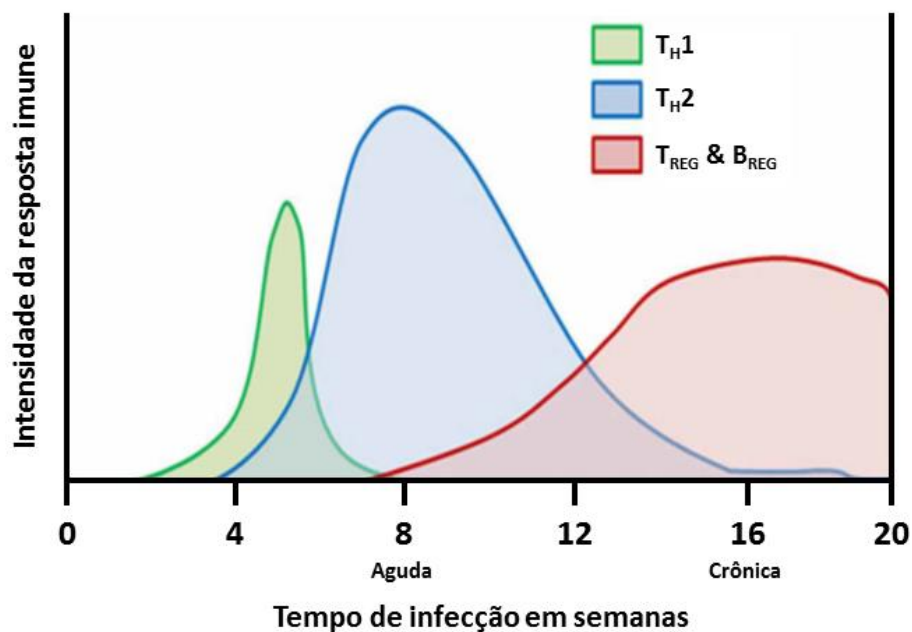


Figura 11: Linha do tempo das respostas mediadas por células T em modelo murino de esquistossomose mansônica. O pico da resposta Th1 ocorre em torno da quarta semana de infecção. A partir daí, inicia-se a oviposição, ocorrendo uma rápida mudança para o perfil de resposta imune Th2. O pico da resposta Th2 é observado na oitava semana de infecção. A imunomodulação, representada pelas respostas T_{reg} e B_{reg}, é caracterizada por uma diminuição da celularidade e aumento da fibrose. Adaptado de LUNDY e LUKACS, 2013.

A dinâmica da distribuição das células B e seus papéis durante a esquistossomose têm sido estudados. A resposta humoral ao *S. mansoni* é complexa, com algumas classes de anticorpos atuando na clearance do parasito, enquanto outras aumentam a resistência à reinfecção. Em seres humanos, a suscetibilidade à reinfecção tem sido associada a crianças jovens com a presença de IgM anti-esquistossômulo e anti-ovo. Anticorpos IgM e IgG2 podem atuar bloqueando a morte de esquistossômulos dependente de eosinófilos. Os anticorpos bloqueadores perdem-se lentamente com a idade, enquanto as respostas dos anticorpos IgE contra antígenos do verme adulto aumentam com a idade. A IgE parece desempenhar um papel importante na resistência do hospedeiro humano à reinfecção pelo *S. mansoni* (DUNNE *et al.*, 1992).

1.2.9 Modelos Experimentais

Modelos murinos de esquistossomose mansônica têm sido amplamente utilizados, pois permitem uma variedade de abordagens experimentais. Roedores, particularmente camundongos, são os animais de escolha, especialmente por sua fácil disponibilidade, fecundidade e suscetibilidade à infecção experimental (FARAH *et al.*, 2001).

Entretanto, apesar das infecções em murinos e em seres humanos produzirem inflamações granulomatosas com dinâmicas e composições celulares semelhantes, este modelo experimental apresenta algumas limitações (ABDULGHANI e HASSAN, 2010).

De acordo com ABATH *et al.* (2006), existem diferenças significativas entre os modelos murinos de esquistossomose e a patologia humana observada em áreas endêmicas. Por exemplo, as infecções experimentais murinas envolvem uma única exposição, enquanto a maioria das infecções humanas é adquirida gradualmente; a intensidade da infecção é geralmente elevada em modelos murinos, e geralmente baixa em humanos; hospedeiros experimentais murinos são infectados com isolados conhecidos de *S. mansoni*, enquanto a infecção humana ocorre com isolados naturais do parasito; o tempo e a dose da infecção na esquistossomose murina são definidos, no entanto, é difícil definir quando os indivíduos foram infectados; algumas características patológicas da infecção crônica são difíceis de reproduzir em camundongos, como no caso da fibrose de Symmers, que ocorre nas infecções

humanas crônicas graves; o background genético pode ser homogêneo em hospedeiros murinos, enquanto é heterogêneo em seres humanos; e, finalmente, a coinfeção com outros parasitos pode ser evitada em hospedeiros murinos enquanto é comum em seres humanos.

Desta forma, sob alguns aspectos, estes modelos experimentais não refletem as situações naturais. Faz-se necessário, portanto, considerar tais diferenças ao extrapolar os dados obtidos nos modelos experimentais para a patologia humana.

Por outro lado, roedores silvestres infectados naturalmente com o *S. mansoni* poderiam servir como modelos experimentais menos artificiais. Entre eles, *N. squamipes* tem sido apontado como um roedor que participa ativamente da transmissão do parasito *S. mansoni*. Além disso, este reservatório silvestre está sujeito às frequentes reinfecções no meio natural, reproduzindo o que ocorre com pessoas residentes em áreas endêmicas, que também sofrem múltiplas infecções durante o seu tempo de vida. Estudos de laboratório demonstraram que *N. squamipes* é altamente suscetível à esquistossomose experimental, apresentando uma relação bem equilibrada com o parasito, já que as infecções ao longo da vida não afetam sua sobrevivência ou sua saúde (SOUZA *et al.*, 1992). No entanto, diversos aspectos da infecção natural ou experimental em *N. squamipes* ainda necessitam ser estudados e explorados para um melhor entendimento deste modelo.

1.2.10 Manifestações Clínicas

A esquistossomose mansônica é uma doença de evolução crônica e de gravidade variável, dependente da resposta imunológica do hospedeiro às várias formas do parasito. A maioria dos indivíduos infectados pode permanecer assintomática, dependendo da intensidade da infecção. Segundo BINA e PRATA (2003), quando comparamos, na população geral, a intensidade da infecção, avaliada pelo número de ovos por grama de fezes, com as formas clínicas da doença, observamos uma relação direta entre um maior número de ovos de *S. mansoni* nas fezes e a ocorrência das formas graves da doença.

Embora a carga parasitária seja muito importante na patogênese primária da esquistossomose, outros fatores como background genético do hospedeiro,

condições de infecção e reinfecções e linhagens do parasito também desempenham um papel relevante (ANDRADE, 2009).

O quadro clínico da esquistossomose inclui uma fase inicial caracterizada por uma dermatite na área onde as cercarias penetraram na pele; uma fase aguda sistêmica causada pela migração dos vermes jovens (esquistossômulos) através do sistema circulatório; e finalmente, uma fase crônica, órgão específica, desencadeada pela postura dos ovos pela fêmea adulta do *Schistosoma mansoni*, onde os efeitos patogênicos da infecção se devem, principalmente, às reações imunológicas do hospedeiro contra os ovos do parasito que não são excretados e que ficam retidos nos tecidos, formando os granulomas (WHO, 2011).

A dermatite cercariana é considerada um fenômeno sazonal, pois é mais prevalente durante os meses mais quentes, quando um maior número de pessoas tem contato com águas contaminadas e quando as taxas de produção de cercarias no hospedeiro intermediário também estão altas (BICA, 2000).

A pneumonite larvar, causada pela migração dos esquistossômulos através da vasculatura pulmonar, é caracterizada por febre, tosse, eosinofilia marcante e infiltrado basilar na radiografia do tórax. Resolve espontaneamente em 2 a 4 semanas (BICA, 2000).

A fase aguda da doença é frequentemente assintomática. No entanto, a síndrome clínica conhecida como febre de Katayama tem sido cada vez mais diagnosticada no Brasil. Ocorre principalmente em indivíduos não imunes, provenientes de áreas urbanas e que foram expostos pela primeira vez a uma infecção maciça em uma área endêmica. Indivíduos residentes em áreas endêmicas podem se tornar sensibilizados aos antígenos do schistosoma já no útero como resultado de uma infecção materna, o que os torna menos suscetíveis a desenvolver uma resposta pró-inflamatória aguda na primeira infecção com schistossomas (MALHOTRA *et al.*, 1997).

A febre de Katayama ocorre cerca de 4 a 6 semanas após a penetração cercariana e o aparecimento dos sintomas coincide com o início da oviposição. Esta reação aguda tem sido atribuída a uma resposta imunológica humoral aos antígenos dos ovos e dos vermes adultos, com a formação e a deposição de imunocomplexos. Os sintomas incluem febre, calafrios, artralgias, mialgias, tosse seca, chiado no peito, dor abdominal e diarreia, além de erupções cutâneas, hepatomegalia, esplenomegalia e linfadenopatia. Eosinofilia periférica e altos níveis de IgG e IgE

geralmente estão presentes. Os sintomas desaparecem espontaneamente após algumas semanas na maioria dos pacientes (GRYSSELS, 2006).

As manifestações crônicas da doença incluem a forma intestinal, a forma hepática e a forma hepatoesplênica.

A forma intestinal pode não apresentar sintomas, mas o sangue nas fezes é uma queixa comum. Como o local definitivo dos vermes adultos do *S. mansoni* são as veias mesentéricas, os ovos do parasito migram através da parede intestinal, para serem eliminados juntamente com as fezes, provocando inflamações granulomatosas na mucosa, microulcerações e sangramento superficial. Os sinais e sintomas mais comuns são dor crônica ou intermitente e desconforto abdominal, perda de apetite e diarreia com ou sem sangue. A frequência dos sintomas está relacionada com a intensidade da infecção. Nos intestinos, a inflamação aguda progressivamente se torna crônica, com sintomas como hiperemia, pólipos e hemorragias internas sendo gradualmente substituídos por fibrose e espessamento dos tecidos (OLDS e DASARATHY, 2001).

A esquistossomose hepática tem início com uma reação aos ovos presos nos sinusoides hepáticos. Constitui a principal causa de hepatomegalia em crianças e adolescentes. Este tipo de hepatomegalia é encontrado em até 80% das crianças infectadas; é menos comum e menos intensa nos adultos. Na maioria dos casos, não há sinais aparentes de disfunção hepática. Um quadro de anemia pode estar associado à perda de sangue nas fezes (GRYSSELS, 2006).

A esquistossomose hepática crônica ou forma hepatoesplênica se desenvolve anos mais tarde no decurso da infecção, geralmente em jovens e adultos de meia-idade com uma longa e intensa infecção e, provavelmente, com alguma predisposição genética. A doença decorre de uma grande deposição de colágeno nos espaços periportais, levando à fibrose de Symmers. Esta fibrose leva à oclusão progressiva dos ramos da veia porta, hipertensão portal, esplenomegalia, circulação venosa colateral e varizes gastrointestinais, que podem sangrar e levar o indivíduo à morte (SOUZA *et al.*, 2011).

Com o desenvolvimento da hipertensão portal e de uma circulação colateral, os ovos podem se depositar em outros órgãos. Nos pulmões, podem chegar via circulação pulmonar, gerando granulomas que podem levar à hipertensão pulmonar. Os ovos também podem alcançar a medula espinhal e o cérebro gerando complicações neurológicas (BICA, 2000). Dentre estas, a mielorradiculopatia

esquistossomótica tem sido considerada a complicação mais comum e uma das formas ectópicas mais graves e incapacitantes da esquistossomose no Brasil (LAMBERTUCCI, 2010). O cone medular e a cauda equina são os locais mais comumente envolvidos, podendo provocar uma paraplegia flácida completa com arreflexia (ausência de reflexos), disfunção do esfíncter e distúrbios sensoriais (CAROD ARTAL, 2008).

1.2.11 Diagnóstico

A demonstração dos ovos do parasito em amostras de fezes constitui o padrão ouro para o diagnóstico da esquistossomose. A excreção dos ovos pode ser detectada cinco semanas após a infecção inicial. A técnica quantitativa de Kato-Katz é usada em estudos clínicos e epidemiológicos para estimar a intensidade da infecção e avaliar a carga parasitária. Os ovos são fáceis de detectar e de identificar por microscopia de luz, devido ao seu tamanho e forma característica, com uma espícula lateral. A técnica de Kato-Katz, apesar de apresentar uma especificidade de 100%, é pouco sensível, resultando em uma subestimação dos casos de infecção, com vários falso-negativos. Um aumento significativo na sensibilidade deste método pode ser alcançado quando se processa um maior número de amostras de fezes de um mesmo indivíduo. Isto é indicado principalmente quando a área estudada é de baixa endemicidade ou em casos de infecções de baixas intensidades, situações nas quais o número esperado de ovos nas fezes é baixo (RABELLO, 1997).

Segundo WHO (2011), as infecções esquistossomóticas podem ser classificadas em leves, quando apresentam de 1-99 ovos por grama de fezes; moderadas, de 100-399 ovos por grama de fezes; e pesadas, quando apresentam acima de 400 ovos por grama de fezes.

A biópsia da mucosa retal é mais sensível do que a detecção de ovos nas fezes para o diagnóstico da esquistossomose, especialmente quando a técnica de esmagamento é utilizada. Entretanto, este procedimento é mais indicado em ensaios clínicos com drogas, para avaliação da efetividade terapêutica (GOMES *et al.*, 2013).

A detecção de anticorpos pode representar uma ferramenta útil para o diagnóstico desta parasitose em viajantes ou migrantes que tenham visitado recentemente uma área endêmica, mas sua utilidade é limitada para a avaliação de

peças residentes nestas áreas. Os testes sorológicos disponíveis não distinguem infecções ativas de infecções passadas, nem permitem a diferenciação de infecções leves de infecções mais graves. Portanto, não são eficazes para documentar a cura, podendo permanecer positivos por anos após um tratamento bem-sucedido (“cicatriz sorológica”) (BERGQUIST, 1992).

Os testes de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assays) têm sido desenvolvidos para a detecção de antígenos circulantes no soro de pacientes infectados. Existe uma boa correlação entre a quantidade de antígenos circulantes e a carga parasitária; assim, estes ensaios podem ser utilizados para estimar a intensidade da infecção e para monitorizar a resposta ao tratamento, já que os níveis de antígenos no soro declinam rapidamente após uma quimioterapia bem sucedida. Testes de detecção de antígenos incluem: os antígenos somáticos do verme, tais como o antígeno catódico (CCA) e o antígeno anódico (CAA), que podem ser detectados e quantificados no soro dos indivíduos infectados; a detecção de DNA nas fezes por PCR e a detecção de coproantígenos por ELISA (BERGQUIST, 1992; VAN LIESHOUT *et al.*, 2000).

Uma ferramenta de diagnóstico particularmente útil é a ultrassonografia abdominal, que permite medições precisas do tamanho do fígado e do baço, a classificação da fibrose hepática e a detecção de complicações decorrentes da hipertensão portal. Além disso, é um exame não invasivo, oferece resultados rápidos, de baixo custo, com unidades portáteis disponíveis (PINTO-SILVA *et al.*, 2010).

1.2.12 Tratamento

As duas drogas anti-helmínticas utilizadas no tratamento da esquistossomose mansônica são o praziquantel (PZQ) e a oxamniquina. O PZQ é o medicamento mais amplamente utilizado e é considerado o tratamento de escolha para todas as espécies de schistosomas. A oxamniquina atua apenas contra o *S. mansoni* e é mais ativa contra os vermes machos. O PZQ apresenta um mecanismo de ação complexo; *in vitro*, produz contrações nos vermes adultos, seguidas de paralisia espástica e vacuolização rápida do tegumento, associadas a um influxo de íons de cálcio para o interior do verme. O tegumento danificado expõe os antígenos que serão reconhecidos como alvos para o ataque imune celular e humoral. O

tratamento da esquistossomose com estes dois anti-helmínticos tem se mostrado eficaz, embora não confira proteção contra as reinfecções (SHEKHAR, 1991).

Depois de uma dose única do PZQ, de 70 a 100% dos pacientes deixam de excretar ovos. Na maioria das pessoas não curadas, a contagem de ovos e as concentrações de antígenos são reduzidas em mais de 95%. Já que os vermes imaturos não são suscetíveis ao PZQ, o tratamento deve ser repetido de 4 a 6 semanas após os primeiros sintomas (GRYSSELS *et al.*, 2006).

Crianças em idade escolar (com idades entre 5-14 anos), provenientes de áreas endêmicas, têm sido o principal alvo das intervenções da quimioterapia preventiva. Isto se justifica pelo fato de apresentarem maior risco de infecção. Por causa da sua exposição recente à infecção e por estarem na fase inicial das lesões crônicas, as crianças também se tornam as mais beneficiadas com o tratamento, pois o tratamento durante a infância previne a morbidade crônica em anos posteriores (LAMBERTUCCI, 2010).

Em áreas de alto risco (onde a prevalência da infecção em crianças em idade escolar é de 50% ou mais), a população alvo da quimioterapia foi expandida para incluir todos os adultos. Em áreas de risco moderado (onde a prevalência da infecção em escolares é de 10% a 50%), foram incluídos os grupos de risco, bem como as pessoas ocupacionalmente expostas ao risco de infecção (WHO, 2011).

O grau de prevalência da infecção em uma área endêmica é utilizado para determinar a frequência do tratamento. Em áreas de alta prevalência, por exemplo, a frequência recomendada é de uma vez por ano, com intervalos maiores para as áreas de médias e baixas prevalências. O impacto do tratamento em intervalos regulares excede ao da administração única do praziquantel e está significativamente associado com uma progressiva redução dos indicadores associados à doença. Os principais resultados incluem o controle da morbidade e a prevenção ou redução do risco de desenvolvimento de novas lesões; redução da mortalidade, melhoria nas funções cognitivas, especialmente entre as crianças, e aumento da produtividade no trabalho (WHO, 2011).

A resposta à terapia é avaliada principalmente pela ausência de ovos viáveis nas fezes e pela melhoria ou mesmo resolução da hepatomegalia e da fibrose periportal, observadas na ultrassonografia. A cura parasitológica exige a demonstração do desaparecimento total dos ovos viáveis nas amostras de fezes em

três e seis meses após o tratamento, na ausência de novas exposições em águas contaminadas (SHEKHAR, 1991).

A resistência à quimioterapia é um tema que apresenta crescente preocupação. Esta varia de acordo com a fase de desenvolvimento da esquistossomose, a espécie de parasito, sua origem geográfica, cepa, virulência e fatores relacionados ao hospedeiro, como sexo, idade e, principalmente, status imunológico (EL RIDI e TALLIMA, 2013).

A mudança no perfil da doença em áreas endêmicas exige resultados duradouros que só podem ser obtidos através de uma proteção de longo prazo envolvendo a vacinação. A associação entre quimioterapia e vacinação poderá reduzir a morbidade global e limitar os impactos das reinfecções.

1.2.13 Controle

A quimioterapia é considerada uma ferramenta eficaz para o controle das infecções por helmintos. Porém, melhorias no abastecimento doméstico de água, no saneamento ambiental, nas habitações, no acesso à educação sanitária e aos serviços de saúde devem ser integradas aos programas de controle e de eliminação destas infecções (GAZZINELLI *et al.*, 2012).

O controle da esquistossomose se baseia em intervenções que visam (i) o controle do parasito no hospedeiro vertebrado e (ii) o controle do hospedeiro intermediário caramujo no ambiente, com o objetivo de diminuir a morbidade e reduzir a transmissão (WHO, 2011).

Em áreas onde animais reservatórios silvestres atuam na transmissão da esquistossomose, faz-se necessário considerar sua contribuição para a epidemiologia da doença, traçando medidas que visem prevenir a contaminação dos ambientes aquáticos com os ovos do parasito (WHO, 2011).

O saneamento ambiental cria condições que reduzem a proliferação e a contaminação dos hospedeiros intermediários, com a consequente diminuição do contato do homem com caramujos infectados. As principais medidas de saneamento ambiental utilizadas para o controle da esquistossomose são: aterro, drenagem ou retificação de coleções hídricas; revestimento e canalização de cursos d'água; limpeza e remoção da vegetação marginal e flutuante; abastecimento de água para consumo humano; esgotamento sanitário; controle do represamento de águas;

correção de sistemas de irrigação e melhoria da infraestrutura sanitária (BRASIL, 2014).

O tratamento seletivo com moluscidas deve ser instituído apenas em determinadas circunstâncias, como, por exemplo, em corpos d'água infestados de caramujos, nos principais pontos de contato humano com a água. A Niclosamida é o único moluscida disponível comercialmente. Apesar de biodegradável, seus "efeitos adversos" incluem a morte de muitas espécies de peixes, além da população-alvo de caramujos. Além disso, sua utilização é limitada pelo alto custo (BRASIL, 2008).

Informações espaciais, epidemiológicas e ecológicas são essenciais para o controle da esquistossomose porque todos os três componentes da doença (hospedeiros vertebrados, parasitos e hospedeiros intermediários) devem convergir no espaço e no tempo para que a transmissão ocorra. A utilização das tecnologias de sistemas de informação geográfica (SIG) e de sensoriamento remoto (SR) tem sido fundamental para a identificação das áreas de risco, a fim de priorizar subsequentes intervenções dos programas de controle (KLOOS *et al.*, 1998).

O SR utiliza a tecnologia de sensores de imagem a bordo de satélites, principalmente para a aquisição de dados ambientais relacionados à transmissão da esquistossomose, como vegetação, temperatura, uso da terra, coleções de água, etc. Já os SIG compreendem coleções organizadas de hardware, software e dados geográficos, contendo informações como características demográficas e status socioeconômico, acesso à água e ao saneamento adequado, nível de escolaridade e higiene das comunidades (SIMOONGA *et al.*, 2009).

1.3 CORPÚSCULOS LIPÍDICOS

1.3.1 Aspectos Gerais

Os corpúsculos lipídicos (CLs), também conhecidos como gotas lipídicas, inclusões lipídicas, esferossomas, oleossomas ou adipossomas, são organelas celulares ricas em lipídios. Estas organelas foram conservadas evolutivamente e são encontradas desde procariotos, como bactérias e leveduras, até organismos pluricelulares complexos, como plantas e mamíferos (SUZUKI *et al.*, 2011; WALTHER e FARESE JR, 2012).

Inicialmente, foram considerados apenas como depósitos de lipídios inertes com pouca relevância funcional. Porém, com o avanço das técnicas de biologia celular e molecular, vêm sendo vistos como organelas versáteis e multifuncionais envolvidas em diversos mecanismos celulares e processos fisiológicos (GUO *et al.*, 2009).

Os CLs atuam como depósitos de lipídios neutros que podem ser mobilizados para a geração de energia por β -oxidação, ou para a síntese de membranas e produção de moléculas essenciais derivadas de lipídios, tais como lipoproteínas, sais biliares ou hormônios (DIGEL *et al.*, 2010). Além destas, estão implicados em várias outras funções celulares, como armazenamento e degradação de proteínas (WELTE, 2007) e replicação viral (HERKER e OTT, 2011), estando estes processos ligados a condições fisiológicas e patológicas.

Estas organelas podem ainda estar envolvidas na inflamação. Por exemplo, nas células do sistema imune, tais como eosinófilos, neutrófilos e macrófagos, os CLs constituem sítios de síntese de mediadores lipídicos eicosanoides, sendo formados no citoplasma em resposta às doenças inflamatórias e infecciosas (MELO *et al.*, 2011, 2015).

1.3.2 Estrutura e Composição

Os CLs são organelas geralmente esféricas, compostas por um núcleo contendo lipídios neutros e proteínas, envolvido por uma monocamada de fosfolipídios, com proteínas associadas. Desta forma, em contraste com as organelas citoplasmáticas que são delimitadas por uma membrana clássica, constituída por uma bicamada lipídica, os CLs são revestidos apenas por uma hemimembrana de fosfolipídios. Esta característica torna os CLs facilmente identificáveis à microscopia eletrônica de transmissão (MET), sem a necessidade do uso de marcadores para esta organela (Fig.12) (BOZZA *et al.*, 2007; MELO *et al.*, 2011; MELO e DVORAK, 2012).

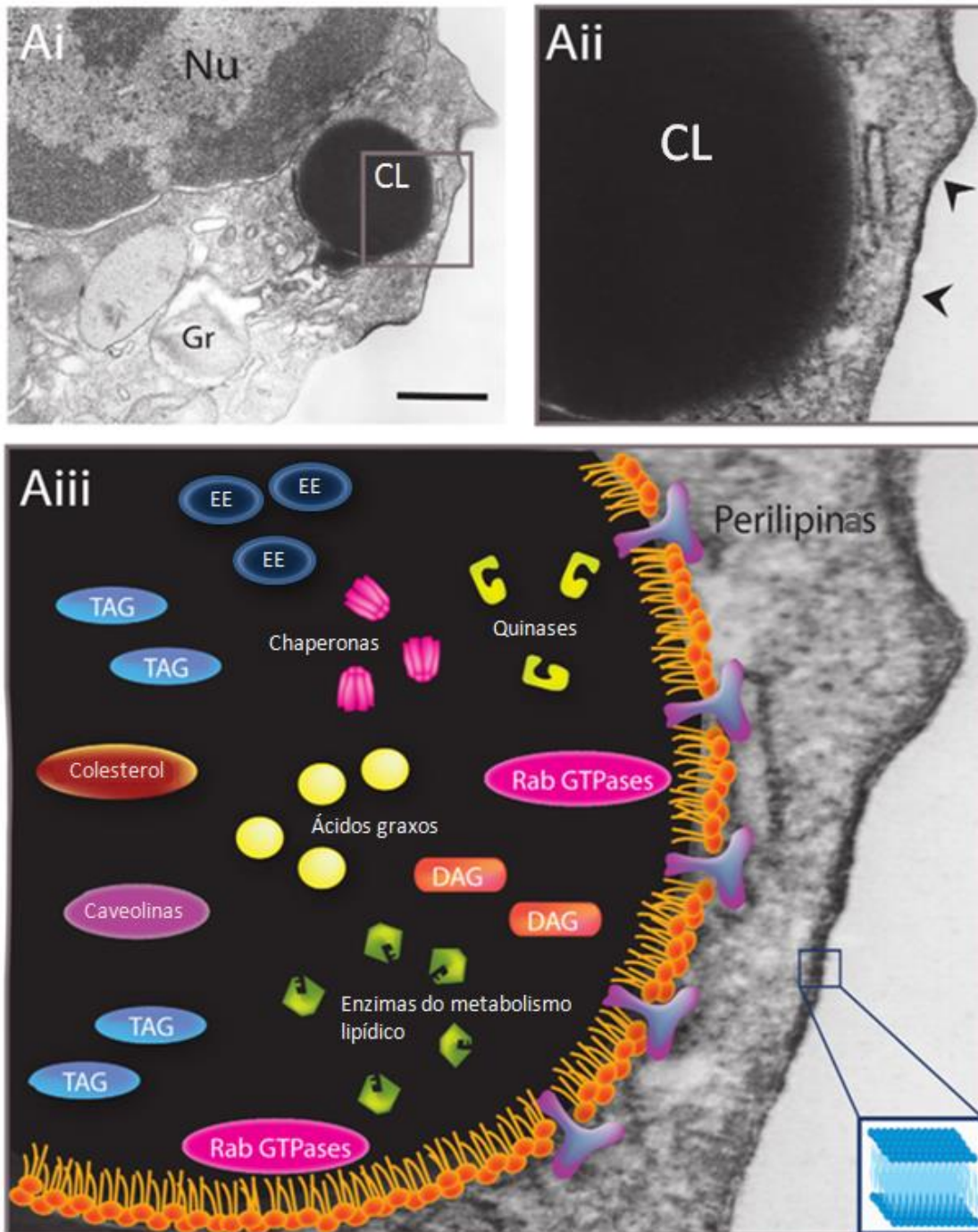


Figura 12: Estrutura e composição de corpúsculo lipídico (CL). Esta organela foi observada dentro de um eosinófilo humano em diferentes aumentos (Ai-Aiii) por microscopia eletrônica de transmissão (MET). O CL, o qual parece intensamente elétron-denso nesta célula, é delimitado por uma monocamada de fosfolipídios, diferentemente da membrana plasmática, que possui uma dupla camada de fosfolipídios (cabeças de seta em Aii). Proteínas estruturais da família perilipina estão associadas com a superfície do CL, enquanto que o núcleo contém vários esterol ésteres (EE), triacilgliceróis (TAG), diacilgliceróis (DAG) e colesterol, além de proteínas como as Rab Gtpases, enzimas do metabolismo lipídico, quinases, caveolinas e chaperonas. Nu= núcleo; Gr= grânulo; Barra de escala= 600 nm. Adaptado de MELO e DVORAK, 2012.

Quando observados à MET, os CLs apresentam elétron-densidades variáveis. Durante o processamento do material para MET, o tetróxido de ósmio é utilizado na contrastação e irá definir o padrão de elétron-densidade. Este metal pesado possui forte afinidade por fosfolipídios, sendo que quando os CLs são ricos em fosfolipídios, apresentam-se elétron-densos, enquanto que os ricos em lipídios neutros mostram-se mais elétron-lúcidos. Vale salientar que a elétron-densidade, assim como o tamanho e o número dos CLs no interior de uma célula dependem de estímulos externos que agem sobre esta, influenciando sua constituição (MELO *et al.*, 2011; MELO e DVORAK, 2012). O princípio da afinidade pelo tetróxido de ósmio também é utilizado em técnicas para observação de CLs por microscopia de luz convencional (Fig.13).

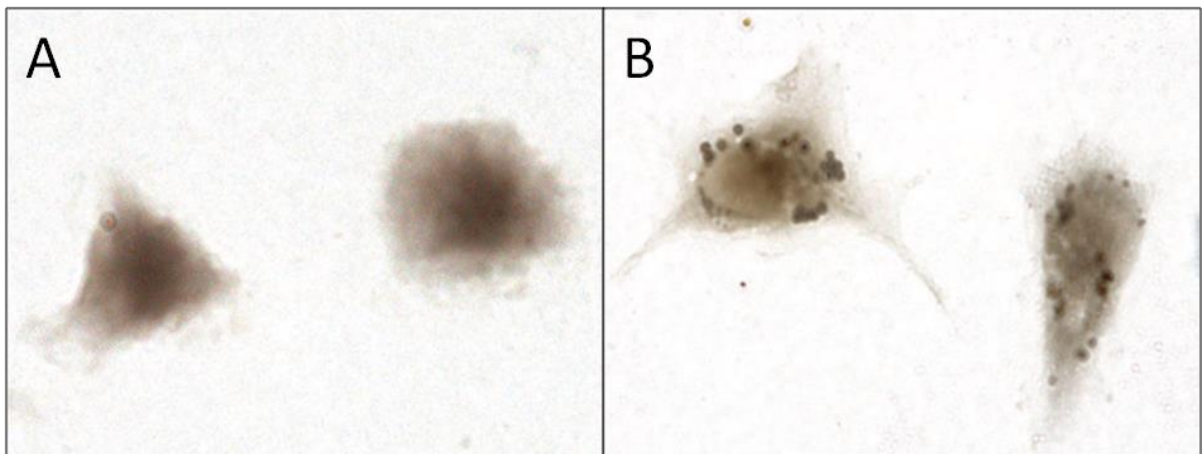


Figura 13: Macrófagos peritoneais isolados de camundongos cultivados ou não com *Trypanosoma cruzi*. A formação dos corpúsculos lipídicos foi evidenciada por coloração com tetróxido de ósmio. Enquanto as células não infectadas (A) apresentaram um pequeno número de CLs, as células infectadas (B) apresentaram números aumentados destas organelas, identificadas como pontos redondos marrons. Os núcleos dos macrófagos foram contracolorados com DAPI. Barra de escala= 10 μ m. Adaptado de D'ÁVILA *et al.*, 2012.

Corantes hidrofóbicos com afinidade por lipídios neutros também podem ser utilizados para obter imagens de CLs por microscopia de luz. Na coloração com o corante Oil Red O (ORO), por exemplo, os CLs podem ser facilmente visualizados em campo claro, corados em vermelho (Fig.14) ou por microscopia de fluorescência, onde aparecem em verde, devido à absorvância do corante em 560 nm (KOOPMAN *et al.*, 2001).

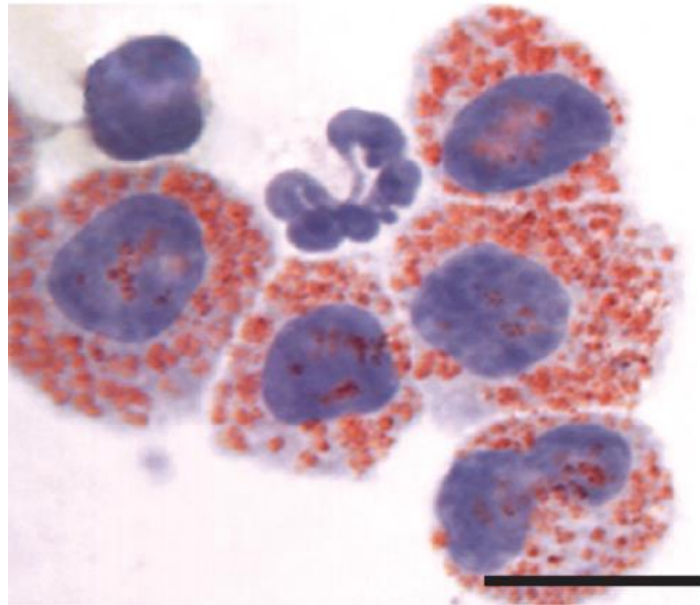


Figura 14: Macrófagos murinos ricos em corpúsculos lipídicos. As células foram coradas com Oil Red O e os núcleos foram contracorados com Hematoxilina e visualizadas em campo claro. Adaptado de MELO *et al.*, 2011. Barra=6 μ m.

A presença de estruturas internas tem sido relatada no núcleo dos CLs, tais como membranas derivadas do retículo endoplasmático (RE), que podem ser visualizadas através de microscopia eletrônica e que provavelmente refletem a compartimentalização entre os ésteres lipídicos (WAN *et al.*, 2007). Linhas concêntricas com aparência de casca de cebola observadas em microscopia eletrônica de criofratura sugerem a presença de camadas de ésteres do colesterol em CLs de mamíferos (TAUCHI-SATO *et al.*, 2002). As membranas internas e os ribossomos identificados em seus núcleos aumentam ainda mais a complexidade morfológica e funcional destas organelas (WELLER *et al.*, 1991; DVORAK *et al.*, 1992; MELO *et al.*, 2006; WAN *et al.*, 2007).

Quanto à sua composição, os CLs apresentam uma variedade de moléculas. Basicamente, os lipídios neutros presentes no núcleo são ésteres do colesterol e triglicerídeos, cuja quantidade relativa varia entre os tipos celulares e seu entorno é estruturado por fosfolipídios (POL *et al.*, 2014).

Diversos tipos de proteínas são encontrados nos CLs presentes nas células de mamíferos, como enzimas envolvidas na síntese de lipídios, proteínas envolvidas no metabolismo dos ésteres do colesterol, proteínas relacionadas ao tráfego de membrana, como as proteínas da família Rab Gtpases, e proteínas envolvidas na sinalização celular como as proteínas quinases (BRASAEMLE *et al.*, 2004;

FUJIMOTO *et al.*, 2004). As primeiras proteínas a serem reconhecidas como constitutivamente associadas aos CLs foram as proteínas da família PAT (perilipina, adipofilina ou ADRP e TIP47), agora renomeadas como proteínas da família perilipina (perilipinas 1-3, respectivamente); estas regulam a formação, o crescimento e a lipólise dos CLs (KIMMEL *et al.*, 2010). Acredita-se que a perilipina 2/ADRP possa estar associada aos estágios iniciais da formação dos CLs, agindo como um transportador de ácidos graxos da membrana plasmática ou do citosol para a periferia destas organelas (IMAMURA *et al.*, 2002) e que a perilipina 1 estaria envolvida em processos mais tardios da maturação destas estruturas, onde o seu acesso às lipases na periferia dos corpúsculos levaria à mobilização de lipídios neutros para os CLs (BRASAEMLE *et al.*, 2000).

Os CLs podem aumentar de tamanho na medida em que a célula continua a armazenar lipídios neutros. Alguns pesquisadores defendem a fusão entre CLs altamente móveis (WELTE, 2009), enquanto outros acreditam que o CL seja capaz de sintetizar lipídios através de enzimas presentes na sua superfície (DIGEL *et al.*, 2010).

1.3.3 Biogênese e Formação

Mecanismos hipotéticos sobre a biogênese dos CLs em vários tipos celulares reconhecem que estes e o retículo endoplasmático (RE) se encontram intimamente relacionados e, provavelmente, os CLs derivam desta organela. Os modelos propostos para a sua biogênese envolvem transferência de lipídios e proteínas do RE (WAN *et al.*, 2007; BOZZA *et al.*, 2009).

Três principais modelos têm sido propostos (Fig.15). No "modelo de brotamento", as enzimas envolvidas no metabolismo dos lipídios se acumulam em domínios específicos do RE, favorecendo assim a síntese de lipídios neutros nestas regiões, formando uma massa de lipídios hidrofóbica entre os dois folhetos da bicamada do RE. Depois de atingir um determinado tamanho, os CLs nascentes associados às proteínas brotam do RE e são circundados pela camada citoplasmática da membrana do RE (Fig.15 A) (MURPHY, 2001).

Um segundo modelo foi proposto. Baseados em observações de microscopia eletrônica de imunocriofatura, ROBENEK *et al.* (2006) sugeriram que a formação dos corpúsculos ocorreria de preferência paralelamente e não dentro do RE; e um

modelo de “eggcup” foi proposto. De acordo com este modelo, os CLs seriam formados dentro de invaginações do RE particularmente enriquecidas com perilipina 2/ADRP, que atuaria na transferência de lipídios do RE para os CLs nascentes (Fig.15 B).

WAN *et al.* (2007) propuseram um modelo alternativo de biogênese, no qual o CL nascente acomoda proteínas associadas e proteínas transmembranares dentro da região central através da incorporação de múltiplos giros das membranas do RE (Fig.15 C).

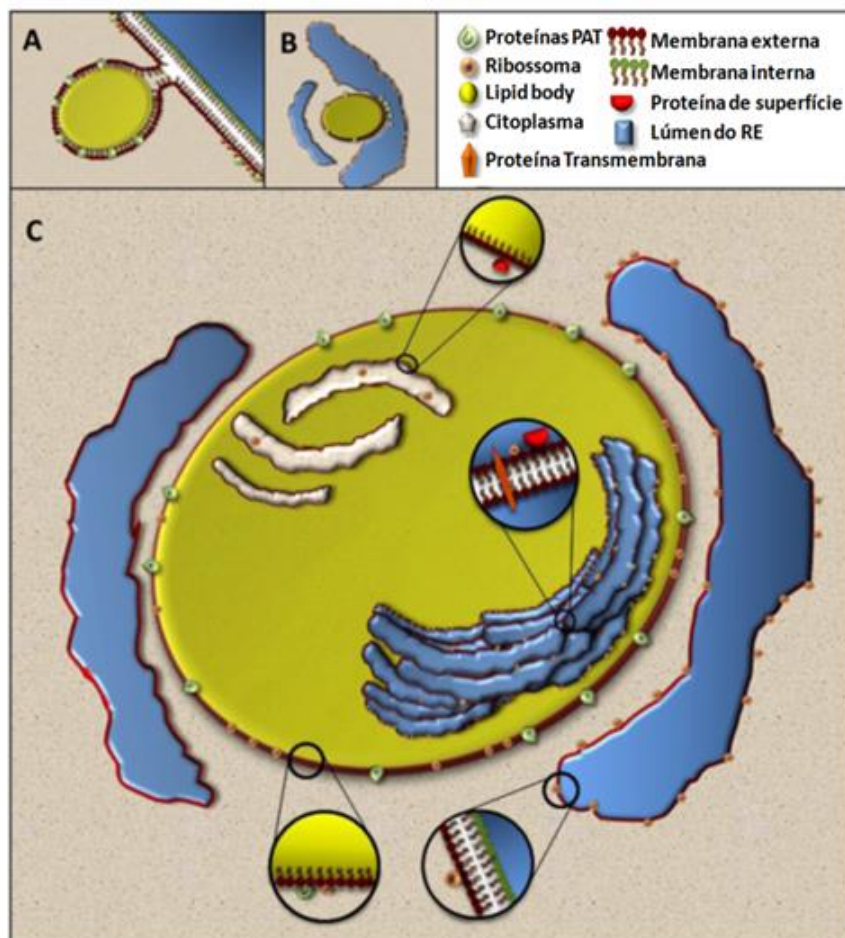


Figura 15: Biogênese e estrutura dos corpúsculos lipídicos. (A) Modelo de “Brotamento”; (B) Modelo de “Eggcup”; (C) Modelo proposto por WAN *et al.* (2009). Adaptado de BOZZA *et al.* (2009).

No momento, nenhum destes modelos pode ser definitivamente aceito ou refutado. Portanto, o estudo da biogênese dos CLs, juntamente com uma análise mais precisa de seus constituintes, são importantes para a compreensão das funções e do papel fisiológico dessas organelas. MELO *et al.* (2013) utilizaram a tomografia eletrônica automatizada, técnica que permite a observação em três

dimensões (3D) da célula e de suas organelas por MET, para estudar a arquitetura tridimensional dos CLs em alta resolução. A aplicação desta técnica revelou um intrincado sistema de membranas dentro dos CLs. A reconstrução computacional mostrou que as membranas são organizadas como uma rede de túbulos semelhantes ao RE (Fig.16). Os achados deste estudo explicam como proteínas ligadas à membrana interagem e estão espacialmente distribuídas no interior dos CLs, além de explicarem a biogênese dos CLs através da incorporação de membranas citoplasmáticas do RE, ao invés da visão convencional de que os CLs emergem entre as camadas do RE.

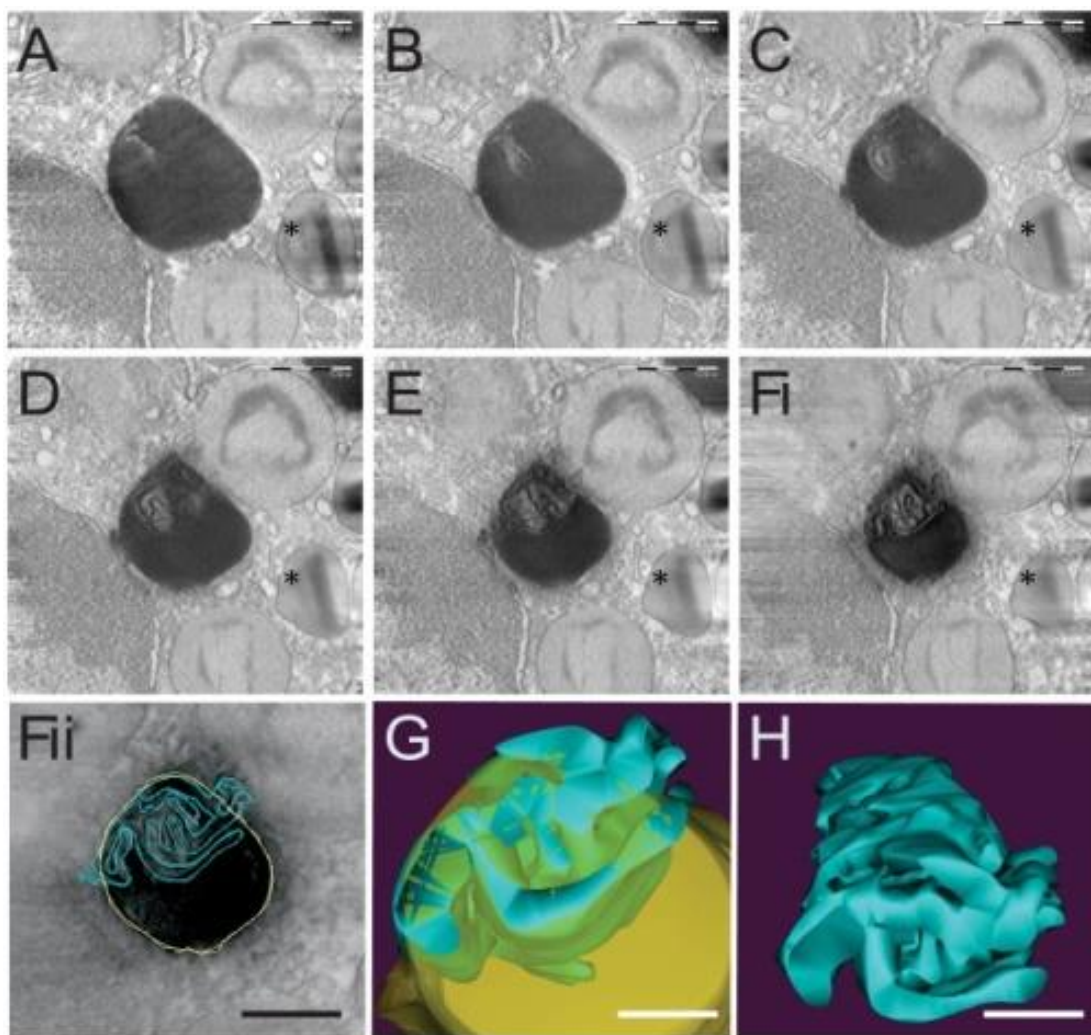


Figura 16: Imagens obtidas por tomografia eletrônica revelam membranas no interior do corpúsculo lipídico (CL) (A–F). Secções seriadas digitais, com 4 nm de espessura, de um CL no citoplasma de eosinófilo humano. Um grânulo específico do eosinófilo é indicado por (*). O CL e suas membranas internas foram contornados manualmente em amarelo e azul, respectivamente, como mostrado em Fii, e um modelo computacional em 3D é mostrado em (G) e (H). As membranas do CL são vistas como túbulos interconectados (H). Barra de escala, 500 nm (A–Fi); 400 nm (Fii); 300 nm (G, H). Adaptado de MELO *et al.* (2013).

A formação dos CLs é realizada por mecanismos complexos, regulados pela atividade de enzimas e proteínas estruturais. Por exemplo, em mamíferos, pelo menos 11 acil-CoA sintetases (ACSSs) podem ativar os ácidos graxos de cadeia longa e iniciar a síntese de lipídios neutros (WATKINS *et al.*, 2007). Na outra extremidade da via, em seres humanos, pelo menos 12 genes codificadores de três famílias diferentes de aciltransferases produzem enzimas capazes de catalisar a última etapa da síntese de lipídios neutros (STURLEY e HUSSAIN, 2012). Tal complexidade provavelmente reflete o importante significado fisiológico dos CLs.

A formação dos CLs pode ser mediada pela ativação da proteína C quinase (PKC – *protein kinase C*) (WELLER *et al.*, 1991) e da fosfolipase C, as quais participam da mobilização e do depósito de proteínas e lipídios no interior das células; em especial, os ácidos graxos cis polinsaturados, como o ácido araquidônico (AA), o ácido oleico (AO) e diglicerídeos (BOZZA *et al.*, 1997). Este mecanismo também pode ser desencadeado em resposta a agentes indutores específicos como o fator ativador de plaquetas (PAF - *platelet activating factor*), que induz a PKC à formação de CLs (WELLER *et al.*, 1991).

Também pode ocorrer independentemente de lipídios exógenos como lipoproteínas de baixa densidade (LDL- *low density lipoprotein*) e de maneira dependente de citocinas como o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), eotaxina-1/CCL11 [Eotaxin 1/ Chemokine (CC motif) ligand 11 - eotaxina 1 / ligante 11 de quimiocina de motivo CC] e RANTES/CCL5 [*regulated upon activation, normal T cell expressed and presumably secreted* / Chemokine (CC motif) ligand 5 - ligante 5 de quimiocina de motivo CC]; ou ainda pode ser induzida por lipopolissacarídeo (LPS) (BOZZA *et al.*, 1996a; BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001; PACHECO *et al.*, 2002).

1.3.4 Interação Com Outras Organelas

As relações dos CLs com outros compartimentos celulares e suas interações parecem ter importância fisiológica. Os CLs de todas as células eucarióticas interagem com o retículo endoplasmático (RE) e esta interação pode ser a chave para a compreensão da biossíntese destas organelas (ZWEYTICK *et al.*, 2000, WAN *et al.*, 2007), conforme discutido acima.

Os CLs também são encontrados em estreita proximidade com mitocôndrias e peroxissomas. Os ácidos graxos liberados pela lipólise, que ocorre na superfície do CL, são utilizados para β -oxidação e geração de energia (STURMEY *et al.*, 2006).

A simples justaposição da superfície do CL com a membrana de outras organelas pode não ser suficiente para o transporte eficiente de lipídios. Proteínas de transporte podem funcionar nos locais de contato das membranas, mas a formação transitória de uma estrutura de hemifusão entre membranas adjacentes pode representar um mecanismo adicional (MURPHY *et al.*, 2009).

1.3.5 Corpúsculos Lipídicos e Patologias

1.3.5.1 Corpúsculos lipídicos e doenças metabólicas

Para muitas células e organismos, o abastecimento de energia proveniente do ambiente varia bastante, por isso a capacidade de armazenar energia proporciona uma vantagem evolutiva competitiva. Apesar dos CLs serem encontrados em quase todos os tipos celulares de mamíferos, as células mais especializadas no acúmulo de lipídios são os adipócitos, nos quais os CLs ocupam a maior parte do citoplasma. O armazenamento de energia e o catabolismo nestes compartimentos são altamente regulados por hormônios e vias de sinalização (FARESE JR e WALTHER, 2009; FUJIMOTO e PARTON, 2011).

Quando as células precisam de lipídios para gerar energia ou para realizar outras funções, a lipólise é ativada para mobilizar estes substratos. No tecido adiposo dos mamíferos, a lipólise é induzida por catecolaminas durante o jejum ou o exercício físico (ZECHNER *et al.*, 2009).

Muitas doenças metabólicas são caracterizadas pelo depósito excessivo de lipídios nos CLs. Ao compartimentalizar os lipídios, os CLs atuam como “tampões”, minimizando os efeitos tóxicos de uma quantidade excessiva de lipídios dentro das células. No entanto, em muitos casos, a deposição excessiva de lipídios pode exceder a capacidade das células e conduzir à disfunção denominada lipotoxicidade (SCHAFFER, 2003). Lipídios não esterificados como o colesterol ou os ácidos graxos livres e seus derivados podem desencadear respostas inflamatórias que resultam em danos teciduais, fibrose e falência do órgão (WALTHER e FARESE JR, 2012).

Em doenças tais como obesidade, aterosclerose e esteatose hepática, a quantidade de lipídios excede a capacidade celular para armazená-los e para amortecer seus efeitos tóxicos.

Além disso, o acúmulo de lipídios no interior de leucócitos é observado em várias condições inflamatórias, infecciosas e neoplásicas, como aterosclerose (ROSS, 1995), sepsis bacteriana (PACHECO *et al.*, 2002), síndrome da angústia respiratória aguda (SALLUH *et al.*, 2007), inflamação pulmonar alérgica (MESQUITA-SANTOS *et al.*, 2006) e artrite reumatoide (BOZZA *et al.*, 1996).

1.3.5.1.1 Esteatose hepática

A doença hepática gordurosa não alcoólica ou esteatose hepática tornou-se extremamente comum nos países industrializados, afetando mais de um terço da população mundial. Este notável aumento na prevalência da esteatose hepática coincide com a atual epidemia de obesidade (MCCULLOUGH, 2006). Nos indivíduos obesos, as taxas de lipólise nos adipócitos estão constitutivamente aumentadas, resultando em níveis elevados de ácidos graxos livres na circulação, sendo armazenados como triacilgliceróis (TGs) nos CLs de células musculares esqueléticas e de hepatócitos (GREENBERG *et al.*, 2011).

A esteatose hepática inclui um espectro de alterações histopatológicas, que vão desde uma esteatose simples até uma esteatohepatite não alcoólica, podendo evoluir para fibrose, cirrose e carcinoma hepatocelular (KUCERA e CERVINKOVA, 2014). Sua patogênese está intimamente relacionada com a síndrome metabólica e com a resistência à insulina, que gera hiperglicemia e hiperinsulinemia, inibindo a β -oxidação dos ácidos graxos e promovendo a lipogênese no fígado (LISTENBERGER *et al.*, 2003).

Os CLs dos hepatócitos são tipicamente multiloculares e sua formação e consumo são dinâmicos na fisiologia normal. O acúmulo anormal de CLs caracteriza a esteatose hepática. Esta é histologicamente definida pela presença de uma esteatose que atinja mais de 5% dos hepatócitos, independentemente de se tratar de uma esteatose macrovesicular, microvesicular ou mista (KLEINER *et al.*, 2005).

A esteatose se desenvolve ao longo de anos, como resultado da associação de diferentes fatores de risco e envolve diferentes graus de suscetibilidade genética. Hábitos alimentares, sedentarismo, estresse crônico e estilo de vida são os

principais fatores ambientais que determinam a manifestação e a gravidade da doença (BODEN *et al.*, 2005). O acúmulo de lipídios no fígado resulta de um desequilíbrio entre sua síntese, degradação e secreção. Os ácidos graxos utilizados para a síntese de triglicerídeos são adquiridos a partir de diferentes fontes, incluindo a formação *de novo* no fígado, ácidos graxos livres presentes no sangue portal e lipoproteínas circulantes (KUCERA e CERVINKOVA, 2014).

Os efeitos nocivos associados ao excesso de entrada de ácidos graxos nos hepatócitos são frequentemente denominados "lipotoxicidade". As células se protegem desses efeitos oxidando os ácidos graxos ou sequestrando-os como triglicerídeos para dentro dos CLs (Fig.17) (GREENBERG *et al.*, 2011). As lesões ocorrem quando existe excesso de ácidos graxos livres, principalmente ácidos graxos saturados, ao invés do simples acúmulo de triglicerídeos (WANG *et al.*, 2006). O resultado é a geração de metabólitos lipídicos tóxicos, como ceramidas, diacilgliceróis, lisofosfatidilcolina e metabólitos do colesterol oxidado, que atuam como espécies reativas de oxigênio (ROS) (Fig.17) (NEUSCHWANDER-TETRI *et al.*, 2010).

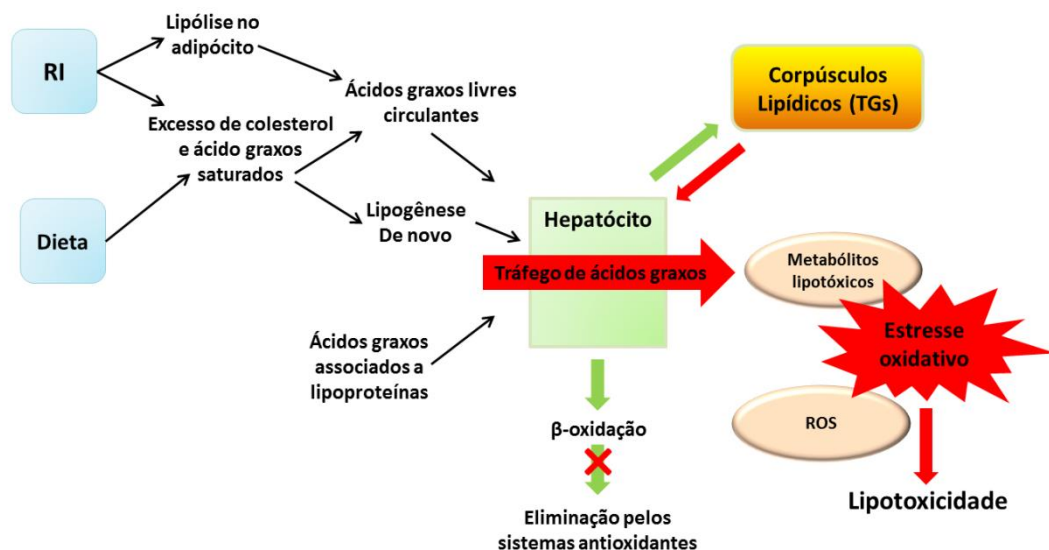


Figura 17: Lipotoxicidade no hepatócito. Num cenário de resistência à insulina (RI) e de uma dieta rica em gorduras saturadas, o excesso de ácidos graxos livres (FFAs) circulantes induz à lesão hepatocelular através da lipotoxicidade, causada pelo estresse oxidativo, por meio da geração de metabólitos lipotóxicos e de espécies reativas de oxigênio (ROS). Mecanismos de proteção são mostrados como setas verdes e mecanismos danosos como setas vermelhas. Neste modelo, o acúmulo de triglicerídeos no interior dos corpúsculos lipídicos representa uma adaptação de proteção ao excesso de tráfego de ácidos graxos livres. Adaptado de NEUSCHWANDER-TETRI *et al.* (2010).

Os ácidos graxos saturados e insaturados diferem significativamente em suas contribuições para a lipotoxicidade. Dados obtidos por WANG *et al.* (2006) sugerem que a esteatose hepática, causada pelo aumento dos ácidos graxos saturados, pode promover dano hepático, estresse do retículo endoplasmático (RE) e um ambiente pró-apoptótico. Este resultado foi consistente com um estudo realizado *in vitro* que demonstrou que a adição de ácidos graxos monoinsaturados atenua a apoptose dos hepatócitos e a resistência à insulina provocada por exposição a ácidos graxos saturados livres, apesar de causar um aumento da esteatose (RICCHI *et al.*, 2009). De fato, a lipotoxicidade leva à lesão e à morte celular por apoptose ou por necrose (BRUNT, 2009). A necrose é caracterizada pelo inchaço da célula, ruptura da membrana plasmática e consequente liberação do conteúdo celular no tecido. Este processo de morte induz uma resposta inflamatória com dano tecidual. Já a apoptose representa uma forma de morte celular programada que envolve perdas mínimas dos conteúdos celulares para o espaço extracelular, o que reduz a resposta inflamatória e os danos ao tecido (JAESCHKE *et al.*, 2004).

Mecanismos autorreparadores em excesso nos hepatócitos também podem levar à morte celular. A principal diferença entre esteatose simples e esteatohepatite é o aumento das lesões e do grau de apoptose dos hepatócitos, que pode levar à fibrose avançada e à cirrose (JOU *et al.*, 2008).

Fatores associados à dieta estão relacionados com o desenvolvimento e o agravamento dos casos de esteatose. Dietas ricas em colesterol e em frutose podem induzir à esteatose hepática. Além disso, a obesidade, a dislipidemia, a resistência à insulina e níveis séricos elevados das aminotransferases acompanham as alterações hepáticas (KUCERA e CERVINKOVA, 2014).

A frutose, uma hexose que ocorre naturalmente em muitos frutos e vegetais, apresenta menor índice glicêmico do que a glicose ou a sacarose. Entretanto, é mais lipogênica, causando maiores elevações de triglicerídeos e colesterol. Seu consumo excessivo favorece a síntese de gordura através da gliconeogênese e pode resultar em um aumento da pressão arterial e dos níveis séricos de ácido úrico e ácido lático (HALLFRISCH, 1990).

O estudo e o entendimento da biologia do tecido adiposo, da obesidade e da resistência à insulina apontam para a intrincada relação entre o sistema imune inato e o metabolismo de lipídios destacando-se o papel das células de Kupffer e de uma

série de processos bioquímicos e mecanismos celulares envolvidos (SMEDSROD *et al.*, 1994).

As células de Kupffer constituem o maior componente do sistema retículo endotelial, representando de 80 a 90% de todos os macrófagos teciduais do corpo. São responsáveis pela rápida contenção e remoção de partículas exógenas e de material imunorreativo percebido como estranho e prejudicial (BAFFY, 2009). São essenciais na patogênese da esteatose hepática, pois estão intimamente relacionadas ao processamento de lipídios nos hepatócitos. Estudos realizados por LEFKOWITCH *et al.* (2002) detectaram a presença de agregados de células de Kupffer em regiões perivenulares de esteatohepatite, em comparação com uma distribuição difusa nos sinusoides de fígados gordurosos com esteatose simples.

Na esteatose hepática, quantidades alteradas de lipídios no tecido hepático podem modular a atividade biológica das células de Kupffer de várias maneiras: primeiramente, o maior espaço ocupado pelos hepatócitos cheios de gordura pode levar a uma perfusão sinusoidal prejudicada gerando reações inflamatórias microvasculares. Em segundo lugar, a exposição excessiva das células de Kupffer aos ácidos graxos pode modular as vias de inflamação e a resistência à insulina através da interação de receptores de superfície e mediadores intracelulares. Finalmente, a deposição anormal de lipídios na membrana plasmática pode interferir nas funções dos receptores de superfície destas células (DAY e JAMES, 1998; BAFFY, 2009).

O LPS, um componente importante das membranas das bactérias do trato gastrointestinal, é considerado uma molécula exógena fundamental na patogênese da esteatose hepática. Fatores dietéticos (por exemplo, aumento na ingestão de frutose) podem contribuir para uma motilidade intestinal alterada, supercrescimento bacteriano e aumento da permeabilidade epitelial com níveis circulantes elevados de LPS na esteatose hepática tanto experimental quanto humana (RACANELLI e REHERMANN, 2006).

Existem evidências de que a esteatose promove a polarização da resposta imune para o perfil Th1, favorecendo a ativação clássica ou inata de macrófagos. Sendo assim, o pool de células T Natural Killer hepáticas é reduzido e os níveis de citocinas Th1 como TNF- α , IL-12, IL-18 e interferon- γ encontram-se elevados (GAO *et al.*, 2008).

1.3.5.2 Corpúsculos lipídicos e doenças infecciosas

Os CLs são sítios de síntese e armazenamento de mediadores inflamatórios. Portanto, em diversas doenças infecciosas, também é possível encontrar alterações quantitativas nos CLs presentes nas células dos órgãos alvos do patógeno ou em leucócitos do hospedeiro (MELO *et al.*, 2011, 2012).

Por outro lado, vários patógenos exibem um amplo espectro de mecanismos adaptativos evolutivos para tirar proveito dos aspectos únicos da biologia dos CLs, com o intuito de favorecer sua própria replicação e persistência no hospedeiro. Assim, vírus, fungos, bactérias e demais parasitos podem induzir à formação de CLs e/ou utilizá-los direta ou indiretamente das mais variadas formas, como sintetizado na tabela 1:

Tabela 1: Patógenos e utilização dos corpúsculos lipídicos dos hospedeiros.

Patógeno	Forma de utilização dos corpúsculos lipídicos	Referências
Vírus da Hepatite C	Os CLs funcionam como plataformas intracelulares para a replicação do patógeno.	HERKER e OTT, 2011.
<i>Cryptococcus neoformans</i> <i>Histoplasma capsulatum</i>	Causam acúmulo de CLs dentro de leucócitos, induzindo à produção de mediadores lipídicos.	NOVERR <i>et al.</i> , 2001. SORGI <i>et al.</i> , 2009.
<i>Toxoplasma gondii</i>	Utiliza os lipídios do hospedeiro na biogênese de suas membranas	CHARRON e SIBLEY, 2002.
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Induz à síntese de eicosanoides nos CLs de leucócitos, modulando a resposta inflamatória a seu favor.	STEINBERG e GRINSTEIN, 2008. D'AVILA <i>et al.</i> , 2012.
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Utiliza os CLs do hospedeiro durante sua propagação ativa.	COCCHIARO e VALDIVIA, 2009.
<i>Schistosoma mansoni</i>	Utiliza os CLs para a detoxificação do grupo heme, na produção de ovos pelas fêmeas do parasito e em mecanismos de imunoevasão.	CORRÊA SOARES <i>et al.</i> , 2007. HUANG <i>et al.</i> , 2012. FURLONG <i>et al.</i> , 1995.
Vírus da dengue	Os lipídios são utilizados pelo vírus para sua replicação no interior dos hospedeiros.	RODENHUIS-ZYBERT <i>et al.</i> , 2010.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Perturba o metabolismo lipídico, alterando a maturação do fagossoma e evitando que ele adquira propriedades microbicidas, favorecendo a persistência do patógeno no hospedeiro.	D'AVILA <i>et al.</i> , 2006. PEYRON <i>et al.</i> , 2008.

Dentre os aspectos que relacionam os CLs às doenças infecciosas, destaca-se a produção e a regulação de imunomoduladores lipídicos do hospedeiro, induzidas pelo parasito, visando desenvolver mecanismos de imunoevasão (MEESTER *et al.*, 2011; HERKER e OTT, 2012).

Neste sentido, D'ÁVILA *et al.* (2011) investigaram os mecanismos de formação dos CLs induzidos pelo *Trypanosoma cruzi* e observaram que sua formação em macrófagos ocorre através de um mecanismo dependente de Toll-Like Receptor 2 (TLR2). Os resultados indicaram que os CLs funcionam como mediadores lipídicos e estão potencialmente envolvidos nos mecanismos de escape acionados pelo parasito.

Os CLs dos leucócitos compartimentalizam o substrato e toda a maquinaria enzimática necessária para a síntese de eicosanoides (BOZZA e BANDEIRA-MELO, 2005). Estas substâncias derivam do ácido araquidônico e controlam processos celulares importantes, como proliferação celular, apoptose, metabolismo e migração, desempenhando papéis fundamentais em condições fisiológicas e patológicas (WYMAN e SCHNEITER, 2008).

A biossíntese destas moléculas, representadas pelos leucotrienos, ácidos hidroieicosatetraenóicos (HETEs), lipoxinas, prostaglandinas e tromboxanos é catalisada por dois grupos de enzimas, a 5-lipoxigenase (5-LO) (SAMUELSSON *et al.*, 1987) e a COX (BOZZA *et al.*, 1997; SMITH *et al.*, 2000). Os níveis de eicosanoides se elevam em paralelo ao aumento do número de CLs formados em resposta às infecções e outras patologias.

A produção de eicosanoides tem sido demonstrada durante a infecção por *T. cruzi* e estes parecem desempenhar um papel na patogênese da doença de Chagas. Por exemplo, as prostaglandinas levam à redução da secreção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos, favorecendo a replicação do parasito (ALVAREZ *et al.*, 2010; D'ÁVILA *et al.*, 2012).

As micobactérias também utilizam os CLs para se tornarem persistentes nos organismos de seus hospedeiros. *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* e *Mycobacterium leprae* causam um acúmulo de lipídios nos macrófagos infectados, induzindo à formação de “macrófagos espumosos” (“foamy macrophages”) (D'ÁVILA *et al.*, 2006; KIM *et al.*, 2010).

PEYRON *et al.* (2008) realizaram um estudo sobre os “macrófagos espumosos” presentes nos granulomas tuberculosos humanos e propuseram que a

indução destes por *Mycobacterium tuberculosis* criaria um ambiente favorável para as bactérias se tornarem persistentes. Segundo os autores, os macrófagos ricos em lipídios funcionariam como um abrigo seguro para o patógeno, pois ao mesmo tempo em que evitam um contato direto dos bacilos com outras células do sistema imune presentes nos granulomas, eles perdem sua atividade bactericida e passam a constituir uma importante fonte de nutrientes graças aos ácidos graxos acumulados em seus corpúsculos lipídicos.

D'ÁVILA *et al.* (2006) investigaram os mecanismos de formação dos macrófagos espumosos em um modelo murino de tuberculose, onde observaram que a formação dos CLs foi drasticamente inibida em camundongos deficientes em Toll Like Receptor 2 (TLR2), indicando um papel fundamental deste receptor no reconhecimento do BCG e na sinalização para a formação de CLs.

Os lipídios são fundamentais para uma fagocitose normal por atuarem na maturação do fagossoma. Alguns patógenos conseguem perturbar o metabolismo lipídico e alterar a maturação do fagossoma, evitando que ele adquira propriedades microbicidas (STEINBERG e GRINSTEIN, 2008). Este processo pode ser observado em macrófagos ativados na doença de Chagas. Os macrófagos infectados apresentam grande número de CLs e um aumento no tamanho destas organelas em relação às células não infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*. A internalização dos CLs nos fagossomos durante a infecção aguda pode representar diferentes fases de maturação do fagossomo, levando à morte do parasito ou favorecendo sua sobrevivência (D'ÁVILA *et al.*, 2012).

Vale ressaltar que diversos parasitos são capazes de utilizar os CLs do hospedeiro como fonte direta de nutrientes e em processos de detoxificação de metabólitos. Por exemplo, hemoparasitos como *Plasmodium sp.* (HEMPELMANN, 2007), *Haemoproteus sp.* (CHEN *et al.*, 2001), *Echinostoma trivolvis* (PISCIOTTA *et al.*, 2005) e *Schistosoma sp.* (CHEN *et al.*, 2001) usam os CLs do hospedeiro como fonte de energia e para detoxificação do grupo heme (MEESTER *et al.*, 2011; HERKER *et al.*, 2012).

1.3.5.2.1 Corpúsculos lipídicos e esquistossomose mansônica

Dados da literatura sugerem que a esteatose hepática induzida por dieta é um fator essencial para a regeneração dos hepatócitos danificados na esquistossomose

mansônica (SHTEYER *et al.*, 2004). Hepatócitos em regeneração normalmente acumulam microgotículas de gordura, representando uma adaptação metabólica, de forma que as novas células emergentes tenham energia facilmente disponível, bem como matéria-prima para a construção de suas membranas celulares (MICHALOPOULOS, 2007).

Num estudo realizado por NEVES *et al.* (2006), os autores observaram que camundongos infectados pelo *S. mansoni* e alimentados com uma dieta hiperlipídica apresentaram um maior número de hepatócitos binucleados. Entretanto, estes animais apresentaram uma densidade menor de CLs do que a dos camundongos não infectados que receberam a mesma dieta, sugerindo que o parasito utiliza parte dos lipídios do hospedeiro para realização de suas funções metabólicas (TEMPONE *et al.*, 1997).

Para avaliar os efeitos da dieta na infecção pelo *S. mansoni*, CORRÊA *et al.* (2011) observaram os efeitos combinados da exposição à desnutrição materna durante a lactação e da infecção esquistossomótica na fase adulta de camundongos swiss. O grupo infectado que sofreu restrição calórica desenvolveu hiperfagia, o que o levou ao ganho de peso e à esteatose hepática. Durante a infecção, neste grupo, observou-se um menor número de granulomas hepáticos, um aumento da neoformação de colágeno e um maior número de hepatócitos binucleados, sugerindo uma melhor modulação da resposta inflamatória e um aumento da regeneração hepática.

Estes dois trabalhos apresentaram resultados que sugerem que dietas hiperlipídicas produzem uma esteatose hepática favorável no sentido de auxiliar o hospedeiro a lidar melhor com a infecção pelo parasito *S. mansoni*.

Organismos que se alimentam de hemácias desenvolveram vários mecanismos para metabolizar o grupo heme tóxico liberado após a ingestão e a degradação da hemoglobina. Um dos mecanismos utilizados por estes organismos para realizar a detoxificação do grupo heme foi a formação dos cristais de hemozoína.

PAGOLA *et al.* (2000) demonstraram, por análise de difração de raios-X, que a hemozoína é composta por dímeros formados por duas moléculas de heme ligadas covalentemente. Os CLs catalisam a biomineralização do grupo heme formando a hemozoína, através da retirada do grupo heme lipofílico do ambiente aquoso no qual a digestão da hemoglobina ocorre. No interior do microambiente não

polar e hidrofóbico do CL, dímeros de heme passam a se juntar através de ligações de hidrogênio na parte crescente do cristal de hemozoína (Fig.18) (EGAN *et al.*, 2006).

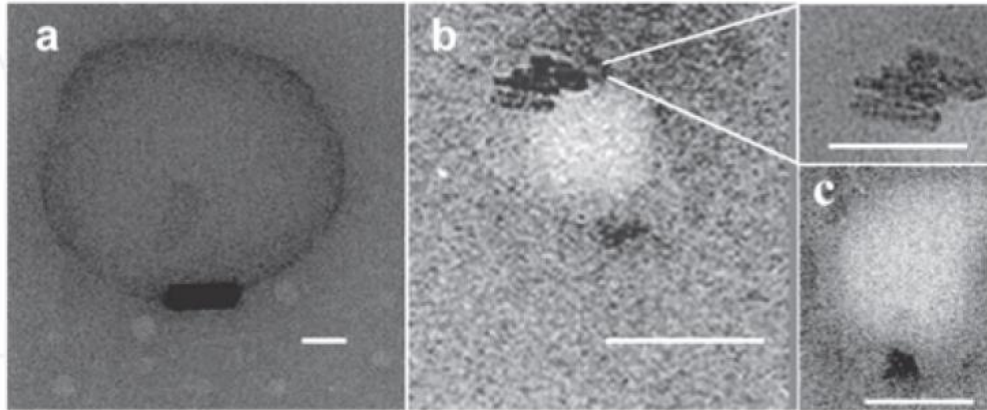


Figura 18: Microscopia eletrônica de transmissão de cristais de β -hematina na superfície de corpúsculos lipídicos sintéticos. Barra de escala= 50 nm (HOANG *et al.*, 2010).

Os parasitos adultos do *Schistosoma mansoni* digerem grandes quantidades de sangue provenientes de seus hospedeiros vertebrados para satisfazer suas necessidades nutricionais. A maneira pela qual este parasito lida com o grupo heme tóxico é de importância central em sua fisiologia. Estruturas multicristalinas de hemozoína foram encontradas na superfície de CLs no intestino do *S. mansoni*, sugerindo que a interface hidrofílico-hidrofóbica-hidrofóbica seria essencial para promover a cristalização da hemozoína (CORRÊA SOARES *et al.*, 2007).

O *S. mansoni* também utiliza CLs para a produção de ovos. HUANG *et al.* (2012) observaram, por microscopia e por espectrofotometria, que fêmeas fecundas possuíam uma extensa rede de CLs em seus vitelários, órgãos especializados na produção de ovos, enquanto que fêmeas virgens possuíam reservas lipídicas significativamente menores. Os autores concluíram que fêmeas sexualmente maduras estocam lipídios na forma de CLs para serem utilizados como reserva energética para a produção de ovos.

O *S. mansoni* tem desenvolvido evolutivamente mecanismos de imunoevasão. Seu tegumento é rico em lipídios do hospedeiro, sendo esta estrutura externa crucial para a interação parasito-hospedeiro. Após a entrada das cercarias no hospedeiro vertebrado, estas se transformam rapidamente em esquistossômulos, que passam por alterações para se adaptar ao ambiente interno do hospedeiro, incluindo a biogênese de uma bicamada lipídica dupla, que reveste completamente

seus organismos e a perda da cauda cercariana e do glicocálix. Assim, a distribuição dos CLs se altera à medida que o parasito se desenvolve pois, enquanto nas cercarias os CLs se encontram principalmente na cauda e nas estruturas anteriores, nos esquistossômulos, estes estão igualmente distribuídos por todo o organismo do verme. Os schistosomas são incapazes de sintetizar ácidos graxos ou esteróis *de novo* e, portanto, adquirem os lipídios de seus hospedeiros através do transporte pela membrana tegumentar e por ingestão e absorção pelo intestino (FURLONG *et al.*, 1995).

Em outro estudo, MAGALHÃES *et al.* (2010) avaliaram o papel dos lipídios derivados do *S. mansoni* na ativação de Toll-Like Receptor 2 (TLR2) e de eosinófilos durante infecção experimental em camundongos Swiss. Os resultados obtidos sugerem que o liso-PC derivado dos schistosomas participa da produção de citocinas e da ativação de eosinófilos através de uma via dependente de TLR2, o que pode contribuir para a patogênese e letalidade na fase crônica da infecção.

SILVA e ANDRADE (1989) analisaram os aspectos histológicos e parasitológicos decorrentes da infecção por *S. mansoni* em *N. squamipes* naturalmente infectados, sendo que a histopatologia revelou esteatose hepática, micro e macrovesicular em 25% dos animais dos animais estudados.

1.4 EOSINÓFILOS

1.4.1 Aspectos Gerais

Eosinófilos são granulócitos pertencentes ao sistema imune inato dos vertebrados, e foram assim denominados por Paul Ehrlich em 1879, por causa da propriedade distinta de seus grânulos citoplasmáticos que se coram em vermelho alaranjado pelo corante ácido eosina. Relativamente poucos eosinófilos maduros são encontrados no sangue periférico de seres humanos saudáveis (menos de 400 células/mm³ de sangue), mas estes podem ser prontamente identificados em virtude de seus núcleos segmentados e grânulos específicos (KITA, 2011; ROSENBERG *et al.*, 2013).

Os eosinófilos têm sido tradicionalmente considerados como células efetoras, tendo um papel central no combate às infecções parasitárias, principalmente através da liberação de proteínas citotóxicas dos grânulos eosinofílicos por exocitose. Além

disso, atuam na asma e em outras atopias, produzindo eicosanoides e leucotrienos (AKUTOTA *et al.*, 2008).

Entretanto, estudos recentes mudaram esta perspectiva. Atualmente, os eosinófilos são considerados leucócitos multifuncionais envolvidos na homeostase dos tecidos, na modulação da resposta imune adaptativa e na imunidade inata a certos patógenos. Os eosinófilos são capazes de produzir citocinas imunorreguladoras e estão ativamente envolvidos na regulação das respostas imunes do tipo Th2. Estes novos papéis atribuídos aos eosinófilos, no entanto, não se opõem às observações anteriores que mostram que os eosinófilos também são células efetoras com capacidades pró-inflamatórias e destrutivas. Assim, os eosinófilos contribuem para vários processos fisiológicos e patológicos, dependendo de sua localização e estado de ativação (KITA, 2011).

Os eosinófilos são células residentes em vários órgãos, tais como o trato gastrointestinal, glândulas mamárias, útero, timo e medula óssea, podendo desempenhar um papel importante na homeostase tecidual destes órgãos. Numa resposta imunológica do tipo Th2, os eosinófilos são recrutados para os locais de inflamação, onde produzem uma variedade de citocinas e mediadores lipídicos e liberam proteínas tóxicas dos grânulos. Estas moléculas podem regular respostas imunes, causar danos aos tecidos e facilitar a reparação tecidual. Eosinófilos também podem apresentar antígenos para células T e iniciar e/ou amplificar as respostas imunes antígeno-específicas (KITA, 2011).

Estudos revelaram que os eosinófilos infiltrantes nos tecidos são componentes essenciais do microambiente imunológico local, trocando sinais com praticamente todas as células residentes de determinado tecido, incluindo as atividades autócrinas dirigidas aos próprios eosinófilos que promovem acumulação e ativação localizadas. Em particular, os eosinófilos parecem modular a fase aguda e as respostas inflamatórias inatas, bem como a imunidade adquirida associada com respostas imunes Th1 e Th2. Curiosamente, os eosinófilos também apresentam atividades relacionadas com a imunossupressão, potencialmente modulando a função das células T reguladoras e o desenvolvimento de timócitos, sugerindo que, num dado tecido e/ou resposta imune, os eosinófilos desempenham potencialmente papéis pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios (JACOBSEN *et al.*, 2007).

1.4.2 Eosinopoiese

Os eosinófilos são produzidos na medula óssea a partir de células progenitoras pluripotentes, que se diferenciam em um precursor híbrido com propriedades compartilhadas por basófilos e eosinófilos e, em seguida, em uma linhagem separada de eosinófilos (ROSENBERG *et al.*, 2013). A especificação da linhagem de eosinófilos ocorre pela interação de pelo menos três classes de fatores de transcrição, incluindo o fator de transcrição da globina (GATA-1) (um membro da família dedo de zinco), PU.1 (um membro da família ETS) e membros C/EBP (família de proteínas de ligação ao potenciador/CCAAT) (NERLOV e GRAF, 1998; NERLOV *et al.*, 1998).

Três citocinas, a interleucina 3 (IL-3), o GM-CSF e a interleucina 5 (IL-5) são particularmente importantes na regulação e no desenvolvimento dos eosinófilos. Estas citocinas fornecem sinais proliferativos e de diferenciação, seguindo os sinais instrutivos especificados pelos fatores de transcrição (MELO *et al.*, 2013). Tanto a IL-3 quanto o GM-CSF são relativamente não específicos e estimulam a proliferação de neutrófilos, basófilos e eosinófilos. Em contraste, a IL-5 estimula especificamente a produção de eosinófilos, sendo fundamental para a maturação e a liberação destas células da medula óssea (WALSH *et al.*, 2001).

Durante os processos de diferenciação e de maturação dos granulócitos, os mieloblastos, pró-mielócitos e mielócitos são células em divisão mitótica ativa; os metamielócitos não podem ser dividir, mas continuam a se diferenciar. Uma característica típica do processo de maturação dos granulócitos é o aparecimento de grânulos primários (azurófilos) e grânulos específicos ou secundários no citoplasma. Os mieloblastos são células indiferenciadas que não possuem grânulos citoplasmáticos, já os pró-mielócitos e mielócitos apresentam grânulos primários. Os grânulos secundários começam a surgir nos mielócitos. Nestas células, o núcleo é grande e redondo, e a cromatina é parcialmente condensada. CLs citoplasmáticos estão geralmente ausentes e os grandes grânulos imaturos, homoganeamente densos, são precursores de populações de grânulos primários e secundários. Durante a diferenciação, o tamanho das células é reduzido, ocorrendo a condensação e a segmentação do núcleo e a redução do volume das organelas secretoras do citoplasma (como, por exemplo, o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático rugoso) (SAITO *et al.*, 1988; DVORAK e ISHIZAKA, 1994).

1.4.3 Formação das Proteínas Granulares

A maioria das proteínas dos grânulos é sintetizada na fase promielocítica de diferenciação. Nessas células, grânulos redondos e grandes, desprovidos de core, possuem MBP, ECP, EPO e EDN. É provável que estes grânulos passem por condensação e, mais tarde, se transformem nos grânulos específicos, contendo cristaloides de eosinófilos maduros. Para apoiar esta ideia, observou-se que a forma precursora da MBP (proMBP) está presente nos grânulos grandes e redondos das células imaturas, mas a imunorreatividade diminui à medida que a célula amadurece e ocorre a condensação do núcleo. Quando isto acontece, a MBP já está formada. A MBP encontra-se, portanto, localizada no núcleo dos grânulos secundários, enquanto a ECP, a EPO e a EDN estão presentes na matriz dos grânulos (EGESTEN *et al.*, 2001).

Com o objetivo de estudar a conversão de proMBP para MBP, POPKEN-HARRIS *et al.* (1998) analisaram eosinófilos em diferenciação *in vitro*, através da estimulação de células estaminais do cordão umbilical (UCC), com IL-5. Por imunomicroscopia, observou-se que a proMBP é expressa em pró-mielócitos, mielócitos e metamielócitos, formando os grânulos específicos. Desta forma, a coloração azurófila ou metacromática dos grânulos imaturos é devida à concentração maior de proMBP, que ainda não foi condensada e transformada em MBP durante o processo de maturação do eosinófilo. Depois que os grânulos imaturos contendo proMBP sofrem condensação, a MBP catiônica se torna disponível e os grânulos se coram com o corante ácido eosina. Isto, juntamente com a contribuição das outras três proteínas catiônicas presentes na matriz granular, resulta no aparecimento de grânulos vermelhos brilhantes, característicos de eosinófilos maduros (Fig.19).

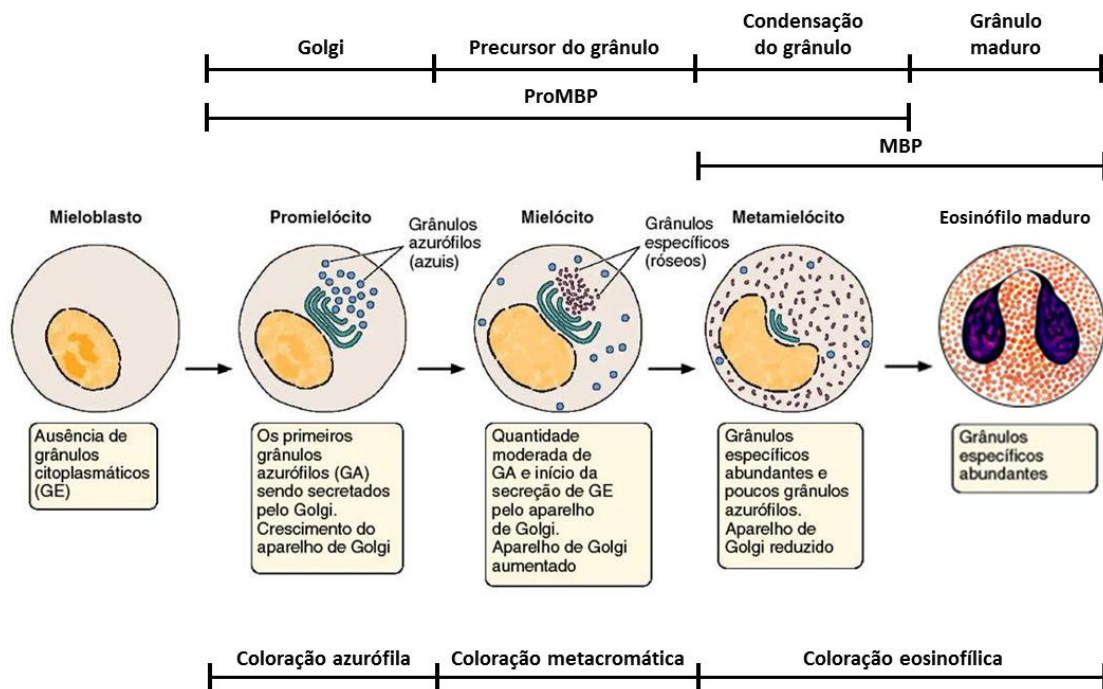


Figura 19: Representação esquemática da maturação dos grânulos dos eosinófilos com os padrões de colorações propostas. A proMBP é depositada em grandes vacúolos próximos ao Golgi. A partir daí, estes vacúolos se movem para a periferia, onde começa a ocorrer a condensação. À medida que o grânulo se condensa, a proMBP pode ser vista na periferia, e a MBP pode ser vista no interior. Durante a fase final de maturação dos grânulos, a reatividade da proMBP é perdida, e a reatividade da MBP permanece. Adaptado de POPKEN-HARRIS *et al.* (1998).

1.4.4 Ultraestrutura de Eosinófilos Maduros

Os eosinófilos são liberados no sangue periférico em um estado fenotipicamente maduro, sendo capazes de sofrer ativação e recrutamento para os tecidos em resposta a estímulos apropriados. Os eosinófilos permanecem um breve período de tempo no sangue periférico (meia-vida de aproximadamente 18 horas) antes de migrarem para o timo ou trato gastrointestinal, onde residem sob condições homeostáticas (ROSENBERG *et al.*, 2013).

Os eosinófilos maduros apresentam núcleos bilobulados, onde a cromatina nuclear é condensada e os nucléolos estão ausentes. As superfícies das células possuem prolongamentos citoplasmáticos irregulares e as organelas citoplasmáticas incluem partículas de glicogênio, grânulos de secreção, CLs e estruturas tubulovesiculares. O complexo de Golgi e os ribossomos ligados à membrana estão diminuídos. A maioria dos grânulos dos eosinófilos maduros são estruturas grandes,

ovais, possuindo um núcleo central, cristalino e elétron-denso, circundado por uma matriz elétron-lúcida, caracterizando os grânulos secundários específicos (DVORAK e ISHIZAKA, 1994; MELO e WELLER, 2014).

Uma característica ultraestrutural marcante dos eosinófilos é a presença de estruturas tubulovesiculares, conhecidas como eosinophil sombrero vesicles (EoSVs). As sombrero vesicles são transportadores tubulares dobrados e achatados, maiores (150-300 nm de diâmetro) e mais pleiomórficos do que as pequenas vesículas esféricas convencionais (50 nm de diâmetro). Receberam este nome devido à semelhança morfológica com o chapéu mexicano (sombbrero), quando observadas em secções transversais. As EoSVs apresentam uma quantidade substancial de superfície de membrana e representam um sistema dinâmico, com uma notável capacidade de mudar a sua forma e de interagir com grânulos de secreção. A morfologia curva das EoSVs aumenta a superfície em relação ao volume, o que é provavelmente importante para o transporte específico de proteínas (MELO *et al.*, 2008). Os principais aspectos ultraestruturais dos eosinófilos são observados na imagem a seguir (Fig.20).

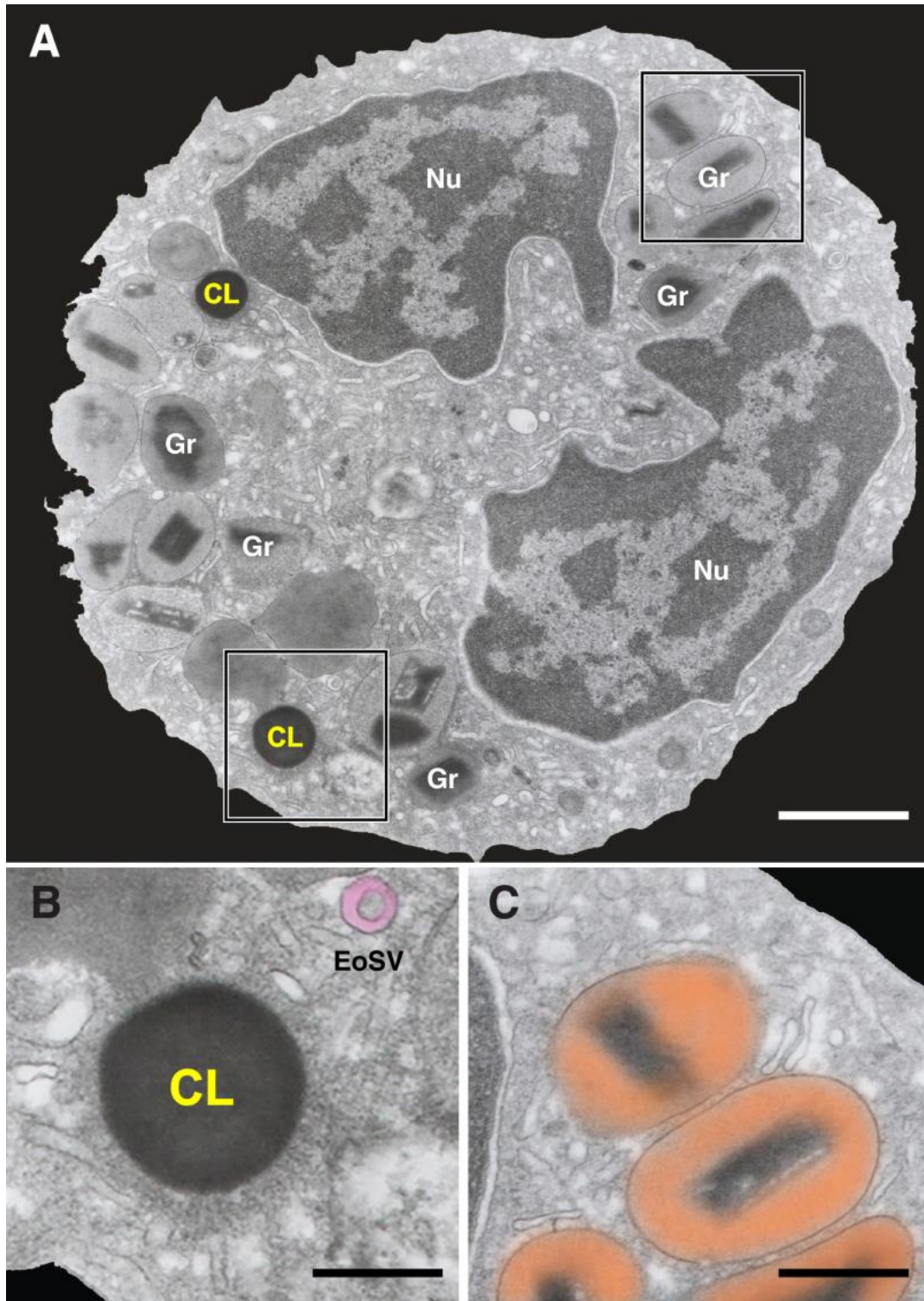


Figura 20: Características ultraestruturais de eosinófilos maduros humanos. Em (A), observe eosinófilo apresentando núcleo (Nu) bilobulado com heterocromatina perinuclear, grânulos específicos (Gr) e corpúsculo lipídico (CL). Note em (B), CL elétron-denso e vesícula EoSV destacada em rosa. Em (C), grânulos secretores em maior aumento, caracterizados por um núcleo central cristalino elétron-denso e matriz elétron-lúcida em volta do núcleo (de cor laranja). Adaptado de MELO e WELLER (2014). Barras: (A)= 1 μ m; (B)= 300 nm (C)= 800 nm.

1.4.5 Funções Efetoras dos Eosinófilos

As respostas efectoras dos eosinófilos envolvem a secreção de proteínas catiônicas granulares e a liberação de numerosas citocinas com múltiplas atividades biológicas. As substâncias secretadas pelos eosinófilos são pré-formadas e armazenadas dentro de seus grânulos de secreção (MELO e WELLER, 2010). Mediante estímulos apropriados, citocinas imunorreguladoras de perfil Th1 e Th2 são rapidamente e especificamente liberadas (MELO *et al.*, 2013).

1.4.5.1 Proteínas granulares

Grânulos específicos dos eosinófilos humanos contêm quatro proteínas principais: a proteína básica principal (MBP), a peroxidase eosinofílica (EPO) e as proteínas com atividade de ribonucleases, como a proteína catiônica eosinofílica (ECP) e a neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN), que são liberadas após sua ativação. Os grânulos também armazenam numerosas citocinas, enzimas e fatores de crescimento (ROTHENBERG e HOGAN, 2006; ROSENBERG *et al.*, 2013).

1.4.5.1.1 Proteína básica principal (MBP)

Sendo uma das proteínas mais altamente catiônicas sintetizadas pelos eosinófilos, a MBP apresenta dois homólogos diferentes (MBP1 e MBP2) e está entre as proteínas mais abundantes destas células. Os eosinófilos maduros perdem a capacidade de codificar MBP, indicando que toda MBP armazenada nos grânulos secretores é sintetizada durante o início do desenvolvimento dos eosinófilos (POPKEN-HARRIS *et al.*, 1998). A MBP2 é expressa exclusivamente por eosinófilos e representa um marcador mais específico do que a MBP1 (PLAGER *et al.*, 2006). O papel clássico dos eosinófilos na proteção contra infecções parasitárias tem sido apoiado pela toxicidade da MBP contra vermes helmínticos. Por exemplo, a MBP humana rompe a membrana do esquistossômulo, danificando diretamente este estágio de vida do parasito *Schistosoma mansoni*. Também é citotóxica contra larvas de outros helmintos, incluindo *Trichinella spiralis* e microfilárias de *Brugia pahangi* e *Brugia malayi*, além de atuar contra o *Trypanosoma cruzi* e certas bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (GLEICH e ADOLPHSON, 1986). A MBP demonstrou ser citotóxica para as vias aéreas e pode ser, pelo menos

parcialmente, responsabilizada por danos nos tecidos associados com a infiltração de eosinófilos na mucosa bronquial nos casos de asma (FURUTA *et al.*, 2005). Esta proteína também é tóxica para células tumorais e outras células de mamíferos. Acredita-se que o efeito tóxico da MBP resulte do aumento da permeabilidade da membrana plasmática das células, levando a perturbações na bicamada lipídica (WASMOEN *et al.*, 1988).

1.4.5.1.2 Peroxidase eosinofílica (EPO)

A EPO é armazenada como uma proteína funcionalmente madura na matriz dos grânulos dos eosinófilos. Entre todas as proteínas eosinofílicas dos grânulos em seres humanos ou camundongos, a EPO parece ser a mais específica dos eosinófilos (sem relatos publicados que demonstram sua expressão em outros leucócitos ou outros tipos celulares) (LEE *et al.*, 2012). A EPO, que constitui em torno de 25% do total da massa de proteína dos grânulos específicos, catalisa a oxidação de pseudohaletos para formar espécies de oxigênio altamente reativas e metabólitos de nitrogênio reativos. Estas moléculas oxidam alvos nucleofílicos nas proteínas, promovendo estresse oxidativo e subsequente morte celular por apoptose ou necrose (AGOSTI *et al.*, 1987). A EPO está associada à morte de uma variedade de microorganismos, tais como *E. coli*, esquistossômulo de *S. mansoni*, microfilárias de *B. pahangi* e *B. malayi*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma* e micobactérias, mas também de mastócitos e de células tumorais. A ligação da EPO aos microorganismos potencializa significativamente sua morte por fagócitos mononucleares (KITA, 2011).

1.4.5.1.3 Proteína catiônica eosinofílica (ECP)

A ECP é uma ribonuclease conhecida como Rnase-3. Possui ação bactericida e é tóxica para helmintos parasitos (GLEICH *et al.*, 1986). O mecanismo de ação da ECP envolve a formação de poros nas membranas alvo, o que não depende da sua atividade de RNase (YOUNG *et al.*, 1986). É importante ressaltar que tanto a EDN quanto a ECP apresentam atividade antiviral dependente da atividade de ribonuclease (ROSENBERG e DOMACHOWSKE, 2001). Além disso, a ECP apresenta atividades não citotóxicas adicionais, como a supressão das respostas proliferativas das células T e a síntese de imunoglobulinas por células B, a indução

da desgranulação de mastócitos e a estimulação da secreção de muco pelas vias aéreas, além da produção de glicosaminoglicanos por fibroblastos humanos (VENGE *et al.*, 1999). A ECP é uma proteína muito catiônica, com fraca atividade de ribonuclease, encontrada apenas em humanos e outros primatas. No camundongo, todas as ribonucleases presentes são proteínas catiônicas, com forte atividade ribonucleolítica (ROSENBERG *et al.*, 1995).

1.4.5.1.4 Neurotoxina derivada de eosinófilos (EDN)

A EDN humana é uma neurotoxina potente que pode danificar severamente a bainha de mielina dos neurônios de animais experimentais (GLEICH e ADOLPHSON, 1986). Como a ECP, a EDN também é considerada uma ribonuclease, conhecida como RNase-2. Sua expressão não está restrita aos eosinófilos, pois também pode ser detectada em células mononucleares e em neutrófilos. Também já foi encontrada no fígado humano, pulmão e baço (HOGAN *et al.*, 2008). A EDN tem cerca de 100 vezes mais atividade de RNase do que a ECP e está implicada diretamente na atividade antiviral contra infecções respiratórias (ROSENBERG e DOMACHOWSKIE, 2001).

1.4.5.1.5 Proteína de Charcot-Leyden Cristal (CLC)

Um dos principais constituintes dos eosinófilos humanos é a proteína CLC, também conhecida como galectina-10, presente nos grânulos primários (ACKERMAN *et al.*, 2002). A CLC foi caracterizada pela primeira vez por Charcot e Robin em 1853, por sua abundância no escarro e em amostras fecais de pacientes com doença respiratória grave e eosinofilia gastrointestinal. Sua liberação resulta na formação de estruturas incolores, em forma de agulha. No entanto, a função da CLC permanece obscura (HOGAN *et al.*, 2008). Estas estruturas são frequentemente observadas em pacientes com asma brônquica (DVORAK *et al.*, 1988).

1.4.6 Mecanismos de Secreção

A secreção é uma propriedade universal dos organismos vivos (ALBERTS *et al.*, 2008). Dois tipos de secreção podem ser observados nas células eucarióticas: a secreção constitutiva e a secreção regulada. A secreção constitutiva ocorre em todas as células e permite a liberação contínua, de baixo grau, de moléculas solúveis, através da rede do complexo de Golgi ou diretamente no ambiente extracelular, através de vesículas de exportação. Esta via secretora também fornece à membrana plasmática proteínas e lipídios recém-sintetizados (TRAUB e KORNFELD, 1997).

Na secreção regulada de moléculas, estas são concentradas em organelas especiais destinadas ao armazenamento e ao transporte, chamadas de grânulos e vesículas de secreção. Após uma estimulação adequada, grânulos e vesículas passam por complexos eventos de fusão com a membrana plasmática, liberando seu conteúdo no exterior da célula. A secreção regulada é essencial para o funcionamento adequado de células especializadas, como as células inflamatórias e os neurônios (MAYER, 2002).

A habilidade de muitas células do sistema imune para manter a homeostase tecidual e para participar da resposta inflamatória depende da sua capacidade para mobilizar proteínas armazenadas nos grânulos e liberá-las para o meio externo por processos de secreção regulados. Durante a evolução, os sistemas biológicos desenvolveram múltiplas estratégias para liberar produtos armazenados nos grânulos para o ambiente extracelular. Um desafio crucial que as células eucarióticas tiveram que resolver foi a descarga seletiva de mediadores distintos, armazenados nos mesmos grânulos secretores. Isto implicou no desenvolvimento da capacidade de algumas células de isolar uma determinada substância ou um número limitado de substâncias dos outros constituintes presentes nas organelas secretoras (CRIVELLATO *et al.*, 2010).

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é a única ferramenta que pode claramente identificar e distinguir entre os diferentes mecanismos de desgranulação. O grande tamanho e a estrutura bem definida dos grânulos específicos dos eosinófilos tornam possível identificar e quantificar mudanças estruturais associadas com a liberação de proteínas dos grânulos. Vários estudos in

vitro, examinando eosinófilos sanguíneos purificados e estimulados, mostraram que as alterações ultraestruturais nos grânulos dos eosinófilos correspondem a uma liberação extracelular real de proteínas dos grânulos (ERJEFÄLT *et al.*, 2001).

Quatro mecanismos diferentes são conhecidos por mediar a liberação de proteínas armazenadas nos grânulos dos eosinófilos, podendo variar entre humanos e camundongos. Os eosinófilos podem sofrer um processo de exocitose clássica, por meio do qual os grânulos intracelulares individuais se fundem com a membrana plasmática, liberando todo o seu conteúdo, ou uma exocitose composta, na qual dois ou mais grânulos intracelulares se fundem uns com os outros antes da fusão com a membrana plasmática, liberando seus conteúdos combinados. No processo de desgranulação conhecido por PMD (desgranulação por piecemeal), os grânulos secretam progressivamente seus conteúdos armazenados através de um processo dependente de vesículas transportadoras. Na citólise, ocorre a deposição dos grânulos intactos diretamente no meio extracelular, após ocorrer a lise da membrana plasmática (Fig.21) (LEE *et al.*, 2012; MELO *et al.*, 2013; SPENCER *et al.*, 2014).

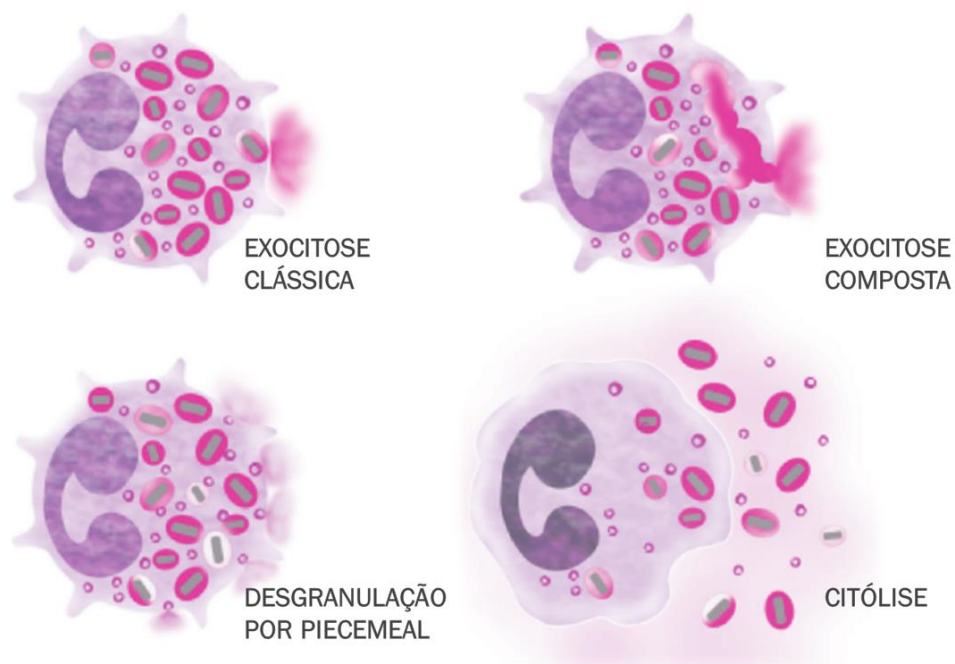


Figura 21: Processos de secreção dos eosinófilos. Eosinófilos podem secretar suas proteínas granulares por exocitose clássica ou composta, desgranulação por piecemeal ou citólise. Mais de um processo de desgranulação pode estar envolvido nas respostas inflamatórias. Adaptado de SPENCER *et al.* (2014).

1.4.6.1 Exocitose

A exocitose é um processo de desgranulação no qual ocorre a fusão do grânulo com a membrana plasmática, seguida pela liberação do conteúdo do grânulo para o exterior da célula. Este processo é de particular importância no que diz respeito ao dano e à remodelação tecidual nas infecções parasitárias e nas doenças inflamatórias. Apesar disso, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares precisos e intracelulares que regulam a mobilização dos grânulos de secreção e, em última análise, a secreção de mediadores a partir de células inflamatórias (LOGAN *et al.*, 2003).

A exocitose clássica envolve a extrusão de grânulos secretores individuais, em eventos de fusão discretos, para o exterior da célula, após estimulação. A exocitose composta é caracterizada por múltiplas fusões de grânulos intracelulares, formando “sacos de desgranulação”, que precedem a fusão com a membrana plasmática, e subsequente liberação de seu conteúdo de forma concentrada (em um único poro de fusão) sobre a superfície alvo no local de aderência da célula (MOQBEL e LACY, 1999).

A exocitose composta é exibida por mastócitos (HIDE *et al.*, 1993), eosinófilos ativados em resposta às infecções parasitárias (SCEPEK *et al.*, 1994), neutrófilos (LOLLIKE *et al.*, 2002) e plaquetas (MORGENSTERN, 1995).

A exocitose de grânulos de secreção ocorre a partir de uma série de etapas altamente reguladas. Estas incluem: (a) a mobilização ou translocação do grânulo para a periferia da célula (b) o acoplamento do grânulo à membrana plasmática e (c) o encaixe entre o grânulo e a membrana plasmática, que é um pré-requisito para (d) a fusão com a membrana e liberação de mediadores. Vários investigadores têm estudado intensamente um conjunto de proteínas associadas à membrana e aos grânulos secretores, conhecidas como SNAP receptores (SNAREs), criticamente envolvidas na ancoragem dos grânulos à membrana plasmática. Já foi demonstrado que, em uma variedade de tipos celulares, a formação de complexos envolvendo as SNAREs precede a fusão com a membrana e a liberação de mediadores (LOGAN *et al.*, 2003).

A liberação focal de proteínas citotóxicas por eosinófilos sobre uma superfície alvo parece ter um importante papel na eliminação de helmintos parasitos, principalmente sobre os estágios larvares dos vermes. MCLAREN *et al.* (1977)

observaram que eosinófilos de rato formaram uma associação íntima com as superfícies de helmintos parasitos, *in vitro*, na presença de soro imune. O parasito apresenta uma superfície não-fagocitável para a célula. A sequência de eventos que ocorreram quando os eosinófilos de rato foram cultivados com helmintos parasitos foi a seguinte: adesão; formação de vacúolo e desgranulação (a peroxidase, uma enzima associada ao grânulo, é liberada para os vacúolos citoplasmáticos e é subsequentemente secretada diretamente na superfície do parasito) (Fig.22). Tendo em vista a falta de danos morfológicos observada nos esquistossômulos, os autores concluíram que a secreção da peroxidase pelos eosinófilos teve algum efeito sobre a permeabilidade da membrana de superfície do parasito, e assim mediou mudanças fisiológicas e bioquímicas que não puderam ser detectadas por microscopia eletrônica.

Segundo MELO *et al.*, 2013, evidências fisiológicas da ocorrência de exocitose clássica e composta estão limitadas a eosinófilos aderidos às superfícies de helmintos parasitos *ex vivo* ou no caso de eosinófilos presentes em tecidos de pacientes com doenças avançadas e infecções parasitárias invasivas; evidências de eventos *in vivo* de exocitose são raras em secções de tecido de pacientes com doenças alérgicas ou asma. Os mecanismos de desgranulação mais amplamente observados em patologias humanas *in vivo* são a PMD e a citólise.

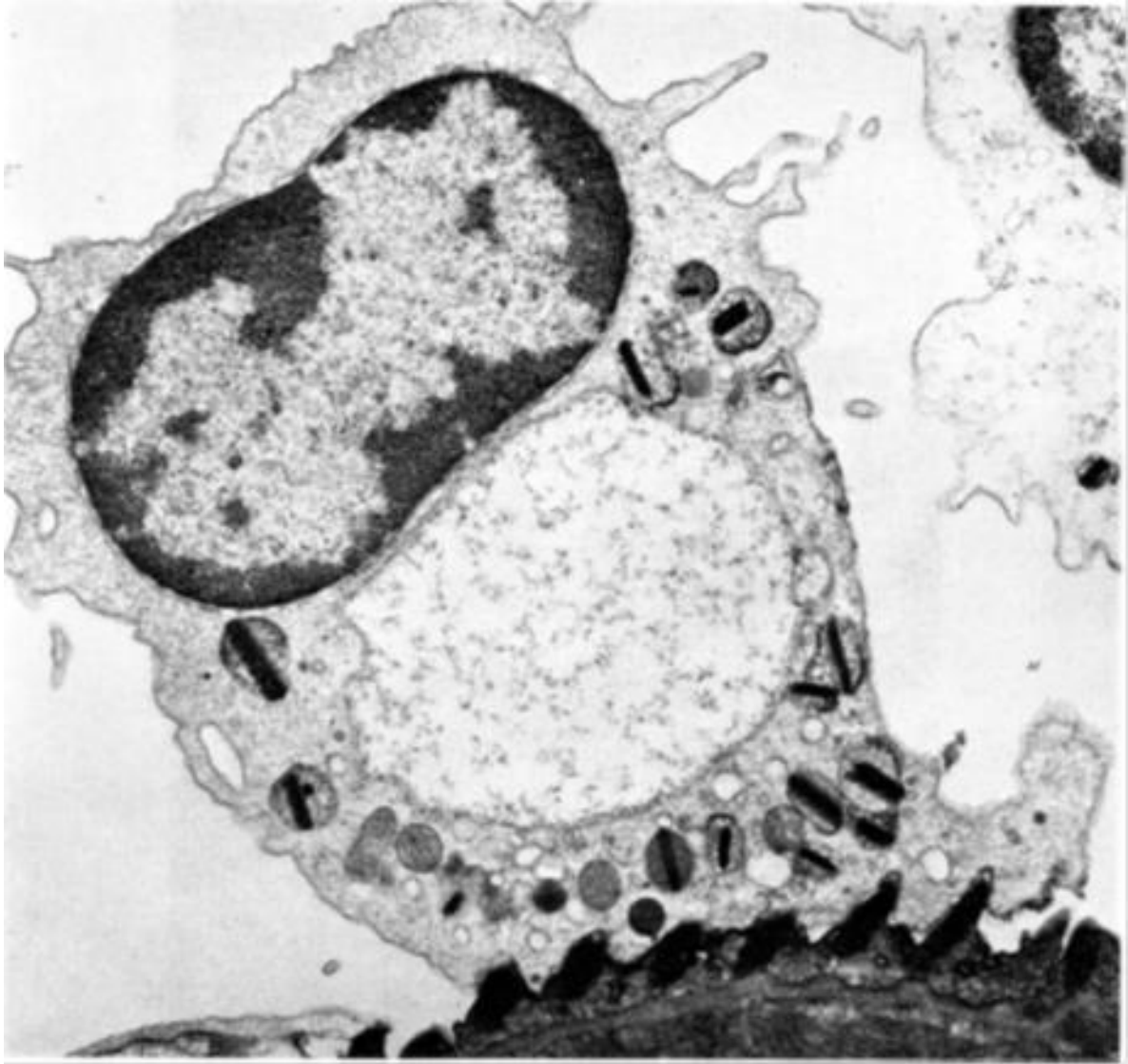


Figura 22: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de um eosinófilo contendo um grande vacúolo citoplasmático. A célula está aderida à superfície de um esquistossômulo do parasito *Schistosoma mansoni*. Aumento de 16250x. Fonte: MCLAREN *et al.* (1977).

1.4.6.2 Desgranulação por piecemeal (PMD)

O processo de PMD foi inicialmente identificado ultraestruturalmente através de estudos de microscopia eletrônica de mastócitos, basófilos e eosinófilos em meados de 1970 (DVORAK e DVORAK, 1975).

Durante o mecanismo de PMD, os grânulos secretores sofrem um esvaziamento gradual de seus conteúdos. Vesículas contendo partes do conteúdo dos grânulos se movem a partir da membrana perigranular através do citoplasma e se fundem com a membrana plasmática, liberando o conteúdo. Evidências ultraestruturais de PMD incluem mudanças aparentes nos grânulos intracelulares intactos (desorganização do núcleo cristalino, perda de elétron-densidade e aparência de uma intrincada rede de membranas intragranulares). Como resultado, uma população mista de grânulos intactos e alterados é sempre visualizada em seções de células. Além disso, surgem numerosas vesículas pequenas e redondas e vesículas tubulares longas, observadas em todo o citoplasma. Estas são particularmente importantes para a entrega rápida de citocinas pré-formadas ou de outras proteínas secretadas pelos grânulos dos eosinófilos. A superfície da célula mostra projeções elaboradas indicativas de ativação (Fig.23) (DVORAK, 2005b; MELO *et al.*, 2005a).

Na PMD, os eosinófilos humanos secretam componentes da matriz e/ou do cristalóide, mas mantêm suas estruturas granulares. Em eosinófilos não estimulados, grânulos são vistos como estruturas circulares ou elípticas, cheios de conteúdos elétron-densos, com um core bem definido e uma matriz delimitada por uma membrana trilaminar. No entanto, após estimulação, o conteúdo dos grânulos exibe perdas claras classicamente associadas com a PMD (Fig.23) (MELO e WELLER, 2010).

Nos eosinófilos humanos, a PMD é o processo de secreção mais frequentemente encontrado em indivíduos com doenças inflamatórias e alérgicas (AHLSTROM-EMANUELSSON *et al.*, 2004) e é responsável pela liberação regulada de citocinas e de outras proteínas durante as respostas imunes (MELO *et al.*, 2005a). A PMD foi identificada em eosinófilos humanos em vários locais, como nos intestinos (DVORAK *et al.*, 1993), na pele (CHENG *et al.*, 1997) e nas mucosas das vias aéreas (ERJEFÄLT *et al.*, 1998). Também foi identificada em eosinófilos

humanos provenientes da síndrome hipereosinofílica idiopática (FOONG *et al.*, 1991). Adicionalmente, a PMD já foi observada em eosinófilos de camundongos (MALM-ERJEFÄLT *et al.*, 2001) e de ratos (MEI *et al.*, 2002).

Detalhes adicionais sobre os mecanismos estruturais subjacentes da PMD foram identificados utilizando a tomografia eletrônica. Por esta técnica, ficou claro que os grânulos específicos dos eosinófilos não são apenas estações de armazenamento de proteínas, mas organelas elaboradas e compartimentalizadas, com domínios membranosos internos que mudam sua estrutura e conteúdos em resposta aos estímulos (MELO *et al.*, 2005b). Estudos de fracionamento subcelular documentaram que, pelo menos cinco citocinas, incluindo IL-4, IL-6, IFN- γ , TNF- α e IL-10 são encontradas armazenadas nestes compartimentos dos grânulos. Curiosamente, os grânulos também são locais ricos em receptores de quimiocinas (por exemplo, CCR3) e de citocinas (por exemplo, IL-4R α) (NEVES e WELLER, 2009).

Um grande avanço na compreensão da PMD em eosinófilos foi a demonstração de que a secreção diferencial de citocinas é mediada por receptores altamente expressos nos grânulos de secreção dos eosinófilos e nas vesículas (SPENCER *et al.*, 2006). O receptor envolvido na cadeia de secreção de determinada citocina representa o elo crucial para desbloquear mecanismos reguladores que regem a liberação rápida, induzida por estímulo, de proteínas pré-formadas nas células do sistema imune humano (MELO e WELLER, 2010). Especificamente, a liberação de IL-4 por eosinófilos ativados pela eotaxina ocorreu via formação de um complexo com o receptor de IL-4 de cadeia- α presente nas membranas dos grânulos (SPENCER *et al.*, 2006). Apesar das vias de transporte mediadas por receptores ainda não terem sido definidas para outros mediadores de eosinófilos, este estudo forneceu insights sobre o potencial de modulação molecular especializado decorrente do processo de desgranulação por piecemeal (LACY e STOW, 2011).

Semelhante aos seres humanos, estudos recentes demonstraram que os grânulos de eosinófilos de camundongos expressam receptores CCR3 e podem secretar EPO e ribonucleases em resposta à estimulação pelo CCL11. SHAMRI *et al.* (2012) mostraram que a secreção de proteínas granulares dos eosinófilos murinos, em resposta a CCL11, foi acompanhada por mudanças ultraestruturais, incluindo a redução da elétrondensidade da matriz e do núcleo e desestruturação

do núcleo dos grânulos, as quais são características de PMD. Estudo recente do nosso grupo mostrou que eosinófilos isolados do baço de camundongos transgênicos para IL-5, quando estimulados com CCL11 ou LPS liberam proteínas catiônicas através do mecanismo de PMD (BONJOUR, 2015). Neste estudo, também foi demonstrado que a PMD é o principal mecanismo envolvido na secreção de produtos armazenados em grânulos secretores de eosinófilos, em modelo murino de asma experimental (BONJOUR, 2015). Atualmente, a desgranulação por piecemeal é aceita como a forma fisiológica mais comumente observada de desgranulação de eosinófilos humanos. Eosinófilos estimulados com citocinas tais como INF- γ e CCL11, aumentam a formação de EoSVs, sendo que os eosinófilos permanecem totalmente viáveis e responsivos a estímulos subsequentes (Fig.23) (ROSENBERG *et al.*, 2013).

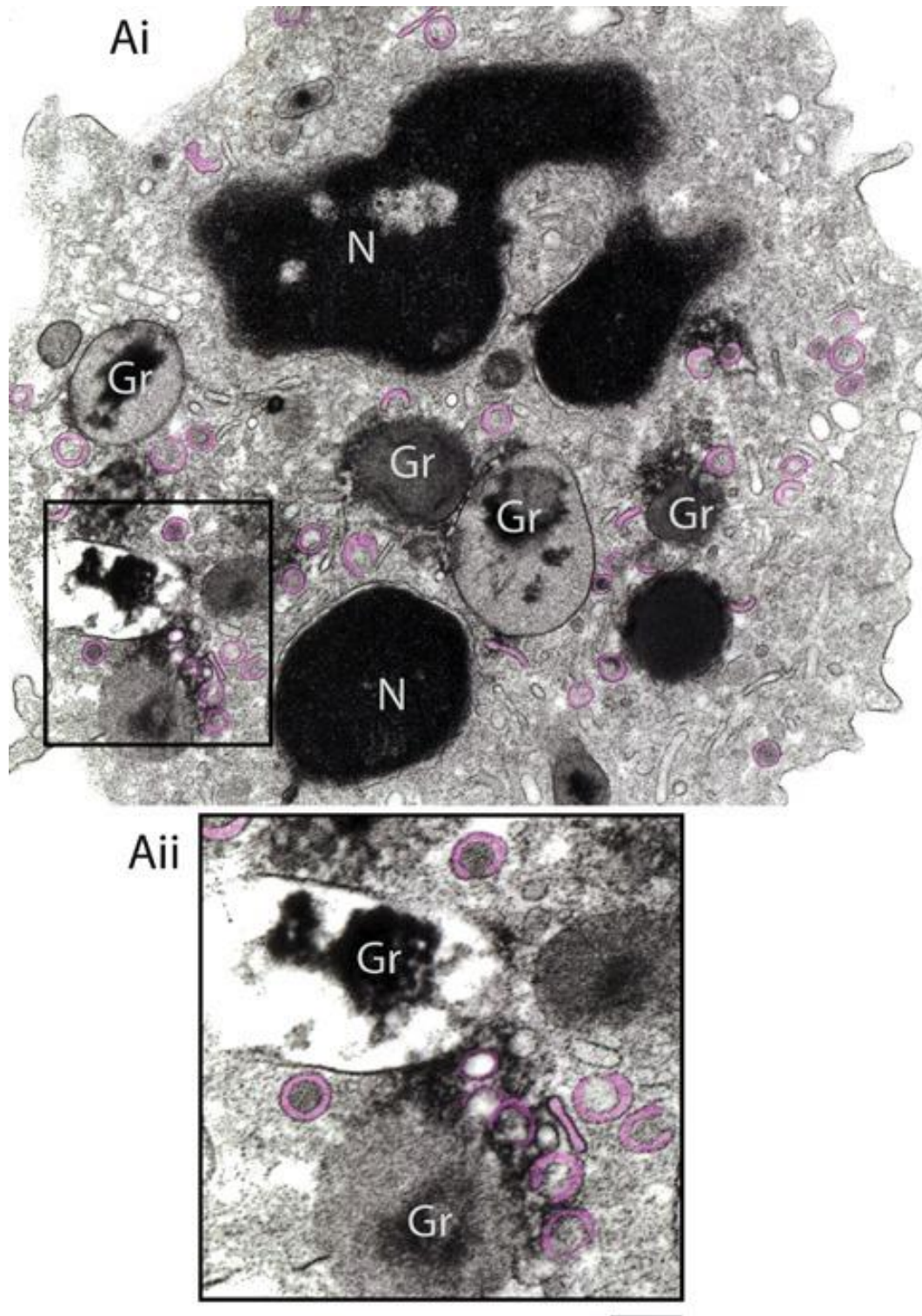


Figura 23: Ultraestrutura de um eosinófilo humano ativado. Observe em (Ai), vesículas sombrero, destacadas em rosa, com morfologia típica, no citoplasma. Grânulos de secreção (Gr), vistos em estágios progressivos de esvaziamento, indicam a ocorrência de PMD; (Aii) mostra em maior ampliação, várias EoSVs próximas de um grânulo mobilizado. N=núcleo. Barras: 630 nm (Ai), 300 nm (Aii). Fonte: MELO *et al.* (2008).

1.4.6.2.1 Transporte vesicular durante a PMD

Até recentemente, acreditava-se que o transporte de proteínas dos grânulos citoplasmáticos para a membrana celular era realizado apenas por pequenas vesículas redondas (DVORAK *et al.*, 1992a). Entretanto, estudos de MET evidenciaram a participação de vesículas morfologicamente distintas (EoSVs) envolvidas na rota de secreção dos eosinófilos (SPENCER *et al.*, 2006; MELO *et al.*, 2008b, 2009).

Curiosamente, a maioria destas EoSVs (90%) está associada com grânulos que apresentam alterações ultraestruturais típicas de PMD (MELO *et al.*, 2008b). Na verdade, ambas as pequenas vesículas redondas e as EoSVs são imunomarcadas positivamente para produtos típicos dos grânulos, como a IL-4 e a MBP-1 (MELO *et al.*, 2005b, 2009).

Estudos realizados pelo nosso grupo, baseados na tomografia eletrônica automatizada e na técnica de imunonanogold, revelaram que, durante a secreção dos eosinófilos, EoSVs brotam da membrana dos grânulos secretores e, em conjunto com pequenas vesículas arredondadas, transportam produtos armazenados nos grânulos até a membrana plasmática para a liberação extracelular (Fig. 24), efetivando o processo de PMD (MELO *et al.*, 2005b,c).

Nos eosinófilos humanos, o transporte de proteínas mediado por vesículas, a partir dos grânulos de secreção, é realizado principalmente pelas sombrero vesicles. O volume e a complexidade do tráfego vesicular nos eosinófilos e em outras células do sistema imune requerem uma maquinaria especializada para assegurar o encaixe e a fusão precisos do transportador vesicular nas membranas alvo. Proteínas SNARE, presentes nas membranas granulares e plasmáticas, atuam mediando estas fusões (Fig.24). Utilizando a citometria de fluxo e a técnica de imunonanogold, nosso grupo identificou, pela primeira vez, que eosinófilos expressam constitutivamente a SNARE STX17 (sintaxina-17), localizada tanto nos grânulos secretores quanto nas vesículas transportadoras (EoSVs). A expressão desta SNARE em grânulos de secreção e em compartimentos vesiculares associados aos grânulos indica que esta molécula pode mediar o tráfego de membrana a partir dos grânulos (CARMO *et al.*, 2015).

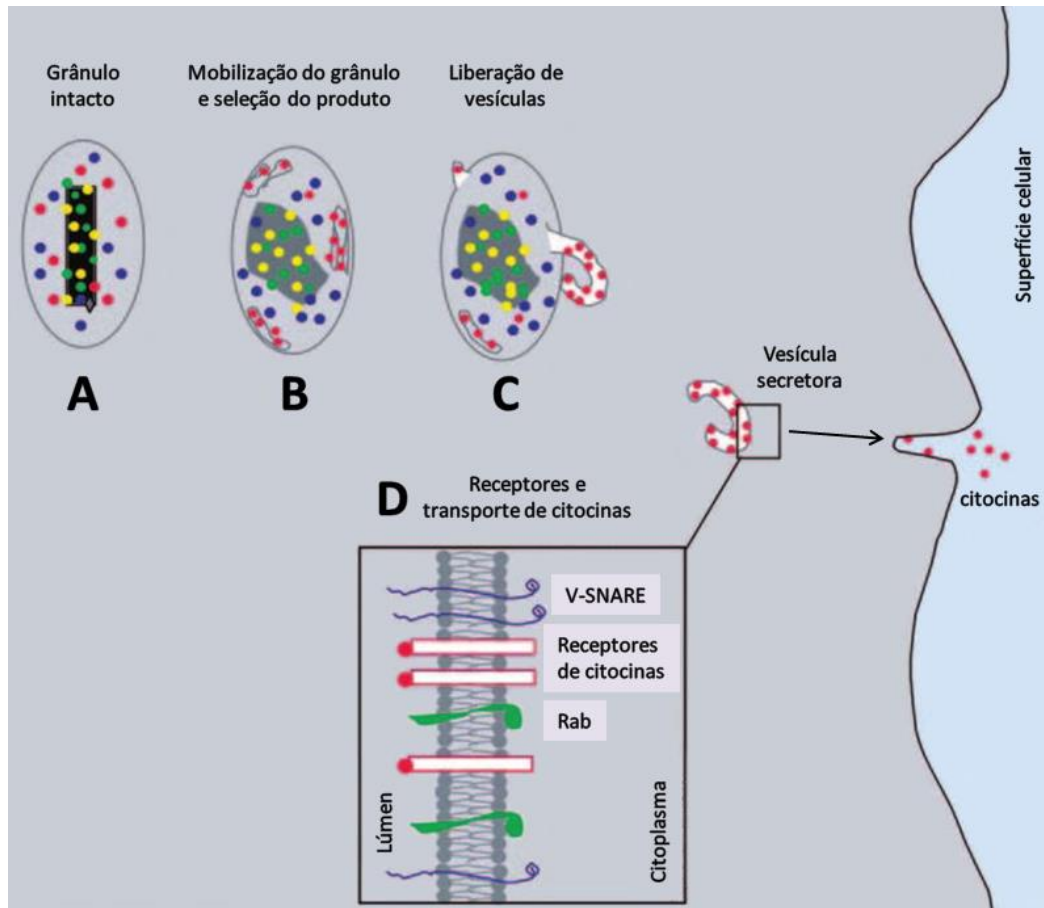


Figura 24: Modelo de mobilização e transporte de citocinas dos grânulos de secreção para a membrana plasmática em eosinófilos humanos. (A) grânulo intacto, com seu core cristalino elétron-denso e produtos de secreção. (B e C) mudanças estruturais relacionadas com a mobilização do grânulo e a formação de vesículas tubulares (EoSsVs), que transportam uma citocina específica para a membrana plasmática. (D) a triagem diferencial de citocinas baseia-se na presença de receptores de citocinas nas membranas do grânulo e da vesícula. Rab-SNAREs mediam a fusão entre a vesícula e a membrana plasmática, resultando na secreção de uma citocina específica. Adaptado de MELO *et al.* (2008b).

1.4.6.3 Citólise

A citólise dos eosinófilos é caracterizada pela lise da membrana plasmática e consequente liberação dos grânulos ligados à membrana na matriz extracelular (ERJEFÄLT *et al.*, 2001). Ultraestruturalmente, a citólise é caracterizada por alterações nucleares, ou seja, cromatólise e dissolução do envelope nuclear, dissolução parcial do citoplasma, além de ruptura da membrana plasmática, liberando aglomerados de grânulos livres (cfegs) no tecido circundante (ERJEFÄLT *et al.*, 1998). Os cfegs depositados nos tecidos aparecem como um conjunto heterogêneo de grânulos intactos, envoltos por membrana, e organelas com diferentes graus de dissolução (PERSSON e ERJEFÄLT, 1997).

Eosinófilos citolíticos e aglomerados de grânulos liberados por eosinófilos são prontamente observados *in vivo*, por exemplo, nas vias aéreas (ERJEFÄLT *et al.*, 1998) e nos pólipos nasais (ULLER *et al.*, 2004); a citólise ainda continua a ser um modo enigmático de desgranulação dos eosinófilos, e os mecanismos que desencadeiam este processo de secreção são mal compreendidos (MELO *et al.*, 2013a). Experimentalmente, a citólise pode ser induzida *in vivo* através de desafio com alérgenos, ou em resposta à desnudação epitelial mecânica (PERSSON e ERJEFÄLT, 1997). *In vitro*, exposições ao ionóforo de cálcio A23187 produzem eosinófilos citolíticos (FUKUDA *et al.*, 1985).

Em contraste com os seres humanos, casos documentados de citólise que ocorrem nos modelos murinos de doença humana são muito limitados (HOGAN *et al.*, 2001; OCHKUR *et al.*, 2007).

Aglomerados de grânulos livres de eosinófilos, frequentemente mantendo a membrana trilaminar intacta, foram relatados nos tecidos de pacientes com dermatite atópica (CHENG *et al.*, 1997), com distúrbios das mucosas das vias aéreas superiores (WATANABE *et al.*, 2003), rinossinusite crônica (GREIFF *et al.*, 1998), asma (PERSSON e ERJEFÄLT, 1997), urticária (TOYODA *et al.*, 1996) e esofagite eosinofílica (ACEVES *et al.*, 2007). Os cfegs foram detectados em doentes com carcinoma gástrico avançado (CARUSO *et al.*, 2005) e em lesões necróticas de gordura subcutânea em recém-nascidos (TAJIRIAN *et al.*, 2007). A citólise e a PMD não são mutuamente exclusivas; pelo contrário, podem ser observadas simultaneamente em biópsias de tecidos.

Descobertas recentes sugerem que os grânulos livres com as membranas intactas podem permanecer organelas secretoras competentes no interior dos tecidos, capazes de secretar citocinas de maneira parcimoniosa dependente de estímulos, semelhante ao que ocorre quando os grânulos se encontram dentro de eosinófilos intactos (Fig.25) (MELO *et al.*, 2013a).

NEVES *et al.* (2008) também demonstraram que os grânulos intactos dos eosinófilos humanos depositados nos tecidos funcionam como organelas de secreção eficazes (Fig.25). Baseando-se em sua estrutura original, os grânulos secretores dos eosinófilos possuem receptores de membrana para IFN-gama e para eotaxina-1 e são capazes de responder, mesmo estando fora da célula, livres no meio extracelular, a estes estímulos específicos.

Em estudo realizado por UEKI *et al.* (2013), foi demonstrado que os eosinófilos humanos ativados podem sofrer citólise por um processo denominado ETosis (de “extracellular traps”), onde ocorre a liberação de redes extracelulares de DNA nuclear e de grânulos secretores intactos. A estimulação com imunoglobulinas imobilizadas (IgA, IgG), fator ativador de plaquetas (PAF), ionóforo de cálcio ou acetato miristato de forbol (PMA), pode iniciar este processo nos eosinófilos humanos, de maneira dependente da NADPH-oxidase.

Os grânulos secretores ainda retêm as proteínas catiônicas, que serão secretadas à medida que os eosinófilos forem estimulados adequadamente. Grânulos liberados extracelularmente durante a citólise continuam funcionalmente ativos, capazes de aumentar a atividade secretora dos eosinófilos nos sítios de inflamação, contribuindo, desta forma, para a persistência da resposta inflamatória (Fig.25).

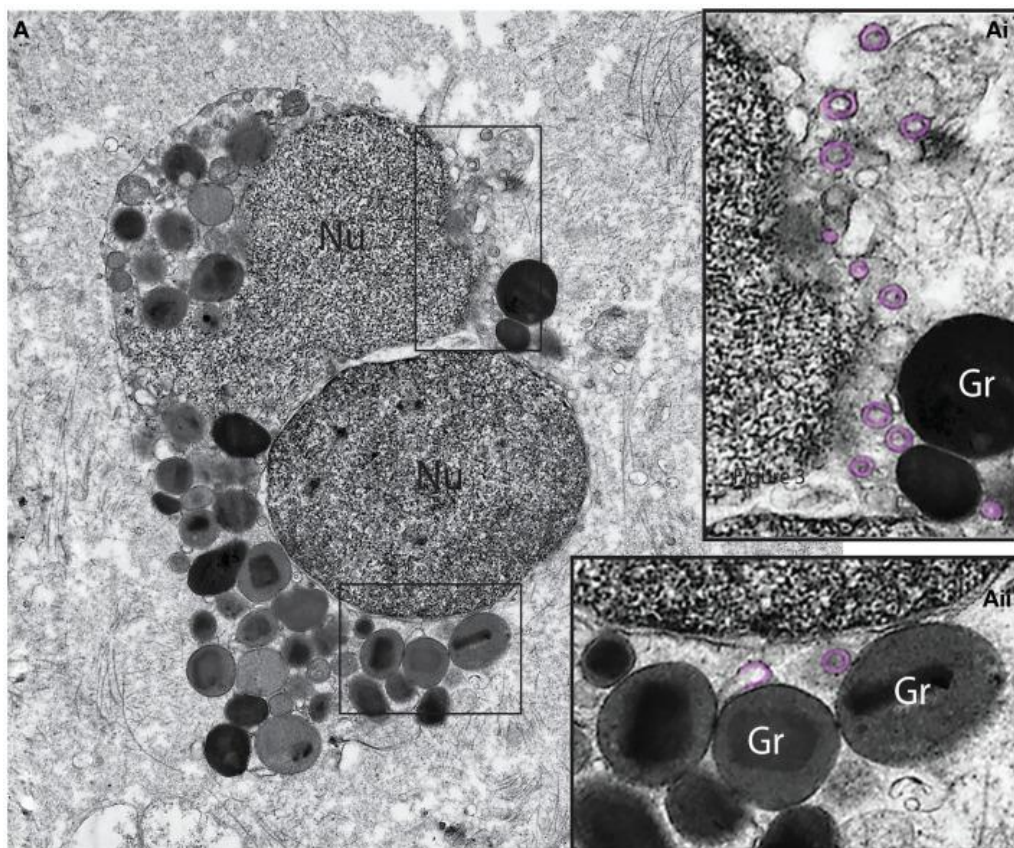


Figura 25: Ultraestrutura de eosinófilo tecidual humano sofrendo citólise. Note a desintegração do núcleo (Nu) e a presença de grânulos secretores (Gr) livres no tecido circundante. (Ai, Aii) são áreas de (A) vistas em maior aumento. Observe a presença de vesículas sombrero (EoSvs) livres e intactas, destacadas em rosa no tecido, após lise celular. Material de biópsia de paciente com doença inflamatória intestinal. Barra: 800nm (A); 300nm (Ai, Aii). Adaptado de SPENCER *et al.* (2014).

1.4.7 Funções Imunorreguladoras dos Eosinófilos

Anteriormente, os eosinófilos eram considerados apenas como células efetoras em estágio final. Contudo, evidências recentes sugerem que os eosinófilos podem executar várias funções imunorreguladoras como a apresentação de antígenos e a produção e liberação de uma série de citocinas e de outras moléculas imunomoduladoras. Para isto, os eosinófilos interagem com e modulam as funções de várias células, incluindo outros leucócitos (Fig.26).

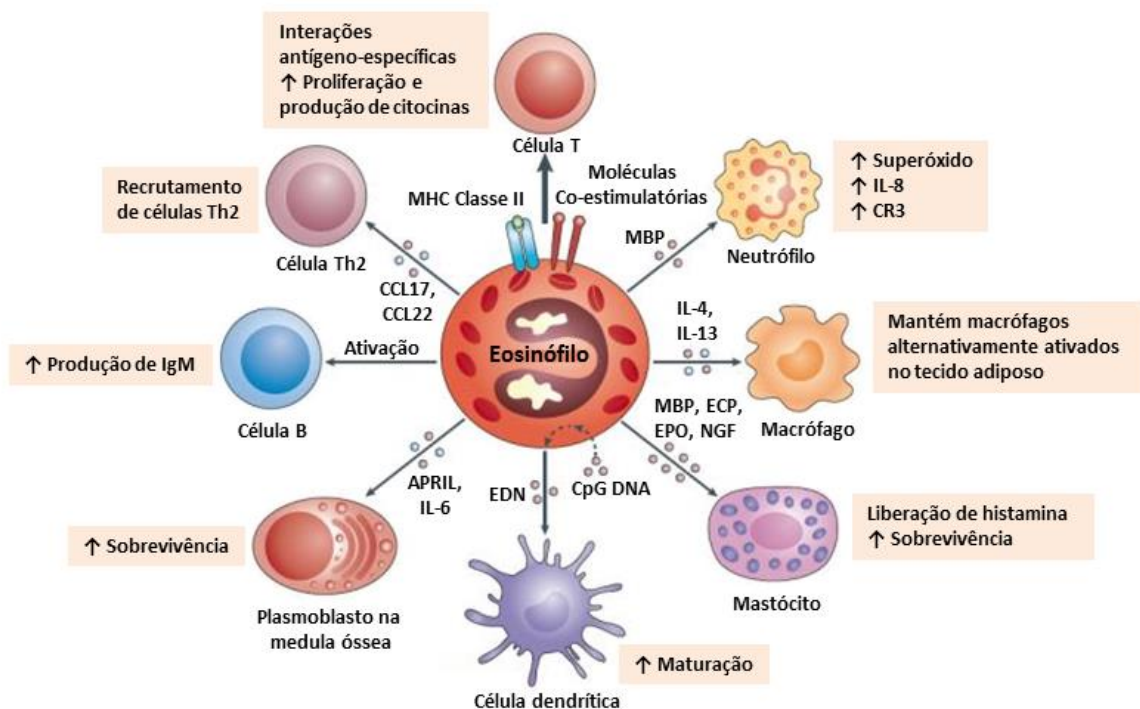


Figura 26: Os eosinófilos modulam a função de outros leucócitos. Eosinófilos podem expressar MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias, se comportando como células apresentadoras de antígenos e estimulando linfócitos T a proliferar e produzir citocinas. Também atuam juntamente com as células dendríticas, produzindo CCL17 e CCL22, regulando o recrutamento de células Th2 em resposta à sensibilização alérgica. Eosinófilos sensibilizam linfócitos B para produzir IgM antígeno-específica e aumentam a sobrevivência de plasmócitos na medula óssea de camundongos através da produção de imunomoduladores APRIL e IL-6. Além disso, ao serem estimulados por CpG, induzem a maturação das células dendríticas. A proteína granular dos eosinófilos, EDN, promove a maturação e a ativação das células dendríticas e a proteína básica principal (MBP) ativa neutrófilos, resultando na liberação de superóxido e interleucina-8, aumentando a expressão de integrinas na superfície celular (CR3). Eosinófilos mantêm macrófagos alternativamente ativados no tecido adiposo através das citocinas IL-4 e IL-13. Proteínas granulares como a MBP, ECP e EPO ativam mastócitos, resultando na liberação de histamina. Do mesmo modo, o fator de crescimento neural (NGF) prolonga a sobrevivência de mastócitos. Adaptado de ROSENBERG *et al.* (2013).

1.4.7.1 Interação com leucócitos

- Linfócitos

Os eosinófilos respondem claramente aos sinais produzidos pelas células T, tais como a IL-5. Em contrapartida, as células T também respondem aos sinais produzidos pelos eosinófilos (MACKENZIE *et al.*, 2001). Embora os eosinófilos não sejam células apresentadoras de antígenos "profissionais", estes podem expressar componentes na superfície celular necessários para a apresentação de antígenos. Exames clínicos e experimentais têm mostrado que os eosinófilos podem funcionar como células apresentadoras de antígenos, pois são capazes de processar e apresentar antígenos de bactérias, vírus e parasitos causadores de diversas doenças infecciosas (SHI *et al.*, 2004).

Assim, os eosinófilos possuem a capacidade de internalizar, processar e apresentar peptídeos antigênicos no contexto do complexo de histocompatibilidade principal de classe II (MHC-II), além da capacidade de fornecer sinais coestimulatórios para as células T através da expressão de moléculas de superfície, tais como CD80, CD86 e CD40, e a capacidade de interagir fisicamente com as células T CD4 + (SPENCER e WELLER, 2010).

Eosinófilos funcionam como células apresentadoras de antígenos (APCs) em várias situações experimentais. Por exemplo, eosinófilos estimulados por antígenos e administrados intratraquealmente em camundongos migram para os linfonodos drenantes e se localizam principalmente nas regiões ricas em linfócitos T (SHI *et al.*, 2000). Desta forma, eosinófilos ativados com antígenos instilados por via intratraqueal foram suficientes para a expansão das células Th2 dentro dos linfonodos drenantes *in vivo* (SHI *et al.*, 2004). Em outro exemplo, eosinófilos de camundongos expostos a antígenos de *Strongyloides stercoralis* não só expressam elevados níveis de MHC de classe II e CD86, mas também induzem as células T CD4 + naive a produzir IL-5 em cultura de células. Além disso, a presença dos receptores de IgE na superfície dos eosinófilos fornece evidência adicional de que eles participam efetivamente da apresentação de antígenos. A alta afinidade do receptor de IgE, FcεRI, já tinha sido observada em eosinófilos humanos no contexto do seu papel citotóxico contra parasitos (GOUNNI *et al.*, 1994).

Adicionalmente, a liberação de citocinas pré-formadas (IL-4, IL-13, IFN- γ) por eosinófilos, ajuda a manter o equilíbrio entre as respostas imunes Th1 e Th2 (WANG *et al.*, 2007).

Os eosinófilos também promovem respostas imunes humorais. Eles são capazes de ativar células B produtoras de IgM antígeno-específica (WANG e WELLER, 2008). Mais recentemente, a produção de APRIL e IL-6 por eosinófilos mostrou ser crucial para a sobrevivência de células plasmáticas na medula óssea do camundongo (CHU *et al.*, 2011).

- Mastócitos

Dados da literatura mostram que os eosinófilos possuem a capacidade de regular a função dos mastócitos. Por exemplo, a ativação dos mastócitos pela MBP provoca não só a exocitose, mas também a produção de eicosanoides e de citocinas (PILIPONSKY *et al.*, 2002). Os eosinófilos também produzem o fator de crescimento neural (NGF), uma citocina não apenas envolvida na sobrevivência e na manutenção funcional de neurônios simpáticos, mas também na regulação imune. O NGF promove a sobrevivência de mastócitos e sua ativação (BULLOCK e JOHNSON, 1996). Esta citocina é pré-formada nos eosinófilos e atua de maneira autócrina, ativando a liberação de EPO pelos próprios eosinófilos (SOLOMON *et al.*, 1998). A EPO ativa os músculos peritoniais do rato para liberar histamina, sugerindo um papel do NGF nas interações eosinófilos-mastócitos.

Eosinófilos se comunicam intensamente com mastócitos do tecido residente. Ambas as células são encontradas em estreita proximidade em condições homeostáticas no intestino, na alergia pulmonar e na inflamação intestinal de pacientes com doença de Crohn. A sinalização bidirecional que ocorre entre mediadores de eosinófilos e de mastócitos envolve vários imunomoduladores, incluindo o fator de células estaminais, as proteínas granulares, as citocinas GM-CSF, IL-3, IL-5, TNF, NGF e proteases de mastócitos. O acoplamento físico real de eosinófilos e mastócitos já foi observado tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o que resulta em sobrevivência prolongada dos eosinófilos (ELISHMERENI *et al.*, 2011).

- Macrófagos

Macrófagos teciduais são fontes de fatores proliferativos, quimiotáticos e de sobrevivência de eosinófilos, tais como IL-3, IL-5, eotaxinas e GM-CSF, sugerindo um papel na acumulação e na ativação dos eosinófilos nos tecidos. Por outro lado, eosinófilos secretam fatores ou provocam a expressão de fatores com atividades agonistas de macrófagos, tais como TGF- β , IL-1/IL-6, TNF- α , e a proteína inflamatória de macrófagos-1a. Estes dados sugerem que macrófagos e eosinófilos teciduais estão envolvidos em vias de sinalização orquestradas para aumentar seus respectivos números e seus estados de ativação, com intuito de manter ou amplificar as respostas imunes locais (JACOBSON *et al.*, 2007).

- Células dendríticas

A indução da maturação de células dendríticas (DCs) pode ser dependente da proteína básica principal (MBP), já que estas internalizam a MBP (LOTFI e LOTZE, 2008). YANG *et al.* (2003) demonstraram que a ribonuclease associada a eosinófilos (EDN) induz o recrutamento seletivo e a liberação de citocinas inflamatórias por células dendríticas. O fato de que dois componentes proeminentes dos grânulos eosinofílicos, MBP e EDN, podem ter efeitos profundos sobre a maturação e a função das DCs é sugestivo de que os eosinófilos podem exercer funções de regulação destas células.

- Neutrófilos

Os eosinófilos parecem exercer um efeito imunorregulador sobre neutrófilos através da ação da MBP, visto que esta tem a capacidade de se ligar a neutrófilos humanos e provocar sua ativação (SHENOY *et al.*, 2003).

1.4.7.2 Secreção de citocinas

A secreção de citocinas por eosinófilos é um processo regulado e dependente de estímulos. Numerosas moléculas funcionam como secretagogos para eosinófilos. Substâncias quimioatraentes para eosinófilos, como as eotaxinas, provocam a secreção de citocinas juntamente com sua migração (BANDEIRA-MELO *et al.*, 2001). Vários outros estímulos, como por exemplo, mediadores lipídicos, fator ativador de plaquetas (PAF), fragmentos do complemento, interações com agentes patogênicos ou com seus produtos secretados direta ou indiretamente induzem à secreção de citocinas pelos eosinófilos.

Para que ocorra a secreção de citocinas induzida por estímulos, é necessário que os eosinófilos expressem uma multiplicidade de receptores em suas membranas, incluindo receptores para moléculas de adesão, de citocinas (por exemplo, IL-5R, IL-4R, IL-13R, GM-CSFR), de quimiocinas (por exemplo, CCR3), de frações do complemento, de imunoglobulinas (por exemplo, Fc ϵ RII), de leucotrienos, de fatores de crescimento (por exemplo, TGF- β receptor) e receptores do tipo toll-like (TLRs). Curiosamente, eosinófilos também são importantes fontes de ligantes que se ligam a estes receptores, sugerindo a existência de uma regulação autócrina e parácrina local (TACHIMOTO e BOCHNER, 2000). Além disso, eosinófilos expressam moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC classe II) e moléculas co-estimulatórias, necessárias para a ativação e proliferação das células T (HOGAN *et al.*, 2008).

Eosinófilos são capazes de secretar uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-16, IL-18, IFN- γ , TNF- α , NGF, GM-CSF e TGF- α/β), quimiocinas (RANTES e eotaxina-1) e mediadores lipídicos (fator ativador de plaquetas – PAF, leucotrieno C4 - LTC4) (KITA, 1996). Estas moléculas têm efeitos pró-inflamatórios, incluindo a regulação positiva dos sistemas de adesão, tráfico, ativação e modulação celular, regulação da permeabilidade vascular, secreção de muco e constrição do músculo liso (Fig.27).

Além de produzir citocinas, eosinófilos secretam mediadores com o potencial de promover respostas imunes do tipo Th2. A indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) é uma enzima que promove o catabolismo oxidativo do triptofano para cinureninas. As cinureninas inibem a proliferação e promovem a apoptose de células Th1 preferencialmente (TERNESS *et al.*, 2002).

Além das contribuições dos eosinófilos como secretores de citocinas no contexto das doenças, a secreção de citocinas por eosinófilos do tecido residente é vital para a manutenção imunológica e metabólica de células relevantes, como as células B produtoras de imunoglobulinas do baço (WANG e WELLER, 2008), células plasmáticas da medula óssea (CHU *et al.*, 2011), macrófagos alternativamente ativados presentes no tecido adiposo (WU *et al.*, 2011), etc. Assim, tanto nas condições patológicas quanto fisiológicas, para manutenção da homeostase, as citocinas derivadas de eosinófilos desempenham efeitos biológicos relevantes (Fig.27).

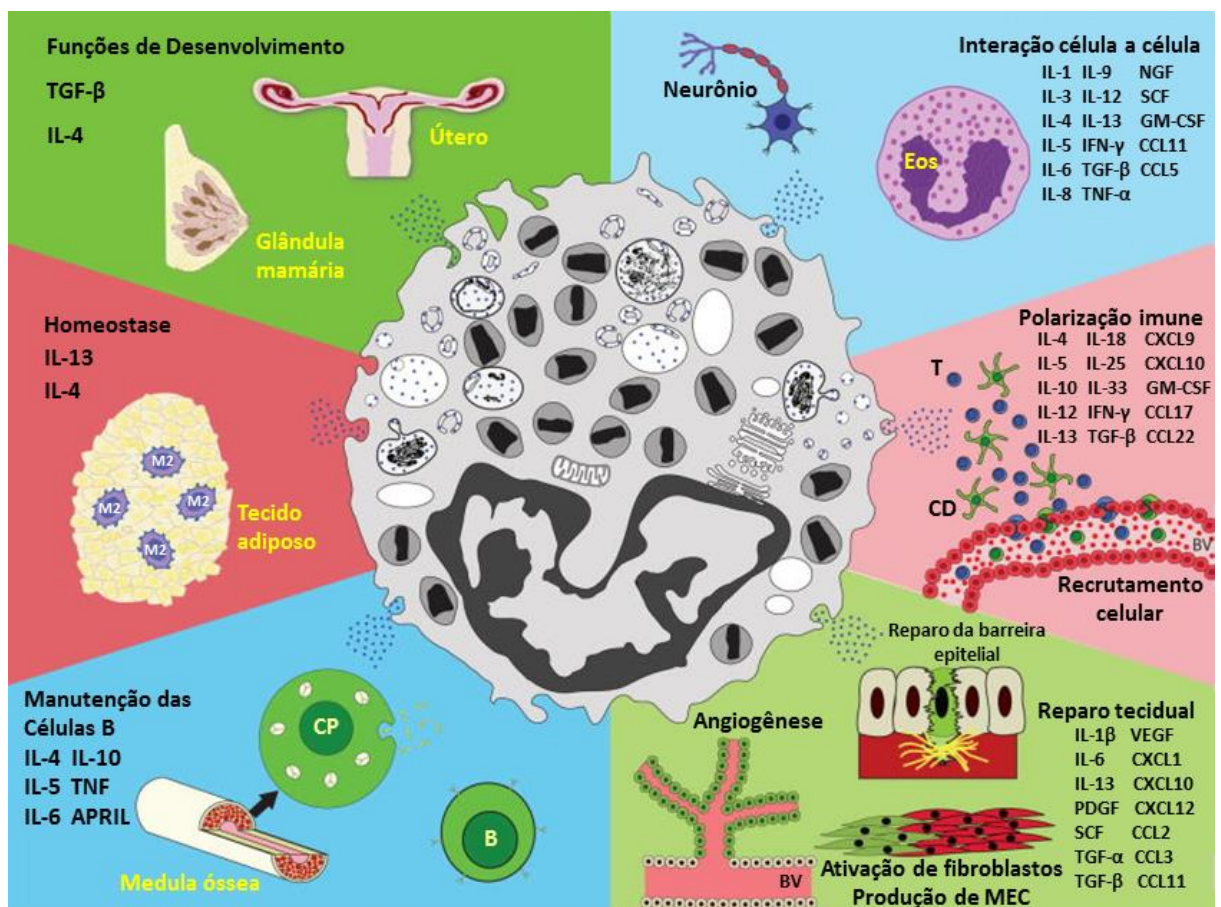


Figura 27: Efeitos biológicos das citocinas derivadas dos eosinófilos na homeostase e na doença. Eosinófilos secretam numerosas citocinas com várias funções biológicas na manutenção da homeostase (painéis à esquerda) e na promoção de processos patológicos (painéis da direita). Algumas citocinas envolvidas nos processos relacionados são mostradas na figura. M2=macrófagos alternativamente ativados; CP=célula plasmática; B=célula B; BV=vaso sanguíneo; Eos=eosinófilos; T=células T; CD=células dendríticas. Adaptado de MELO *et al.* (2013 a).

1.4.8 Eosinófilos e Infecções Helmínticas

Helmintos são seres multicelulares, morfológica e funcionalmente distintos, variando desde vermes achatados (Cestoda), vermes em forma de folha (Trematoda), vermes com espinhos (Acanthocephala) até vermes alongados (Nematoda). Apesar de sua diversidade morfológica e biológica, a infecção de hospedeiros mamíferos por helmintos parasitos induz tipicamente uma resposta do tipo Th2, resultando em proliferação e ativação de eosinófilos induzidas por IL-5. Helmintos se diferenciam de outros parasitos e agentes infecciosos por seu grande tamanho. Uma vez que seu tamanho se opõe à fagocitose, eles precisam ser destruídos de outras formas. Os eosinófilos, com seus grânulos citoplasmáticos contendo várias moléculas tóxicas, que podem ser liberadas no meio extracelular em resposta a estímulos antigênicos, teoricamente parecem ser uma forma bastante adequada de defesa contra helmintos (OVINGTON e BELM, 1997).

Entretanto, apesar de muitas investigações experimentais, o papel destas células do sistema imune nas infecções helmínticas permanece controverso. Já está bem estabelecido que os eosinófilos aderem a uma variedade de larvas de helmintos revestidas por imunoglobulinas *in vitro*; assim, eles liberam o conteúdo de seus grânulos e secretam fatores solúveis que matam as larvas (BRATTIG *et al.*, 1991; JOHNSON *et al.*, 1991). *In vivo*, no entanto, a situação não está clara. Os eosinófilos se acumulam nos tecidos infectados e desgranulam em torno de larvas de helmintos; além disso, são numerosos nas áreas granulomatosas que circundam ovos contendo larvas (LANGE *et al.*, 1994). Proteínas derivadas de eosinófilos também têm sido observadas nas superfícies de larvas mortas e vivas (ACKERMAN *et al.*, 1990), mas a comprovação de que os eosinófilos são diretamente responsáveis pela morte das larvas de helmintos *in vivo* ainda não foi obtida.

Em hospedeiros imunologicamente competentes, infectados por helmintos, o número de eosinófilos aumenta drasticamente, sem aumentos simultâneos nos números de outros leucócitos, de modo que os eosinófilos se tornam o tipo celular predominante. Muitas investigações experimentais têm demonstrado que a eosinofilia é induzida por interleucina 5 (IL-5), mas seu significado funcional permanece obscuro.

Camundongos geneticamente deficientes em IL-5 (IL-5 $-/-$) têm sido utilizados para avaliar as consequências funcionais da eosinofilia dependente de IL-5 nas infecções parasitárias. Em estudo realizado por OVINGTON e BELM (1997), a patologia nos hospedeiros e o grau de infecção foram determinados em camundongos deficientes em IL-5 (IL-5 $-/-$) e em camundongos do tipo selvagem infectados com espécies representativas de cada grupo principal de helmintos. Os efeitos da deficiência de IL-5 foram muito heterogêneos. Das seis espécies de helmintos testadas, a IL-5 não apresentou nenhum efeito detectável nas infecções com três espécies (cestoda e trematoda). Em contraste, as respostas imunes dependentes de IL-5 foram funcionalmente importantes em camundongos infectados com três espécies de nematódeos. Nestes helmintos, a ausência de IL-5 foi relacionada a uma maior sobrevivência dos vermes nos tecidos infectados.

1.4.8.1 Eosinófilos e esquistossomose mansônica

A esquistossomose mansônica é caracterizada clinicamente por um aumento na contagem de eosinófilos na medula óssea e no sangue periférico. Esta resposta também é evidente pelo acúmulo de células ao redor do esquistossômulo invasor e dos ovos do parasito retidos nos tecidos do hospedeiro. Os parasitos passam por uma série de alterações antigênicas e maturacionais dentro do hospedeiro, resultando em dois picos distintos de eosinofilia. O primeiro pico ocorre 20 dias após a infecção, concomitantemente com a passagem dos vermes através do pulmão. O segundo pico corresponde no início da secreção de antígenos solúveis do ovo, da ativação máxima das respostas mediadas por linfócitos T e da formação de granulomas. A composição celular do granuloma é única; durante o pico da infecção, mais de 50% das células são eosinófilos. Mais tarde, em hospedeiros cronicamente infectados, a porcentagem total e o número de eosinófilos nos granulomas diminuem (LENZI *et al.*, 1987).

A patogênese da esquistossomose mansônica, mediada por citocinas, em modelo murino de infecção, inclui uma proeminente fase Th2, resultando em aumento de interleucina-5 (IL-5) no soro, em resposta à deposição do ovo do parasito na circulação porto-hepática, em 6 a 8 semanas após a penetração das cercarias no organismo do hospedeiro vertebrado. Aumentos séricos de IL-5 resultam em maciça eosinofilia periférica e na medula óssea. Logo após, os

eosinófilos são recrutados especificamente para os granulomas em desenvolvimento no fígado e nos intestinos, locais de inflamação ativa e de remodelação tecidual (PEARCE e MACDONALD, 2002).

Evidências histopatológicas de eosinófilos localizados próximos a vermes morrendo em biópsias de tecidos sugerem que estas células são participantes ativos da resposta imune para eliminar os parasitos (ALLEN e MAIZELS, 2011); além disso, estudos de imunofluorescência têm mostrado depósitos de uma proteína granular (MBP) em torno dos ovos do schistosoma, sugerindo que os eosinófilos desgranulam, liberando o conteúdo dos grânulos. Depósitos de proteínas dos grânulos também foram encontrados nos tecidos circundantes, indicando que estas moléculas altamente tóxicas poderiam estar envolvidas nos danos teciduais (KEPHART *et al.*, 1988). Não apenas as proteínas dos grânulos, mas também mediadores pró-inflamatórios têm sido encontrados em granulomas durante a esquistossomose mansônica murina (WEINSTOCK *et al.*, 1988).

Também foi demonstrado que os eosinófilos são capazes de destruir os esquistossômulos, na presença de anticorpos específicos, num clássico mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) (BABU *et al.*, 2006).

Vários pesquisadores começaram a explorar o papel dos eosinófilos na defesa do hospedeiro contra infecções helmínticas *in vivo*, utilizando anticorpos anti-IL-5 e estratégias de bloqueio de sinalização anti-IL-5, porém não há consenso emergente. Em relação à esquistossomose, SHER *et al.*, 1990 administraram o anticorpo monoclonal anti-IL-5 em camundongos e demonstraram que esta citocina (e, por extensão, os eosinófilos) não tiveram impacto sobre a carga parasitária, a fibrose hepática, ou a formação do granuloma característico da infecção pelo *S. mansoni*. BRUNET *et al.*, 1999 estudaram a infecção esquistossomótica em camundongos com o gene suprimido para IL-5 e, do mesmo modo, concluíram que a patologia hepática e a suscetibilidade à infecção foram indistinguíveis entre o tipo selvagem e a linhagem de camundongo com o gene suprimido. Apesar das abordagens anti-IL-5 resultarem em depleção moderada ou severa dos eosinófilos, não ocorre eliminação total da linhagem destas células. Assim, a acumulação de eosinófilos, ainda que reduzida, é uma característica da doença.

Por outro lado, SWARTZ *et al.* (2006) utilizaram modelos murinos de infecção esquistossomótica nos quais houve ablação completa da linhagem de eosinófilos (linhagens de camundongos dbIGATA e TgPHIL). Desta forma, os autores puderam

estudar o papel dos eosinófilos na defesa anti-helmíntica do hospedeiro e descobriram que os eosinófilos não tiveram impacto algum sobre a carga de vermes, a deposição de ovos, ou a formação de granulomas, com exceção da própria depleção de eosinófilos.

Apesar dos dados expostos acima, é evidente que eosinófilos humanos e murinos desempenham papéis importantes nas respostas imunes, independentemente da sua capacidade de desgranular, uma vez que regulam diretamente as respostas das células T e secretam uma gama de mediadores e de citocinas pró-inflamatórias (SPENCER *et al.*, 2006).

Qual seria então, o papel dos eosinófilos na patogênese da infecção helmíntica? Na esquistossomose mansônica, os eosinófilos são recrutados especificamente para os granulomas em resposta aos estímulos Th2, e constituem um componente significativo desta estrutura. Granulomas são geralmente considerados protetores. No entanto, a ausência dos eosinófilos tem um impacto mínimo na patogênese da doença. Se eles não contribuem para reduzir diretamente a histopatologia, por que o recrutamento dos eosinófilos parece ser uma característica essencial dos granulomas?

LEE e LEE (2005) sugeriram que a função primordial e talvez essencial dos eosinófilos na esquistossomose mansônica seja atuando como sequestradores metabólicos. Um grande número de eosinófilos pode ser recrutado para os granulomas, locais de remodelação tecidual, a fim de auxiliar na depuração e desintoxicação de restos celulares.

Já existe literatura considerável sobre o papel dos eosinófilos na remodelação dos tecidos. Por exemplo, vários componentes dos eosinófilos estão implicados na eliminação de detritos e na atividade de remodelação tecidual, incluindo a peroxidase eosinofílica (HORTON *et al.*, 1996), as ribonucleases (ROSENBERG, 1998), as metaloproteinases da matriz (SCHWINGSHACKL *et al.*, 1999) e o inibidor-2 da protease, além do inibidor ativador do plasminogênio (PAI-2) (SWARTZ *et al.*, 2004). Eosinófilos também podem desempenhar um papel importante na manutenção da resposta Th2, pela secreção endógena de IL-4 (SWARTZ *et al.*, 2006). Alternativamente, o papel dos eosinófilos como células apresentadoras de antígenos foi recentemente explorado no contexto da infecção helmíntica (PADIGEL *et al.*, 2006). Adicionalmente, evidências epidemiológicas apoiam o papel da IL-5 e

dos eosinófilos na proteção contra a esquistossomose, em populações humanas, principalmente em relação à proteção contra reinfecções (HAGAN *et al.*, 1985b).

1.5 JUSTIFICATIVA

Parâmetros relacionados à infecção esquistossomótica em modelos murinos de infecção experimental já foram bem estudados; porém, em modelos de infecção natural, ainda são pouco conhecidos. Sabe-se que o roedor *Nectomys squamipes*, também conhecido como rato d'água, é considerado o mais importante reservatório silvestre do parasito *S. mansoni* no Brasil, contribuindo para a epidemiologia da doença (GENTILE *et al.*, 2010). Além disso, este animal, quando infectado, não apresenta sinais clínicos da doença nem diminuição de suas taxas de reprodução e de sobrevivência (D'ANDREA *et al.*, 2000). Adicionalmente, já foi documentado na literatura, através de estudos histopatológicos, que este roedor apresenta lesões teciduais extremamente brandas decorrentes da infecção (SILVA e ANDRADE, 1989). Estas características relacionadas à infecção esquistossomótica neste roedor diferem bastante das encontradas nas infecções experimentais, onde normalmente são observadas lesões teciduais extensas, localizadas principalmente no tecido hepático dos animais de laboratório.

A relação parasito-hospedeiro neste modelo de infecção natural é, portanto, intrigante e motivou o desenvolvimento deste trabalho. Quais os mecanismos estariam envolvidos nesta adaptação tão bem sucedida?

Para tentar elucidar esta questão, foi realizado estudo comparativo da esquistossomose mansônica no roedor *N. squamipes* naturalmente infectado pelo parasito *S. mansoni* e no camundongo Swiss experimentalmente infectado através de análises histopatológicas, bioquímicas e ultraestruturais.

As análises histopatológicas e bioquímicas objetivaram obter uma melhor compreensão de como o rato d'água responde frente ao parasitismo pelo *S. mansoni*. Os eosinófilos são participantes proeminentes da resposta inflamatória granulomatosa e seu estudo se justificou porque suas funções efetoras e/ou imunomoduladoras ainda não foram bem esclarecidas no contexto das infecções parasitárias, principalmente em modelos naturais de infecção esquistossomótica.

Também surgiu o interesse em estudar a influência da esteatose hepática neste modelo de infecção natural, visto que esta se desenvolve devido a diversos

fatores ambientais (BODEN *et al.*, 2005). Já foi demonstrado que os CLs têm uma participação ativa na patogênese da esquistossomose mansônica em modelos experimentais que receberam dieta hiperlipídica, contribuindo para uma melhor modulação da resposta inflamatória e para o aumento da regeneração hepática. Entretanto, em animais capturados no ambiente natural, submetidos a uma dieta livre e diversificada, os efeitos da esteatose não são conhecidos. Desta forma, é possível que o comportamento sedentário, aliado aos hábitos alimentares do *N. squamipes*, favoreçam o desenvolvimento de esteatose, contribuindo para o processo de adaptação deste roedor ao parasitismo pelo *S. mansoni*.

As análises ultraestruturais realizadas neste estudo visaram aprofundar o conhecimento sobre os papéis dos eosinófilos e dos CLs na esquistossomose mansônica neste modelo de infecção natural.

Conjuntamente, estes aspectos nos fazem refletir a respeito da ocorrência de uma adaptação evolutiva entre este roedor silvestre e o parasito *S. mansoni*. Esta compreensão abre perspectivas no sentido de considerar que estamos diante de uma relação ecológica bem estabelecida entre o parasito e seu hospedeiro natural. Em suma, o presente trabalho pretendeu contribuir para o entendimento desta importante e interessante relação ecológica.

.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar aspectos histopatológicos, ultraestruturais e bioquímicos do hospedeiro vertebrado *Nectomys squamipes* durante infecção natural pelo parasito *Schistosoma mansoni*. Em paralelo, comparar com a infecção experimental realizada em camundongos Swiss.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comprometimento tecidual dos órgãos-alvo (fígados e intestinos delgados e grossos) durante infecção esquistossomótica natural em *Nectomys squamipes* e experimental em camundongos Swiss (fases aguda e crônica);
- Avaliar a ocorrência e a ultraestrutura de CLs em hepatócitos durante infecção esquistossomótica nas duas espécies de roedores: *Nectomys squamipes* e o camundongo Swiss (fases aguda e crônica). Além disso, caracterizar a relação da esteatose hepática com o parasitismo pelo *S. mansoni* em modelo natural de infecção.
- Analisar a participação dos eosinófilos nas diferentes fases evolutivas dos granulomas em *Nectomys squamipes* e em camundongos Swiss e estudar as características ultraestruturais dos eosinófilos do roedor silvestre;
- Contribuir com a compreensão da relação parasito-hospedeiro, nestes dois modelos de esquistossomose mansônica.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS SILVESTRES

3.1.1 Área de Estudo

As coletas do roedor *Nectomys squamipes* foram realizadas no município de Sumidouro, (22°02'54,8"S 42°40'30,9"W), localizado na região serrana do estado do Rio de Janeiro, cuja altitude média é de 348 metros, e onde a presença deste roedor tem sido frequentemente registrada (GENTILE *et al.*, 2010). A população total é de 15 mil habitantes, sendo que a maioria vive na área rural. Este município apresenta o pior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH) do estado do Rio de Janeiro (0,611 em 2010) (IBGE, 2015) e é atualmente considerado região de baixa endemicidade para a esquistossomose mansônica humana (SILVA, 2013).

A agricultura, especialmente o cultivo de hortaliças e a criação de gado, com ênfase na produção de leite, são as principais atividades econômicas da região. A paisagem é típica das áreas rurais brasileiras do sudeste, incluindo pequenas propriedades com plantações e pastagens, entremeadas por pequenos fragmentos de Mata Atlântica, principalmente no alto das montanhas. Riachos, áreas inundadas e canais de irrigação são encontrados nos vales.

A região possui um clima mesotérmico úmido (NIMER, 1989), caracterizado pela ocorrência de duas estações climáticas marcantes: uma estação quente e úmida, de outubro a março, cujas temperaturas máximas ocorrem em fevereiro e as médias máximas de precipitação ocorrem em dezembro e janeiro, e uma estação seca e fria, de abril até setembro, sendo que as menores temperaturas são registradas em julho (dados meteorológicos obtidos no Instituto Nacional de Meteorologia do Rio de Janeiro, sobre a Estação do Município do Carmo).

As condições ambientais das áreas rurais de Sumidouro são caracterizadas pela contaminação fecal das águas utilizadas para abastecimento de residências e lavouras, devido a despejos de esgotos *in natura*. Também foi observada a proliferação de moluscos hospedeiros intermediários, causada pelo alagamento de terrenos, inexistência de cobertura vegetal e alterações na topografia, decorrentes da utilização da terra para agropecuária. A contaminação ambiental por uso indiscriminado de pesticidas, o assoreamento de coleções hídricas e o crescente

desmatamento no entorno das nascentes dos corpos d'água tornam a questão ambiental nesta região ainda mais complexa (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

3.1.2 Captura dos Roedores

Foram feitas coletas de *N. squamipes* em três momentos: março, julho e setembro de 2013. Foram estabelecidos transectos de captura ao longo dos córregos e canais de irrigação das áreas rurais, que constituem o habitat deste roedor. Os roedores foram capturados em armadilhas metálicas do tipo Tomahawk®, medindo 40 cm X 64 cm X 12.70 cm, utilizadas para captura de pequenos mamíferos terrestres vivos. As armadilhas foram dispostas no chão, distantes 15 metros umas das outras. A isca utilizada foi uma mistura de pasta de amendoim, banana, aveia e bacon. As armadilhas foram colocadas nos locais de captura durante cinco dias consecutivos, e a cada manhã, estas eram checadas para verificação da presença de animais e de iscas. O esforço de captura das coletas de Março e Julho de 2013 foi de 450 armadilhas-noite em cada, e o da coleta de Setembro de 2013 foi de 330 armadilhas-noite. No total, o esforço de captura foi de 1230 armadilhas-noite.

Para este estudo, foram utilizados três espécimes de *N. squamipes* positivos para infecção por *Schistosoma mansoni*, sendo um dos animais coletado em julho de 2013 (LBCE 18269 – macho adulto) na localidade do Encanto (22°02'43,1"S - 42°37'10,5"W) e dois em setembro de 2013 (LBCE 18322 – macho adulto; LBCE 18325 – fêmea adulta) na localidade de Piedade (22°03'13,2"S - 42°36'31,3"W). Os animais LBCE 18322 e LBCE 18325 estavam coinfectados com *Tricostrongyloidea* (Nematoda) no intestino delgado, e com *Physaloptera bispiculata* no estômago (Nematoda). Três espécimes de *N. squamipes* não infectados pelo *S. mansoni*, capturados em março de 2013, um na localidade de Porteira Verde (22°02'25,2"S - 42°39'24,9"W) (LBCE 18220 – macho adulto) e os outros dois na localidade Fazenda do Pamparrão (22°01'47,4"S - 42°39'18,9"W) (LBCE 18221 – macho adulto; LBCE 18222 – fêmea adulta) foram usados como animais controles. Estes espécimes, apesar de não estarem infectados com o *S. mansoni*, apresentavam-se infectados com as seguintes espécies de helmintos: LBCE 18220 – *Litomosoides* sp. na cavidade abdominal; *Physaloptera bispiculata* no estômago; LBCE 18221 –

Echinostoma paraensei no intestino delgado; LBCE 18222 – Cestoda (não se sabe a espécie) no intestino grosso.

3.1.3 Eutanásia e Obtenção das Amostras

Os animais foram eutanasiados por exsanguinação (sangria total) em anestesia profunda através de punção cardíaca. Os protocolos anestésicos incluíram o Cloridrato de Ketamina (100mg/mL) associado à Acepromazina (10mg/mL) na proporção de 9:1 para roedores, numa dose de 0,15mL/100g de peso. Os animais foram pesados, medidos e seus sexos verificados. Os sangues foram coletados por punção cardíaca, sem anticoagulante. Foi feita a perfusão do sistema porta-hepático, de acordo com SMITHERS e TERRY (1965). Para este procedimento, utilizou-se salina a 1,8%, inoculada através do ventrículo direito e um perfusor Brewer®, também conhecido como Automatic Pippeting Machine (cat number 60480, model 40A, Scientific Equipment Products, Baltimore, Maryland, patent number 2148899). Os animais infectados foram identificados pela presença de vermes adultos nas veias mesentéricas e a positividade foi confirmada pelo achado de ovos do parasito em exames coprológicos (HOFFMAN *et al.*, 1934). Os fígados e os intestinos foram removidos e processados para estudos histológicos e ultraestruturais.

3.1.4 Licenciamento para Captura e Comitê de Ética

As expedições para captura dos animais foram realizadas juntamente com pessoal técnico do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, e foram autorizadas por Licença Permanente de coleta/captura em todo território nacional, em nome de Paulo Sérgio D'Andrea (IBAMA – SISBIO número 13373-1). Todos os procedimentos com os animais foram realizados no campo, de acordo com as normas de biossegurança nível três e segundo protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de animais da Fiocruz número LW81/12.

3.2 ANIMAIS DE LABORATÓRIO

3.2.1 Infecção Experimental

Para a infecção experimental, foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem Swiss Webster (n=12). Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO), do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG e pelo Biotério do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da UFJF. Os animais foram alojados em grupos de seis, em gaiolas de plástico, com tampa de aço inoxidável e cama de maravalha de pinho branco autoclavada. Água filtrada e ração para camundongos (Nuvilab – Nuvital Ltda., Curitiba, PR) foram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todo o experimento. Os animais foram mantidos no Biotério de apoio do Laboratório de Biologia Celular à temperatura ambiente de $23 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa do ar em torno de 70% e ciclo de claro-escuro constante (período claro de 06 às 18 horas). As trocas das camas de maravalha foram realizadas duas vezes por semana.

Aos 120 dias de idade, os camundongos foram infectados experimentalmente com cercarias de *S. mansoni* da cepa LE/BH, no Laboratório de Esquistossomose e Imunohelmintologia da UFMG. Camundongos (n=6) foram inoculados por via subcutânea na região cervical com cerca de 100 cercarias diluídas em água deionizada, recém-emetidas de caramujos *Biomphalaria glabrata*. Para aferir a quantidade de larvas para a inoculação dos animais, as cercarias foram contabilizadas em estereomicroscópio (Zeiss Stemi SV11, Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha), até atingirem a concentração final desejada. O ciclo de vida do parasito *S. mansoni* é mantido rotineiramente no referido laboratório. Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, previamente infectados com miracídios originários de camundongos Swiss Webster infectados, são acondicionados em aquários, em condições ideais de temperatura e expostos à luz artificial para liberação das cercarias.

Todos os animais infectados experimentalmente estavam positivos para a infecção pelo *S. mansoni*, devido ao encontro dos ovos do parasito nas fezes (HOFFMAN *et al.*, 1934), em torno de 5 semanas após a infecção.

3.2.2 Eutanásia e Obtenção das Amostras

Três animais foram eutanasiados após 55 dias de infecção (fase aguda) juntamente com outros três animais não infectados (controles) de mesma idade. Para o estudo da fase crônica da infecção, três camundongos infectados foram eutanasiados com 120 dias de infecção, juntamente com três animais controles de mesma idade. Os animais experimentais foram eutanasiados utilizando a mesma metodologia aplicada aos animais silvestres e foram perfundidos com salina a 1,8%. Seus sangues foram obtidos por punção cardíaca e centrifugados para obtenção dos soros. Os animais foram pesados e medidos e seus órgãos (fígados e intestinos) foram coletados e processados de acordo com as técnicas descritas a seguir.

3.2.3 Comitê de Ética

Todos os procedimentos experimentais realizados nos animais de laboratório seguiram as recomendações da Comissão de Ética e Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz (CEUA/FIOCRUZ # LW-32/2012).

3.3 ANÁLISES HISTOLÓGICAS

3.3.1 Preparações Histológicas e Colorações

As amostras dos fígados de *N. squamipes* e de camundongos Swiss foram removidas a partir do lóbulo direito do órgão e foram divididas em fragmentos de aproximadamente 5 mm³, sendo estes imediatamente fixados em uma solução de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) a 4% overnight a 4° C. No dia seguinte, os fragmentos foram transferidos para uma solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3 e mantidos nesta solução a 4° C até processamento histológico e análise em microscopia de luz. O mesmo procedimento foi adotado para as amostras de intestinos. Neste caso, duas amostras foram retiradas de cada animal, uma proveniente da porção média do intestino delgado e uma proveniente da porção média do intestino grosso.

Para as análises histológicas, foi utilizada a técnica de inclusão em resina glicometacrilato (GMA) (Leica Historesin Embedding Kit, Leica Biosystems, Heidelberg, Alemanha) (CHIARINI-GARCIA *et al.*, 2011).

Para a inclusão em GMA, os fragmentos dos tecidos foram lavados em solução tampão por 10 a 15 minutos. Em seguida, foram desidratados em uma série crescente de etanóis [70°, 80°, 90° e 100° (2 vezes)] por 20 minutos cada. Após a desidratação, seguiu-se a etapa de infiltração em duas sequências de resinas, por 2 horas e *overnight*, respectivamente. No dia seguinte, os fragmentos foram retirados da segunda resina e colocados cuidadosamente no fundo de forminhas próprias, onde a solução de inclusão foi acrescentada. As forminhas foram então colocadas em recipiente gelado por 2 horas, a fim de evitar a retração do tecido, uma vez que a polimerização do GMA constitui uma reação exotérmica, com alta produção e liberação de calor. A polimerização foi finalizada em até 2 dias, em temperatura ambiente, e uma resina acrílica de dentista (Jet, Dental Cremer, Blumenau, SC) foi acrescentada aos blocos de GMA para colá-los aos suportes de madeira, necessários para a etapa de microtomia.

Cortes de 3 µm de espessura foram obtidos utilizando-se navalha de vidro em micrótomo Leica RM2155 e distendidos em banho histológico MJ-72 (Metalúrgica OMA Ltda., São Paulo, SP) à temperatura ambiente por até 2 minutos. Em seguida, os cortes histológicos foram pescados em lâminas de vidro e fixados à 60°C em placa aquecedora (Fisher Scientific Company) por 2 minutos. Três secções de cada órgão foram obtidas com um intervalo de 300 µm entre uma secção e outra, para garantir que granulomas diferentes fossem analisados.

Também foi realizada inclusão em uma mistura de parafina com polímeros plásticos (Paraplast®, Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos). Os fragmentos foram submetidos às etapas de desidratação, em série crescente de álcoois [70°, 80°, 90°, 100° (3 vezes)], seguida das etapas de diafanização em solução de xilol e impregnação e inclusão de rotina em Paraplast. Os blocos foram submetidos à microtomia, obtendo-se secções de 5 µm de espessura coletadas em lâminas histológicas.

Os cortes histológicos foram corados com os corantes Hematoxilina-Eosina para visualização dos granulomas e infiltrados inflamatórios. A coloração com a Hematoxilina-Eosina (Sigma-Aldrich) seguiu o protocolo descrito abaixo:

- a) Solução mordente de alúmen de ferro (Sigma-Aldrich) a 2% por 10 minutos;

- b) Água corrente por 5 minutos;
- c) Hematoxilina de Harris por 5 minutos;
- d) Água corrente por 10 minutos;
- e) Eosina aquosa por 2 minutos e 30 segundos;
- f) Água corrente até que o excesso de corante seja retirado;
- g) Secagem à temperatura ambiente;
- h) Montagem da lâmina com Entellan® novo (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha).

Também foi realizada a coloração com Tricrômico de Gomori, objetivando uma melhor visualização das fibras colágenas presentes nos granulomas esquistossomóticos, conforme protocolo a seguir (GRUNET, 1978):

- a) Corar bem os núcleos das células com Hematoxilina por 1 minuto;
- b) Lavar em água corrente;
- c) Corar com a solução principal por 1 minuto;
- d) Lavar com uma solução aquosa de ácido acético a 0,2%;
- e) Desidratar com álcool, limpar e montar a lâmina.

A solução principal é preparada com Chromotrope 2R: 0,6g; Verde Rápido FCF: 0,3g; Ácido fosfotúngstico: 0,6g; Ácido acético glacial 1mL; Água destilada qsp100mL. Ajustar o pH para 3,4.

Após a montagem das lâminas com Entellan® novo, estas foram escaneadas utilizando-se o equipamento Pannoramic Scan 3D Histech (3D Histech kft., Budapeste, Hungria) acoplado a um computador (Fujitsu Technology Solutions GmbH, Munique, Alemanha). Com o auxílio do software Pannoramic Viewer 1.15.2 SP2 RTM (3D Histech kft., Budapeste, Hungria), que permite trabalhar com imagens digitalizadas a partir de lâminas escaneadas, as áreas dos cortes, dos granulomas e dos infiltrados inflamatórios foram medidas e os granulomas foram contados e classificados quanto à fase evolutiva em que se encontravam nos tecidos. Além disso, através do programa computacional de quantificação Histoquant, todos os eosinófilos presentes nos granulomas encontrados foram contados.

Este equipamento e seus softwares associados permitiram quantificações precisas dos diferentes parâmetros histopatológicos relacionados à infecção pelo *S. mansoni*, com a possibilidade de investigação de toda a extensão do corte histológico, e não apenas de determinados campos microscópicos (Fig.28).

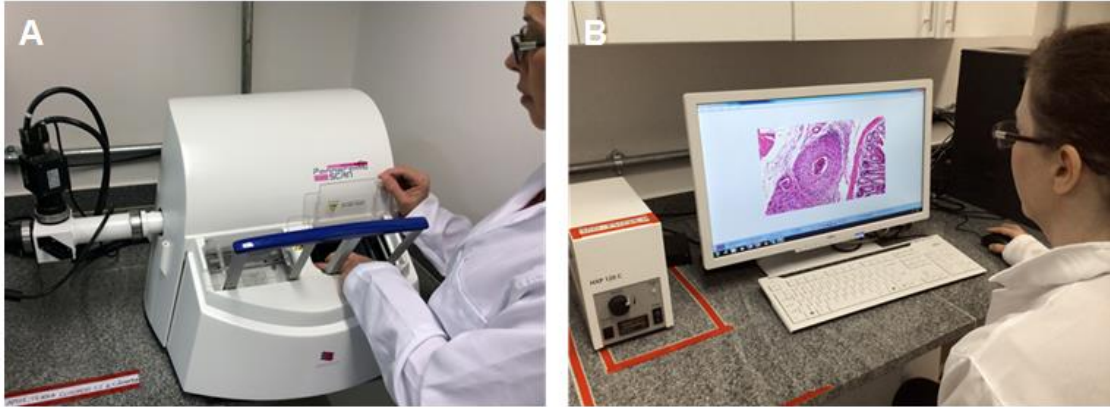


Figura 28: Equipamento Scanner de lâminas Panoramic Scan 3D Histech. Observe em (A), o módulo do Scanner, onde as lâminas histológicas são introduzidas para o escaneamento. Em (B), imagem digitalizada de um corte histológico na tela do computador acoplado ao módulo Scanner.

3.3.2 Classificação dos Granulomas

Para as análises dos granulomas no presente estudo, somente foram considerados granulomas que continham pelo menos um ovo de *S. mansoni* em seu interior.

A classificação das fases evolutivas dos granulomas foi realizada de acordo com estudos anteriores (RASO e BOGLIOLO, 1970; LENZI *et al.*, 1998; LINS *et al.*, 2008). Desta forma, foi adotada uma classificação composta pelas quatro principais fases evolutivas:

- [1] pré-granulomatosa exsudativa (PE) - caracterizada pela presença de um infiltrado de células inflamatórias ao redor do ovo do parasito;
- [2] necrótico-exsudativa (NE) - caracterizada por um halo central de necrose e numerosas células inflamatórias distribuídas irregularmente nas camadas subsequentes;
- [3] exsudativo-produtiva (EP) - caracterizada por uma estrutura rica em fibras colágenas e células inflamatórias, apresentando um aspecto mais organizado e circunferencial;
- [4] produtiva (P) - caracterizada por uma faixa espessa de fibras colágenas entre o ovo e as células inflamatórias, mais concentradas na periferia.

As diferentes fases evolutivas dos granulomas em *N. squamipes* e em Swiss foram quantificadas e as frequências médias de cada fase foram calculadas. As áreas dos granulomas e de infiltrados inflamatórios foram medidas utilizando o

software Panoramic Viewer, sendo determinadas as áreas médias por tipo de granuloma. Foram contabilizados 348 granulomas em *N. squamipes*, 202 granulomas em camundongos Swiss de fase aguda e 444 granulomas em Swiss de fase crônica.

3.3.3 Comprometimento Tecidual

Para avaliar o grau de comprometimento tecidual dos fígados e intestinos delgados e grossos de *N. squamipes* e de camundongos Swiss (fases aguda e crônica) infectados com o parasito *S. mansoni*, foi realizado o cálculo da porcentagem de comprometimento tecidual. Para este cálculo, foram somadas todas as áreas de granulomas e todas as áreas de infiltrado inflamatório presentes em um corte histológico. O valor obtido foi dividido pela área total da secção do tecido e, assim, obteve-se uma proporção de comprometimento tecidual. Este procedimento foi adotado para os três fragmentos de cada animal (n=3), nos três grupos analisados.

A confluência entre granulomas pode agravar a fibrose tecidual (RASO *et al.*, 2012). Por este motivo, foi investigada a ocorrência e foram calculadas as proporções de granulomas confluentes nos fígados e intestinos delgados e grossos dos animais utilizados neste estudo. Para isso, foram contados os granulomas confluentes presentes em cada fragmento (n=3) de cada animal estudado (n=3), e o número de granulomas confluentes foi dividido pelo número total de granulomas de cada fragmento.

Adicionalmente, uma inspeção minuciosa do tecido hepático dos animais infectados e dos controles, utilizando microscopia de campo claro (Panoramic Viewer), foi realizada para detecção de outras possíveis alterações teciduais que pudessem estar presentes.

3.3.4 Ovos nos Tecidos

A avaliação da distribuição dos ovos do parasito nos tecidos de um hospedeiro é importante para entender mais claramente a dinâmica da infecção esquistossomótica (RIBEIRO *et al.*, 1998). Para avaliar a ocorrência e a distribuição dos ovos do parasito nos tecidos estudados, foram calculadas as médias dos

números de ovos / mm² de tecido presentes nos fígados e intestinos dos animais infectados. Tanto ovos presentes nos granulomas quanto ovos isolados foram contados e o total encontrado foi dividido pela área seccional (em mm²) de cada fragmento (n=3) dos três animais de cada grupo. No total, foram contabilizados 2029 ovos do parasito *S. mansoni*, distribuídos nos três grupos experimentais.

Este procedimento, utilizando áreas seccionais para determinar a densidade de ovos nos tecidos, só foi possível de ser realizado através da utilização do equipamento Panoramic Scan 3D Histech, que permite a medição precisa das áreas dos tecidos analisados. Vários autores (CHEEVER, 1968; RODRIGUES-SILVA, 1988; RIBEIRO *et al.*, 1998) realizaram esta quantificação através do cálculo do número de ovos por grama de tecido, uma técnica trabalhosa, que envolve a digestão prévia dos tecidos.

3.3.5 Eosinófilos

Para avaliar a participação dos eosinófilos na resposta inflamatória granulomatosa, estes foram quantificados com a utilização do software Histoquant (3D Histech kft.), que permitiu marcar manualmente as células de interesse e contabilizá-las automaticamente no programa. Foram quantificados 15785 eosinófilos em *N. squamipes*, 37611 eosinófilos em camundongos Swiss de fase aguda e 38540 eosinófilos em Swiss de fase crônica, distribuídos nos granulomas dos fígados e intestinos. Desta forma, foram estabelecidas as médias de eosinófilos e as proporções de eosinófilos por tipo de granuloma presente nos fígados e intestinos de *N. squamipes* e de Swiss infectados, nas fases aguda e crônica. Adicionalmente, no tipo de granuloma mais frequente de cada grupo estudado, foram quantificados, indistintamente, outros tipos celulares presentes, além dos eosinófilos. Para isso, foram escolhidos aleatoriamente três granulomas do tipo mais frequente de cada fragmento, sendo que foram feitos três fragmentos por animal (n=3). Foram contadas 100 células por granuloma e a proporção de eosinófilos em relação às outras células presentes foi estabelecida.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE CORPÚSCULOS LIPÍDICOS DE HEPATÓCITOS POR MICROSCOPIA DE LUZ

Os CLs dos hepatócitos de *N. squamipes* e de camundongos Swiss (fases aguda e crônica) foram investigados através do uso do corante Oil Red O (ORO) (Sigma-Aldrich-USA) em cortes congelados de fígado feitos em Criostato. O ORO apresenta afinidade por lipídios neutros e é amplamente utilizado para evidenciar CLs através de microscopia de luz de campo claro ou fluorescência (KOOPMAN *et al.*, 2001).

Fragmentos de 5 mm³ dos fígados dos animais infectados e controles foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% overnight a 4°C, sendo depois transferidos para uma solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3 e armazenados em geladeira para processamento posterior.

A seguir, o material biológico fixado foi colocado em uma solução de sacarose a 30% overnight a 4° C para evitar a formação de cristais de gelo que pudessem danificar as células durante o processo de congelamento rápido (MELO *et al.*, 2005). Os fragmentos de fígado foram então envolvidos em uma substância crioprotetora (Tissue Tek®), congelados e cortados em Criostato (Leica Biosystems, modelo CM 1850) em secções de 5 µm cada. Foram feitos cortes seriados com intervalos de 20 µm entre eles. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro (Colorfrost®) que apresentam superfície eletricamente carregada, facilitando a aderência do corte sobre o vidro, e delimitados com caneta hidrofóbica (Vector Laboratories).

O protocolo de coloração utilizado incluiu as seguintes etapas: propilenoglicol a 100% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) por dois minutos, ORO por seis minutos, propilenoglicol a 85% por 1 minuto e duas lavagens da lâmina com água destilada. A utilização do propilenoglicol permite um maior contraste dos componentes corados e auxilia a diferenciação dos CLs. A seguir, foi feita uma contracoloração com Hematoxilina de Harris modificada (sem álcool) por três minutos a fim de evidenciar os núcleos dos hepatócitos. Finalmente, as lâminas foram montadas com glicerol a 70% e lamínula e foram escaneadas utilizando-se o Scanner de lâminas Panoramic Scan 3D Histech.

As contagens dos CLs foram feitas da seguinte forma: utilizando o programa computacional Panoramic Viewer, cinco áreas de 100 000 µm² foram delimitadas em cada secção, sendo que foram feitas três secções para cada animal, totalizando

uma área de análise de 1 500 000 μm^2 por animal. Estas áreas foram delimitadas aleatoriamente no tecido hepático. Nos tecidos infectados, não foram marcadas áreas de infiltrado inflamatório ou de granulomas.

Nas áreas demarcadas, a contagem dos CLs foi feita com o auxílio do software Histoquant, sendo contados todos os CLs e todos os núcleos de hepatócitos presentes. Para o cálculo do número de CLs por hepatócito, o número total de CLs contados foi dividido pelo número total de núcleos dos hepatócitos.

3.5 ANÁLISES ULTRAESTRUTURAIS

3.5.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Fragmentos de fígados e de intestinos foram processados para análises à microscopia eletrônica de transmissão (MET). Fragmentos de 5 mm³ dos tecidos dos animais (*N. squamipes* e Swiss – fases aguda e crônica) infectados e controles, foram fixados por imersão em solução Karnovsky modificada [paraformaldeído (Sigma-Aldrich) a 1% + glutaraldeído (EMS) a 1% + solução tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3] overnight a 4°C e, posteriormente, foram lavados utilizando a mesma solução tampão.

A seguir, os fragmentos dos tecidos foram pós-fixados em tetróxido de Ósmio (EMS) reduzido a 1% por 1 hora [solução de ferrocianeto de potássio (EMS) a 3% em tampão fosfato 0,2 M, adicionada a uma solução de ósmio a 2% em água destilada), em temperatura ambiente e lavados por três vezes em tampão fosfato 0,1M, pH 7,3. Logo após, as amostras passaram por um processo de desidratação em uma série crescente de etanóis [50°, 70°, 85° e 95° (2 vezes de 20 minutos cada) e 100° (2 vezes de 30 minutos)] e acetona (2 vezes de 30 minutos), pré-inclusão em solução de acetona + resina Araldite (EMS) em diferentes concentrações (1:1, 1:2, 1:3) durante 12 horas cada e inclusão em resina Araldite por 3 horas. A polimerização da resina ocorreu em estufa a 45°C por 12 horas e estufa a 60°C de 48 a 72 horas.

Cortes semifinos com cerca de 500nm de espessura foram obtidos em micrótomo Leica RM2155, corados com o azul de toluidina-borato de sódio (azul de toluidina – Sigma Aldrich; tetraborato de sódio – EMS), lavados em água destilada e submetidos à observação ao microscópio de luz. A partir da orientação obtida nos

cortes semifinos, foram feitos cortes ultrafinos de 60-80nm em ultramicrotomo Leica EM UC6. Estes cortes foram colocados em telas de cobre de 200 mesh e submetidos à contrastação pelo citrato de chumbo (EMS) durante 5 minutos. As telas foram então analisadas ao MET a 60 kV (Tecnai - G2-20-FEI 2006, FEI™, Hillsboro, Oregon, USA), no Centro de Microscopia da UFMG. Assim, foram obtidas as imagens digitais e as micrografias usadas neste trabalho.

3.5.2 Análises Morfométricas dos Corpúsculos Lipídicos

Análises quantitativas foram realizadas em micrografias eletrônicas de tecido hepático de *Nectomys squamipes*, infectados e não infectados, tiradas aleatoriamente e analisadas no aumento final de 2950x. Os seguintes parâmetros foram quantificados: i) número de CLs por área seccional de tecido hepático; ii) área dos CLs. Um total de 54 micrografias foi analisado, 27 para o grupo infectado e 27 para o grupo controle. Um total de 530 CLs foi contado e medido. Para as análises morfométricas foi utilizado o programa Image J® (National Institute of Mental Health, USA).

3.5.3 Análises Ultraestruturais dos Eosinófilos de *N. squamipes* e de Swiss

Para análises ultraestruturais de eosinófilos de *N. squamipes* infectados pelo *S. mansoni* e seus controles, foi estudado um total de 65 micrografias [eosinófilos de granulomas hepáticos e intestinais (n=60); eosinófilos intestinais de *N. squamipes* não infectados (n=5)]. Para caracterizar a ultraestrutura destas células, foram realizadas as seguintes análises morfométricas e quantitativas utilizando o software Image J® (National Institute of Mental Health, USA): (1) características gerais da ultraestrutura: área média das células e principais estruturas celulares, como núcleo, vesículas e (2) grânulos: morfologia, área média e número de grânulos por eosinófilo. Para as análises dos eosinófilos de Swiss, foram utilizadas 30 micrografias (15 secções de Swiss infectados na fase aguda e 15 secções de animais não infectados) para fins de comparação com os eosinófilos de *N. squamipes*.

3.6 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Para as dosagens bioquímicas em *N. squamipes*, foi utilizado um total de 26 amostras de soro (13 de *N. squamipes* infectados e 13 de animais não infectados). Estas amostras incluíram os soros dos mesmos animais utilizados nas análises histológicas e ultraestruturais e 20 soros de roedores gentilmente cedidos pela Dra Rosana Gentile, do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, da Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brasil, procedentes de expedições anteriores. O uso de uma amostragem maior proveniente de diferentes coletas foi importante, tendo em vista que não existem dados de referência na literatura sobre estas dosagens bioquímicas. Assim, para melhorar a confiabilidade das dosagens, foram utilizados estes 20 soros adicionais.

As dosagens bioquímicas em camundongos Swiss (n=36), foram realizadas durante a fase aguda (55 dias, n=12) e crônica da infecção (120 dias, n=6) com seus respectivos controles não infectados (controle 55 dias: n= 12 e controle 120 dias: n=6). Vale salientar que foram utilizados os soros coletados neste experimento (n=12) e adicionalmente foram analisadas amostras de outros experimentos do grupo no mesmo modelo de infecção (n=24).

Os sangues dos animais foram coletados por punção cardíaca, sem anticoagulante e foram centrifugados a 3000 RPM por 10 minutos para obtenção dos soros. Os animais não foram submetidos a jejum prévio.

Para avaliar o status nutricional de espécimes de *Nectomys squamipes* adultos capturados na natureza e correlacionar os parâmetros bioquímicos encontrados com parâmetros relacionados à infecção e à esteatose hepática presente nestes animais, foram realizadas dosagens séricas de glicose (perfil glicêmico), colesterol total e triglicerídeos (perfil lipídico), e proteínas totais e frações (perfil proteico).

O ácido úrico foi dosado porque a esteatose hepática causada por consumo excessivo de frutose pode gerar hiperuricemia (HALLFRISCH, 1990).

Também foram feitas dosagens das transaminases hepáticas para avaliar o grau de dano hepatocelular presente nos animais, decorrente da infecção parasitária, da esteatose ou de ambas.

As análises bioquímicas realizadas nos camundongos Swiss serviram de base de comparação para o entendimento de como a infecção pelo *S. mansoni* afeta o metabolismo dos diferentes hospedeiros.

As análises foram feitas de modo automatizado, utilizando-se o aparelho Cobas Mira Plus (Roche®). Para as dosagens séricas de glicose, colesterol total, triglicerídeos e ácido úrico, foi utilizado o método colorimétrico enzimático. Para as dosagens das transaminases hepáticas, foi utilizado o método cinético, e para a determinação das proteínas totais, foi utilizado o método colorimétrico do Biureto. Para a dosagem de albumina, utilizou-se o Verde de Bromocresol. As taxas de globulinas foram obtidas pelo cálculo da diferença entre proteínas totais e albumina. Todos os kits usados nos ensaios foram da marca Bioclin®.

Estudos de laboratório realizados para avaliar parâmetros bioquímicos de animais silvestres são mais informativos quando os resultados são analisados comparando-os com valores normais. Assim, os valores de referência adotados para a interpretação dos resultados deste estudo foram baseados em parâmetros estabelecidos no rato silvestre *Neotoma fuscipes* (WEBER *et al.*, 2002), pertencente à família Cricetidae (mesma família de roedores do gênero *Nectomys*) e no rato Wistar, criado em biotério (MELO DINIZ *et al.*, 2006). No caso do camundongo Swiss, os valores de referência foram baseados em valores publicados por MELO DINIZ *et al.* (2006). Nas análises realizadas por MELO DINIZ *et al.* (2006), foi observado um jejum de seis horas para camundongos e de doze horas para ratos Wistar. Nas dosagens realizadas em *Neotoma fuscipes*, não foi observado jejum prévio.

3.7 CÁLCULO DO ÍNDICE DE LEE

Os animais envolvidos neste estudo foram medidos e pesados para o cálculo do índice de Lee. O índice de Lee é um índice de massa corpórea utilizado para roedores, semelhante ao IMC utilizado para humanos, e correlaciona peso e tamanho corporal, sendo um indicativo do status nutricional do animal, podendo indicar desnutrição ou obesidade. É calculado dividindo-se a raiz cúbica do peso em gramas pelo comprimento do roedor em centímetros (do focinho à base da cauda). Um índice de Lee igual ou inferior a 0,300 é indicativo de peso normal. No caso de

valores superiores 0,300, os roedores são classificados como acima do peso ideal (BERNARDIS e PATTERSON, 1968).

3.8 ESPECTROSCOPIA RAMAN

Para conhecer a composição lipídica dos tecidos hepáticos dos animais infectados e controles (*N. squamipes* e Swiss – fases aguda e crônica), principalmente em relação ao grau de insaturação das amostras, foi realizada a técnica de Raman. Os ácidos graxos saturados geram lipotoxicidade aumentada no tecido hepático, enquanto os insaturados causam uma esteatose benéfica, capaz de proteger o fígado contra os danos causados pela reação inflamatória decorrente da presença dos ovos do parasito (WANG *et al*, 2006).

O estudo de lipídios por espectroscopia Raman permite conhecer a composição química destes compostos em células e tecidos e determinar o grau de insaturação das amostras estudadas. Em muitos casos, essas bandas podem ser marcadoras de patologias, como, por exemplo, esteatose hepática.

3.8.1 Amostras

Foram utilizadas três amostras de *N. squamipes* infectados e três amostras de animais não infectados com o *S. mansoni*. No caso dos camundongos Swiss, foram usados camundongos Swiss infectados (n=3) e controles (n=3) na fase aguda da infecção e animais infectados (n=3) e controles (n=3) na fase crônica da esquistossomose. Todos os procedimentos realizados foram feitos em triplicata, ou seja, três fragmentos para cada animal.

As amostras de tecido hepático foram fixadas em paraformaldeído a 4% e mantidas em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,3 a 4°C em geladeira até processamento para o raman.

3.8.2 Espectros Raman

Os espectros Raman dos tecidos estudados foram obtidos em espectrômetro RFS 100 FT-Raman Bruker (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany) equipado com

microscópio Raman Scope e detector de Ge, refrigerado com nitrogênio líquido. A linha de excitação empregada foi de 1064 nm, usando laser Nd:YAG. As medidas foram feitas com resolução de 4 cm^{-1} , potência do laser de 75 mW, tempo de aquisição de aproximadamente 15 minutos, correspondendo a 1024 acumulações; a faixa espectral utilizada foi de 3500 a 400 cm^{-1} . Os espectros foram coletados em triplicatas (replicatas de substituição) e foi feita a verificação da não destruição da amostra na região de impacto do laser. Nesse caso, foram realizadas medidas de replicatas instrumentais, onde foram obtidos espectros em triplicata de uma mesma amostra. Os espectros foram adquiridos usando o software Opus 6.0 (Bruker Optik GmbH, Ettlingen, Germany).

3.8.3 Tratamento dos Dados

Para a utilização das ferramentas quimiométricas, os dados químicos são arranjados na forma de matrizes de dados, onde cada linha da matriz de dado representa um espectro e as colunas referem-se às variáveis (intensidade Raman em cada número de onda).

Para ter uma visão geral dos espectros obtidos nos diferentes tecidos hepáticos, foram realizadas análises exploratórias empregando a análise de componentes principais (PCA) e a análise de componentes hierárquicos (HCA) por KNN (*k-nearest neighbour*).

O objetivo da PCA é fazer uma análise exploratória inicial, especialmente quando não se conhece a composição das amostras. A PCA é um método que permite resumir informações contidas em um conjunto de dados de alta dimensionalidade em algumas poucas dimensões, permitindo encontrar visualmente tendências e similaridades e entender quais são as variáveis responsáveis pelas similaridades entre as amostras. A PCA decompõe a matriz de dados original em duas matrizes menores, chamadas matrizes de escores e de pesos, que podem ser facilmente interpretadas (BRO *et al.*, 2014).

Um gráfico de escores permite identificar similaridades e diferenças entre as amostras através da formação de agrupamentos, enquanto que o gráfico de pesos (*loadings*) fornece informações sobre a contribuição das variáveis originais para a formação das componentes principais. Isto significa que, se os *loadings* em uma determinada componente principal apresentarem sinais característicos do espectro

de um composto, aquela componente principal descreve principalmente a variação deste composto.

O objetivo da HCA é separar as amostras em grupo, sendo esta separação baseada nas medidas de similaridade entre as amostras (distância entre dois pontos). Quanto menor a distância entre as amostras (no espaço n-dimensional), maior a similaridade entre elas. As amostras vão sendo combinadas em grupos, até que todas formem um único agrupamento e os resultados são mostrados na forma de dendogramas, que expressam graficamente a distância (similaridade) entre as amostras.

A PCA e a HCA foram realizadas em ambiente Matlab 7.10.0 (R2010a). Antes da decomposição da matriz dos espectros, os dados foram pré-processados para remover variações sistemáticas dos dados. Nesse caso, as linhas de base dos espectros foram corrigidas e os espectros foram normalizados para comprimento unitário. O número de componentes principais foi escolhido com base na % da variância total explicada pelas novas componentes.

3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O teste estatístico Two Way ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey foi empregado nas seguintes análises: frequência das fases evolutivas dos granulomas e suas áreas, comprometimento tecidual, proporção de granulomas confluentes, densidade de ovos do parasito nos tecidos dos hospedeiros, densidade de CLs por hepatócito, médias de eosinófilos por tipo de granuloma, proporção de eosinófilos nas diferentes fases evolutivas dos granulomas e proporção de eosinófilos pelo tipo mais frequente de granuloma em cada animal. Estas análises foram feitas utilizando o software Prism 6.01 (Graphpad Software, San Diego, CA). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$. Já o teste estatístico One Way Anova, seguido pelo pós-teste de Tukey, foi usado para avaliar os resultados das análises bioquímicas e do índice de Lee. Para as análises quantitativas ultraestruturais realizadas em *N. squamipes*, onde só havia dois grupos, *N. squamipes* infectados e não infectados, foi empregado o teste T Student. Para as análises relativas ao Raman, foi empregada análise multivariada dos dados.

4 CAPÍTULO 1 - ESTUDO HISTOPATOLÓGICO E BIOQUÍMICO DE ÓRGÃOS-ALVO DURANTE INFECÇÕES POR *SCHISTOSOMA MANSONI* EM *NECTOMYS SQUAMIPES* E EM CAMUNDONGOS SWISS

4.1 INTRODUÇÃO

A infecção esquistossomótica acomete principalmente o fígado e os intestinos dos hospedeiros infectados. Estes órgãos são os mais atingidos por que os ovos do parasito que não conseguem atravessar a mucosa intestinal, no sentido do lúmen, para serem eliminados juntamente com as fezes, ficam retidos nas camadas intestinais ou são levados pelo fluxo sanguíneo da veia porta para o fígado, onde ficam presos devido ao diâmetro insuficiente dos sinusoides, gerando reações inflamatórias granulomatosas (PEARCE, 2005). Parâmetros relacionados à infecção são bem estudados em modelos murinos de infecção experimental; entretanto, em modelos de infecção natural ainda são pouco conhecidos.

Neste capítulo, serão apresentados e discutidos vários aspectos relacionados à histopatologia e à bioquímica da esquistossomose mansônica em *Nectomys squamipes* encontrado naturalmente infectado pelo parasito *Schistosoma mansoni*. Além deste modelo natural, foi utilizado um modelo murino de infecção experimental, para fins de comparação. No modelo de infecção natural, foram utilizados roedores silvestres *N. squamipes*, capturados no município de Sumidouro, Rio de Janeiro, naturalmente infectados com uma cepa simpátrica do parasito. No modelo de infecção experimental, foram utilizados camundongos Swiss experimentalmente infectados com cercarias de *S. mansoni* da cepa LE (procedente de Belo Horizonte, Minas Gerais). Foram realizadas as seguintes análises nos dois modelos de infecção: [1] análises morfométricas das lesões granulomatosas nos fígados e intestinos (ver seção Materiais e Métodos, nºs 3.3.1, 3.3.2 e 3.3.3); [2] dosagens bioquímicas das transaminases hepáticas e das proteínas totais e frações (ver seção Materiais e Métodos, nº 3.6).

Alterações significativas nos parâmetros estudados podem fornecer informações importantes sobre como os diferentes hospedeiros lidam com a infecção pelo parasito *S. mansoni*.

4.2 OBJETIVOS

4.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar o comprometimento tecidual do fígado e dos intestinos delgado e grosso durante infecção esquistossomótica natural em *Nectomys squamipes* e experimental em camundongo Swiss (fases aguda e crônica).

4.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar as fases evolutivas dos granulomas em cortes histológicos de fígados e intestinos nos dois modelos de infecção;

- Avaliar parâmetros morfométricos dos granulomas presentes nos fígados e intestinos nos hospedeiros infectados;

- Investigar alterações teciduais hepáticas decorrentes da infecção esquistossomótica em *N. squamipes* e em camundongos Swiss;

- Verificar a ocorrência e a proporção de ovos nos diferentes tecidos nos dois modelos de infecção;

- Determinar parâmetros bioquímicos indicativos de lesão tecidual hepática nos animais infectados e em seus respectivos controles;

- Compreender parâmetros relacionados à dinâmica da infecção nos diferentes hospedeiros estudados.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Aspectos Macroscópicos

Os fígados dos animais infectados apresentaram aspecto macroscópico diferente do encontrado nos órgãos dos animais não infectados, com numerosos e diminutos granulomas distribuídos em toda sua superfície. Além disso, apresentaram-se maiores e intumescidos, devido à organomegalia causada pela esquistossomose (Fig.29).

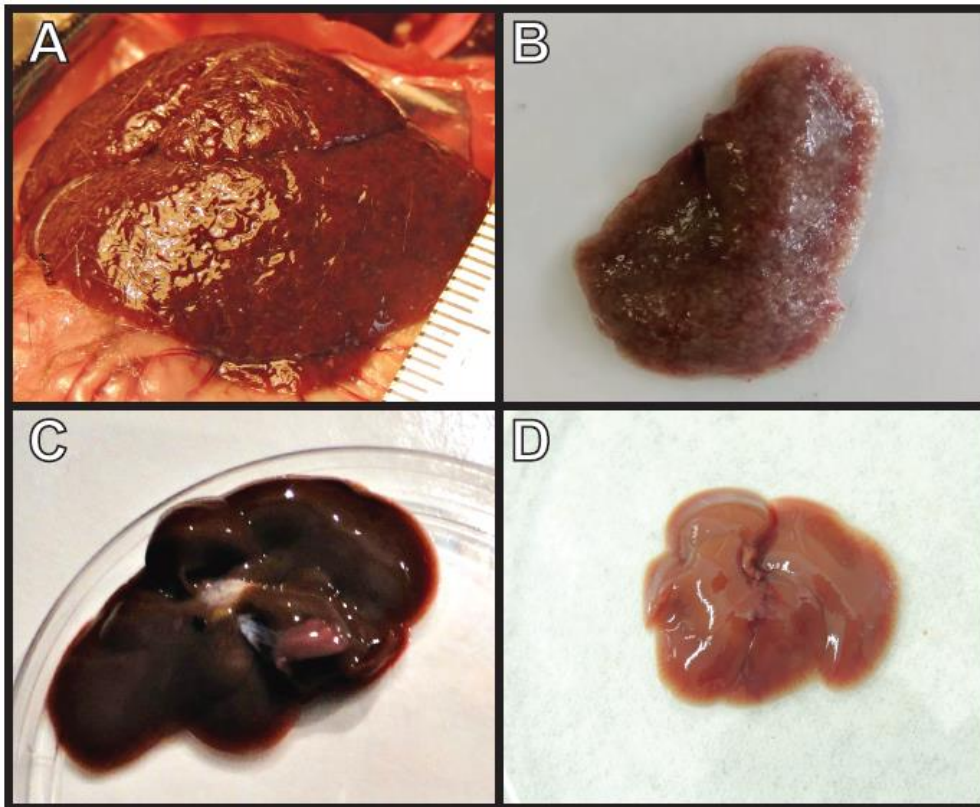


Figura 29: Fígados de *Nectomys squamipes* (A, C) e de Swiss (B, D) infectados (A, B) e não infectados (C, D) pelo parasito *Schistosoma mansoni*. Observe a presença de granulações nas superfícies dos fígados infectados, visíveis macroscopicamente.

4.3.2 Frequência e Área das Fases Evolutivas dos Granulomas

Para investigar a ocorrência e a frequência de granulomas nos fígados e intestinos dos roedores *Nectomys squamipes* e camundongos Swiss infectados pelo *Schistosoma mansoni*, foram realizados cortes histológicos, observados à

microscopia de luz. As análises histológicas mostraram que todos os animais infectados apresentaram granulomas nos fígados e intestinos.

Para estudar a frequência das diferentes fases evolutivas dos granulomas presentes nos animais infectados, estes foram classificados em quatro fases, uma pré-granulomatosa exsudativa (PE) e três granulomatosas: necrótico-exsudativa (NE), exsudativo-produtiva (EP) e produtiva (P) (RASO e BOGLIOLO, 1970; LENZI *et al.*, 1998; LINS *et al.*, 2008).

4.3.2.1 Fígado

No fígado do roedor silvestre *N. squamipes* infectado pelo parasito *S. mansoni*, foi observada a ocorrência concomitante de granulomas em diferentes estágios de maturação. Assim, foram encontradas as seguintes fases evolutivas dos granulomas esquistossomóticos: PE (Fig.30A₁), NE (Fig. 30A₂), EP (Fig.30A₃) e P (Fig.30A₄). Por outro lado, no fígado do camundongo Swiss, na fase aguda da infecção esquistossomótica (55 dias), foram observadas as fases PE (Fig.30A₅), NE (Fig.30A₆) e EP (Fig.30A₇). Não foram encontrados granulomas do tipo produtivo, pois geralmente este tipo de granuloma somente é observado nas fases mais tardias da infecção. Porém, nos Swiss de fase crônica (120 dias de infecção), já foram identificadas as quatro fases evolutivas dos granulomas (PE, NE, EP e P, Fig.30A₈₋₁₁).

Análises quantitativas mostraram que a proporção de PE não diferiu nos três grupos estudados (Fig.30B, $p > 0,05$). Por outro lado, nas outras fases evolutivas, foram encontradas diferenças significativas (Fig.30B, $p < 0,05$). Os animais naturalmente infectados (*N. squamipes*) apresentaram uma maior frequência de granulomas EP ($48,39 \pm 4,46\%$, média \pm EP, $p < 0,0001$) e P ($41,23 \pm 2,94\%$, média \pm EP, $p < 0,0001$), caracteristicamente menores e mais fibróticos. No fígado do Swiss de fase aguda, as análises de frequências indicaram uma maior proporção de granulomas NE ($81,16 \pm 4,92\%$, média \pm EP) enquanto no Swiss de fase crônica, a maioria dos granulomas encontrados foi do tipo EP ($60,74 \pm 2,33\%$, média \pm EP, Fig.30B).

O tamanho e a composição do granuloma refletem a intensidade da reação inflamatória dirigida aos ovos de *S. mansoni* (CHEEVER *et al.*, 1998). Para verificar

o tamanho dos granulomas encontrados no tecido hepático dos animais infectados, suas áreas foram medidas.

Em *N. squamipes*, os maiores granulomas encontrados foram os granulomas NE ($50228 \pm 15992 \mu\text{m}^2$, média \pm EP, Fig.30C). De modo semelhante, nos Swiss de fase aguda, o granuloma que apresentou a maior área média foi o granuloma NE ($68398 \pm 4326 \mu\text{m}^2$, média \pm EP), sendo este significativamente maior que EP ($55450 \pm 703 \mu\text{m}^2$, média \pm EP, $p < 0,0001$) e PE ($33435 \pm 669 \mu\text{m}^2$, média \pm EP, $p < 0,0001$). Nos Swiss de fase crônica, os granulomas NE ($32022 \pm 229 \mu\text{m}^2$, média \pm EP) e EP ($25820 \pm 119 \mu\text{m}^2$, média \pm EP) apresentaram áreas médias estatisticamente semelhantes ($p = 0,741$, Fig.30C).

Vale ressaltar, considerando os três grupos estudados, que os maiores granulomas encontrados foram os granulomas NE dos camundongos Swiss de fase aguda ($p < 0,0001$). Além disso, em *N. squamipes* e Swiss de fase crônica, os tamanhos dos granulomas EP (*N. squamipes* = $21579 \pm 2746 \mu\text{m}^2$; Swiss = $25820 \pm 119 \mu\text{m}^2$, média \pm EP, $p = 0,970$) e P (*N. squamipes* = $14310 \pm 1716 \mu\text{m}^2$; Swiss = $15141 \pm 207 \mu\text{m}^2$, média \pm EP, $p > 0,999$) foram estatisticamente semelhantes (Fig.30C).

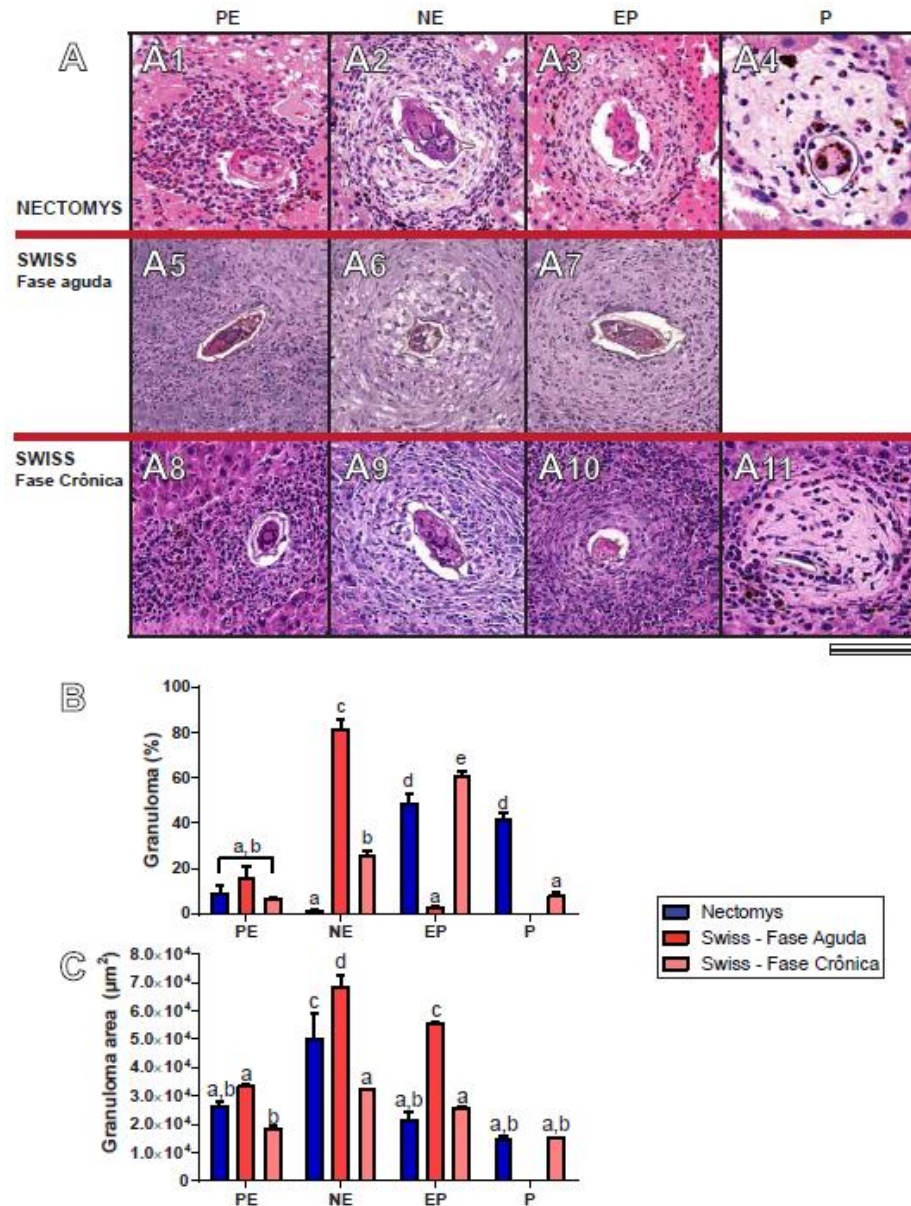


Figura 30: Fases evolutivas dos granulomas hepáticos de *Nectomys squamipes* e de Swiss nas fases aguda (55 dias de infecção) e crônica (120 dias de infecção). Em (A), observe os diferentes aspectos morfológicos dos granulomas nas seguintes fases: (PE) reação pré-granulomatosa exsudativa, (NE) granuloma necrótico-exsudativo, (EP) granuloma exsudativo-produtivo e (P) granuloma produtivo. O gráfico (B) mostra a proporção das fases evolutivas dos granulomas nas duas espécies. Observe em *N. squamipes* a maior frequência de granulomas EP e P; em Swiss de fase aguda, a maior frequência é de granulomas NE, enquanto que na fase crônica da infecção, encontramos uma maior quantidade de granulomas EP. O gráfico (C) mostra que, em geral, as áreas médias dos granulomas de *N. squamipes*, nas diferentes fases evolutivas, são menores do que as encontradas na fase aguda do Swiss e estatisticamente semelhantes às encontradas na fase crônica, com exceção dos granulomas NE. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias ($p < 0,05$). Os fígados foram incluídos em glicolmetacrilato (Swiss de fase aguda) ou em Paraplast (*N. squamipes* e Swiss de fase crônica), corados com HE e observados em microscopia de luz. As imagens foram capturadas em scanner de lâminas e analisadas com o uso do software Panoramic Viewer. Barra = 120 μm (A5, A8); 100 μm (A1, A2, A3, A4, A6, A7, A9, A10); 80 μm (A11).

4.3.2.2 Intestino delgado

Quanto às fases evolutivas dos granulomas esquistossomóticos encontradas nos intestinos delgados dos animais infectados com o *S. mansoni*, observou-se em *N. squamipes* a presença de granulomas EP ($83,65 \pm 2,58\%$, média \pm EP, Fig.31A₁) e P ($16,35 \pm 2,58\%$, média \pm EP, Fig.31A₂), enquanto que no camundongo Swiss (fases aguda e crônica), somente foram encontrados granulomas EP (100,00%, Fig.31A₃₋₄). No intestino delgado de *N. squamipes*, foram observados alguns granulomas produtivos, com poucas células inflamatórias e com deposição de colágeno em quantidades variáveis em torno de cascas de ovos vazias ou de ovos contendo larvas em degeneração (Fig.31A₂).

Ao compararmos a frequência de granulomas EP nas duas espécies de roedores, verificou-se que a proporção de EP em *N. squamipes* ($83,65 \pm 2,58\%$, média \pm EP) foi significativamente menor do que as proporções encontradas nos Swiss de fase aguda e crônica, nos quais foram contabilizados 100,00% de granulomas EP ($p < 0,0001$, Fig.31B).

Análises quantitativas mostraram que, em relação às áreas médias dos granulomas presentes nos intestinos delgados dos animais, as áreas dos granulomas EP ($44298 \pm 4185 \mu\text{m}^2$, média \pm EP) foram significativamente maiores ($p = 0,004$) do que as áreas dos granulomas P ($25970 \pm 5018 \mu\text{m}^2$, média \pm EP) em *N. squamipes*. Por outro lado, observamos que as áreas de EP nos três grupos estudados foram estatisticamente iguais entre si (*N. squamipes* = $44298 \pm 4185 \mu\text{m}^2$; Swiss fase aguda = $33971 \pm 918 \mu\text{m}^2$; Swiss fase crônica = $32033 \pm 151 \mu\text{m}^2$, média \pm EP, $p > 0,05$, Fig.31C).

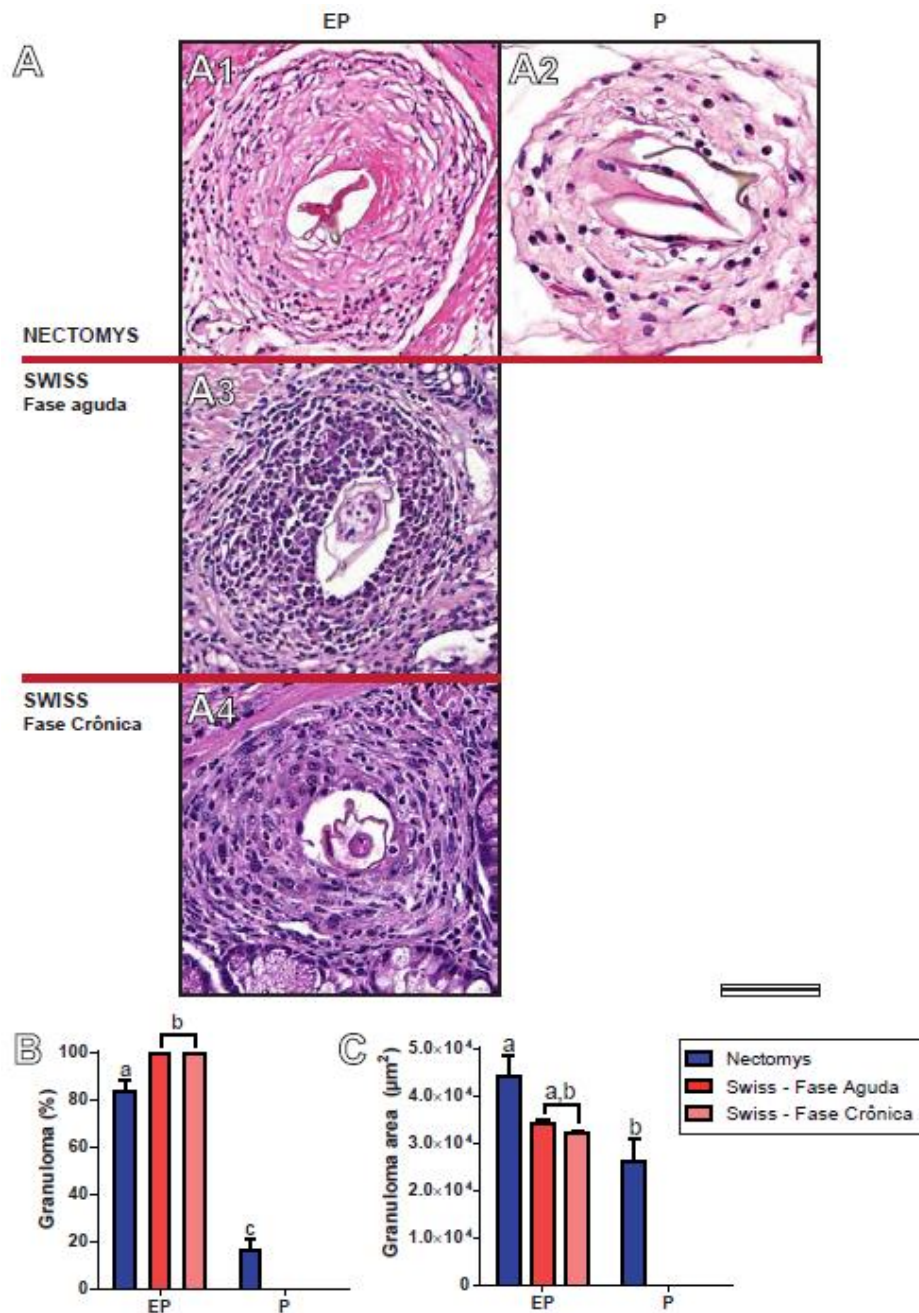


Figura 31: Fases evolutivas dos granulomas presentes no intestino delgado de *Nectomys squamipes* e de Swiss nas fases aguda (55 dias) e crônica (120 dias) da esquistossomose mansônica. Em (A), granulomas exsudativo-produtivo (EP) e produtivo (P) presentes em *N. squamipes* e exsudativo produtivo (EP) presente nas fases aguda e crônica de Swiss. Em (B), observe a maior frequência de granulomas EP (100,00%) encontrada no Swiss (fases aguda e crônica). O gráfico (C) mostra que a área média do granuloma EP não diferiu nas duas espécies. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias ($p < 0,05$). Os cortes histológicos dos intestinos delgados foram incluídos em Paraplast e corados com HE e as imagens foram capturadas em scanner de lâminas em campo claro. As análises quantitativas foram feitas com o uso do software Panoramic Viewer. Barra=100 μm (A1); 70 μm (A2); 50 μm (A3, A4).

4.3.2.3 Intestino grosso

Nos intestinos grossos dos animais infectados, foram encontradas as seguintes fases evolutivas dos granulomas em torno dos ovos de *S. mansoni*: fases PE e EP em *N. squamipes* (Fig.32A₁, Fig.32A₂) e em Swiss de fase aguda (Fig.32A₃, Fig.32A₄), e fase EP (Fig.32A₅) em Swiss de fase crônica. Nos intestinos grossos de *N. squamipes* e de Swiss de fase aguda, foram observadas reações pré-granulomatosas exsudativas (PE), ricas em eosinófilos, circundando ovos do parasito *S. mansoni* (Fig.32A₁ e Fig.32A₃).

O gráfico B mostra as frequências das fases EP e PE nos três grupos estudados. Nota-se que a proporção de granulomas EP ($86,38 \pm 5,97\%$, média \pm EP) foi significativamente maior do que a proporção de PE ($13,62 \pm 5,97\%$, média \pm EP) em *N. squamipes* ($p=0,004$). Por outro lado, as frequências de EP ($41,85 \pm 17,52\%$, média \pm EP) e PE ($58,15 \pm 17,52\%$, média \pm EP) em Swiss de fase aguda foram estatisticamente iguais ($p=0,88$, Fig.32B).

Em relação às áreas ocupadas pelos granulomas EP (*N. squamipes*= $34164 \pm 5223 \mu\text{m}^2$; Swiss fase aguda= $37767 \pm 3222 \mu\text{m}^2$; Swiss fase crônica= $33250 \pm 372 \mu\text{m}^2$, média \pm EP) e PE (*N. squamipes*= $31876 \pm 4340 \mu\text{m}^2$; Swiss fase aguda= $28402 \pm 1527 \mu\text{m}^2$, média \pm EP) nos intestinos grossos dos animais infectados, observou-se ausência de diferença significativa entre elas ($p>0,05$, Fig.32C).

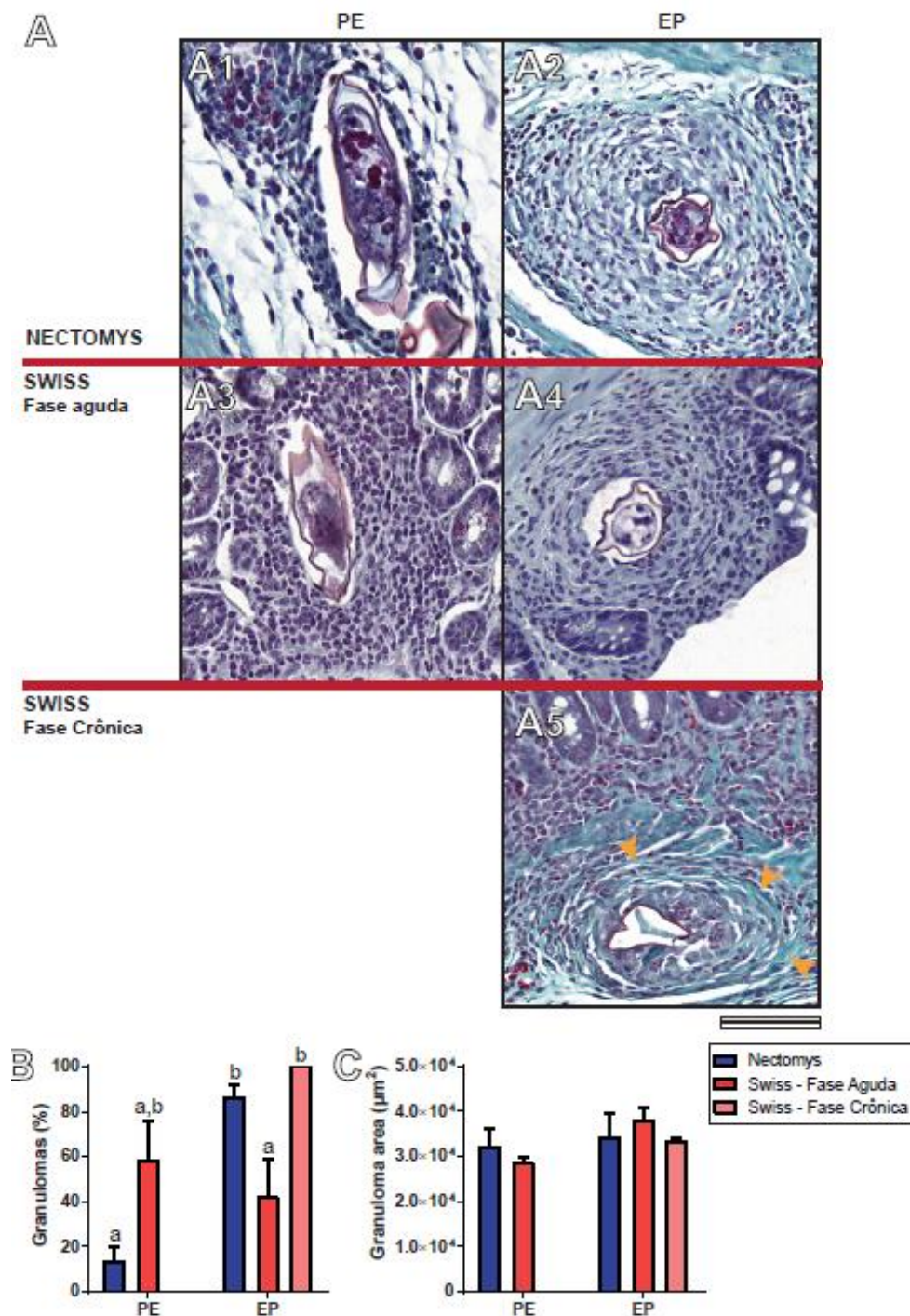


Figura 32: Fases evolutivas dos granulomas encontrados no intestino grosso de *Nectomys squamipes* e de Swiss (fases aguda e crônica). Em (A), note a presença de reações pré-granulomatosas (PE) e de granulomas exsudativo-productivos (EP) nos dois modelos animais. No gráfico (B), observe a maior frequência de granulomas EP em Swiss de fase crônica e em *N. squamipes*. O gráfico (C) mostra a área média dos granulomas EP e PE nas duas espécies de roedores. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias ($p < 0,05$). Os intestinos grossos foram corados com Tricrômico de Gomori. As imagens foram capturadas em scanner de lâminas e analisadas com o uso do software Panoramic Viewer. Observe a proporção acentuada de fibras colágenas, coradas em verde (cabeças de seta). Barra=100 μm (A2, A5); 70 μm (A4); 50 μm (A1, A3).

4.3.3 Comprometimento Tecidual

O comprometimento tecidual decorrente da infecção pelo *Schistosoma mansoni* foi determinado considerando-se as áreas ocupadas por infiltrados inflamatórios e por granulomas nos fígados e intestinos delgados e grossos dos três grupos estudados. Este dado se mostrou muito útil para o entendimento da dinâmica da reação inflamatória presente nos diferentes tecidos dos hospedeiros infectados.

4.3.3.1 Tecidos controles

Nos animais controles de *Nectomys squamipes* e de Swiss (fases aguda e crônica), tanto nos fígados quanto nos intestinos delgados e grossos, não foram observados quaisquer danos ou alterações teciduais. Os fígados controles apresentaram arquitetura preservada, com o parênquima hepático constituído por lóbulos, cordões de hepatócitos, entremeados por sinusoides e espaços portais de aspecto histológico característico (Fig.33A, 33B). A mucosa dos intestinos delgados, por sua vez, apresentou aspecto histológico normal, com criptas e vilosidades recobertas por células epiteliais absortivas e células caliciformes secretoras de muco (Fig.33C, 33D). A mucosa dos intestinos grossos apresentou-se recoberta por células epiteliais cilíndricas e células caliciformes típicas (Fig.33E, 33F). Nos tecidos hepáticos e intestinais de *N. squamipes* controles, não foram observadas lesões histopatológicas à microscopia de luz. Isto indica que, mesmo na presença de coinfeções com outros helmintos parasitos, não ocorreram lesões teciduais como as verificadas nos animais infectados com o *S. mansoni*.

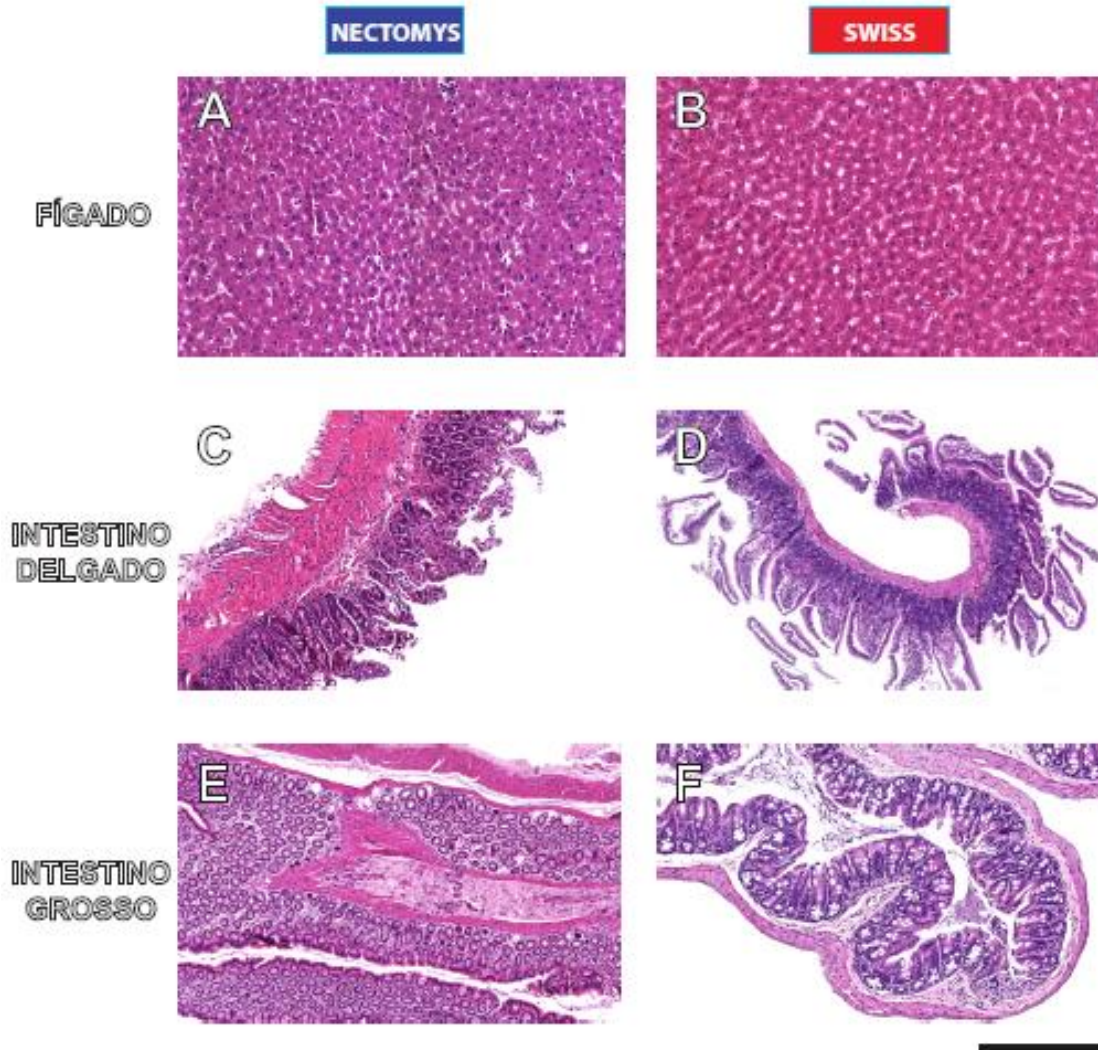


Figura 33: Cortes histológicos dos controles negativos de *Nectomys squamipes* e de Swiss. Observe a morfologia geral dos fígados (A, B), dos intestinos delgados (C, D) e dos intestinos grossos (E, F) de *Nectomys* (A, C, E) e de Swiss (B, D, F). Note os tecidos íntegros, sem lesões aparentes, indicando ausência de patologias. Barra=200 μm (D); 150 μm (C, F); 120 μm (E); 100 μm (A, B).

4.3.3.2 Análise do comprometimento tecidual

O cálculo da porcentagem média de comprometimento tecidual mostrou que no tecido hepático do roedor silvestre *N. squamipes* foi encontrado o menor valor de comprometimento ($5,05 \pm 1,19\%$, média \pm EP), enquanto que no camundongo Swiss na fase aguda da esquistossomose (55 dias de infecção), foi encontrado o maior valor ($46,40 \pm 4,74\%$, média \pm EP). Além disso, no Swiss de fase crônica (120 dias de infecção), observou-se um valor de comprometimento tecidual bem inferior ao observado na fase aguda da doença ($26,62 \pm 0,15\%$, média \pm EP, Fig.34A).

Em relação ao intestino delgado, ao comparar o grau de comprometimento tecidual observado em *N. squamipes* com o observado no Swiss de fase aguda, os resultados obtidos mostraram uma situação inversa à do fígado, ou seja, em *N. squamipes* observou-se um percentual de comprometimento maior ($17,72 \pm 0,88\%$, média \pm EP), enquanto que no Swiss de fase aguda, este percentual foi bem reduzido ($6,47 \pm 0,39\%$, média \pm EP). Entretanto, no Swiss de fase crônica, os resultados foram similares aos encontrados em *N. squamipes* ($17,42 \pm 0,67\%$, média \pm EP, $p=0,999$, Fig.34A).

Quanto aos intestinos grossos, o grau de comprometimento tecidual observado nos três grupos estudados foi pequeno (*N. squamipes*= $2,61 \pm 0,17\%$; Swiss fase aguda= $2,88 \pm 0,86\%$; Swiss fase crônica= $4,70 \pm 0,13\%$, média \pm EP, Fig.34A). As imagens ilustram os diferentes graus de comprometimento tecidual observados nos fígados e intestinos delgados e grossos de *N. squamipes* e de camundongos Swiss nas fases aguda e crônica da esquistossomose mansônica (Fig.34B-J).

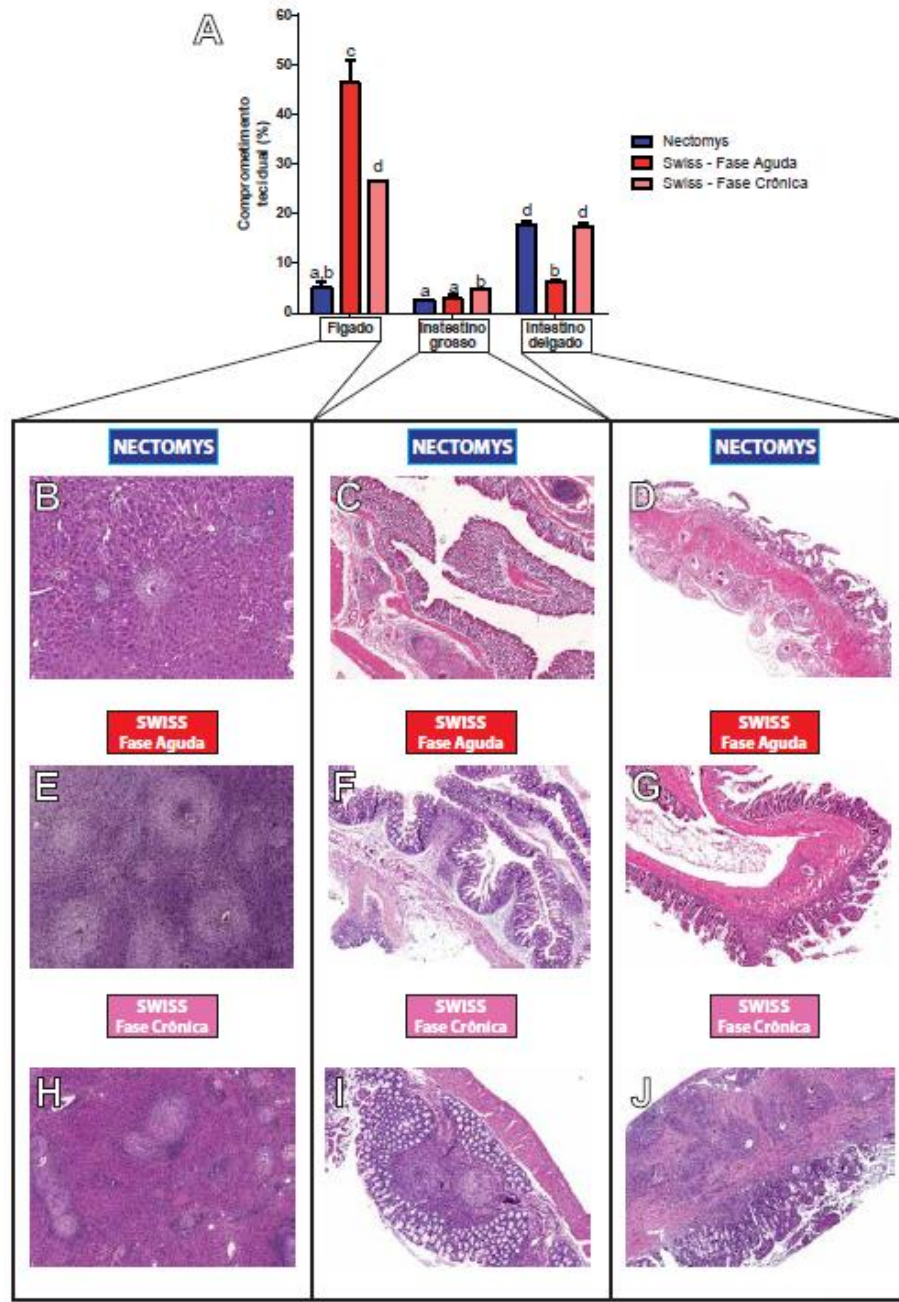


Figura 34: Comprometimento tecidual do fígado e dos intestinos delgado e grosso de *Nectomys squamipes* e de camundongos Swiss nas fases aguda (55 dias) e crônica (120 dias) da infecção esquistossomótica. O gráfico (A) apresenta a porcentagem média de comprometimento tecidual nos fígados e intestinos dos três grupos estudados (média \pm EP, n=3). Em B-J, observe imagens representativas dos tecidos com diferentes níveis de comprometimento. Note em (A-J) que, no tecido hepático, o menor comprometimento foi encontrado em *N. squamipes* ($5,05 \pm 1,19$ %) enquanto o maior ocorreu na fase aguda do Swiss ($46,40 \pm 4,74$ %). Já no intestino delgado, a menor porcentagem de comprometimento foi observada no Swiss de fase aguda. No intestino grosso, os três grupos apresentaram valores baixos de comprometimento tecidual. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias ($p < 0,05$). Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina-eosina (HE), as imagens capturadas em scanner de lâminas Panoramic Scan 3D Histech e analisadas pelo programa computacional Panoramic Viewer. Barra=1000 μ m (B, D, F); 950 μ m (H); 750 μ m (C); 650 μ m (E, G, I, J).

4.3.3.3 Trajeto dos ovos nos intestinos

Nos intestinos delgados e grossos dos animais infectados com o *S. mansoni*, a resposta inflamatória ao redor dos ovos do parasito é útil para que estes consigam atravessar as camadas do intestino em direção à luz do órgão, para serem eliminados juntamente com as fezes, completando o ciclo de vida do parasito (LENZI *et al.*, 1997). Ao eliminar o maior número de ovos do parasito para o meio externo, menos ovos serão embolizados e irão parar no fígado, causando menor dano tecidual hepático (LENZI *et al.*, 1997). Tanto nos intestinos delgados (Fig. 35A, 35B) quanto nos intestinos grossos (Fig. 35C, 35D) de *N. squamipes* e de Swiss, podemos observar o trajeto dos ovos produzido pela reação inflamatória granulomatosa, das camadas mais internas para a luz do órgão.

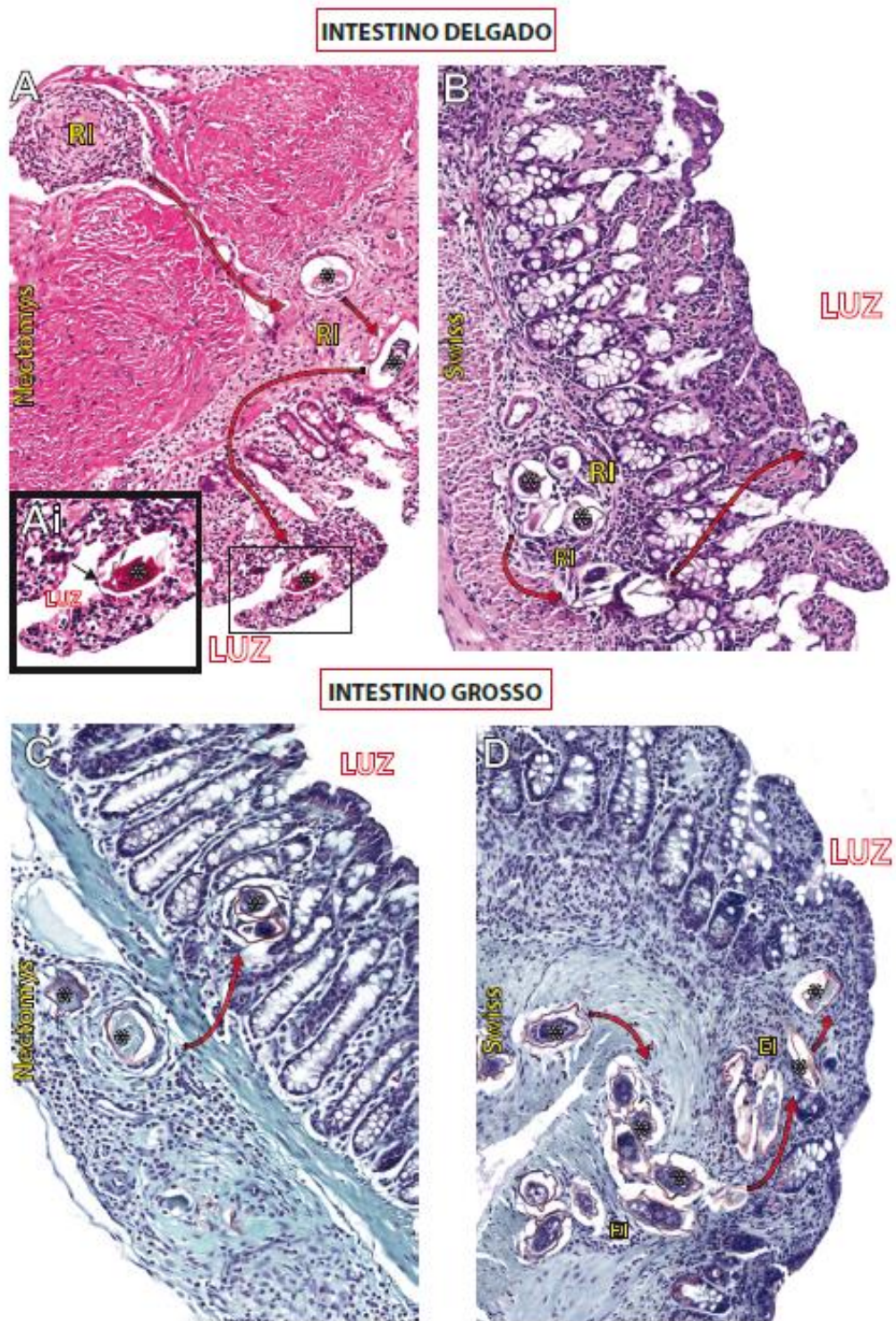


Figura 35: Trajeto dos ovos de *Schistosoma mansoni* nos intestinos delgado (A, B) e grosso (C, D) nos roedores *Nectomys squamipes* (A, C) e Swiss (B, D). Observe que a reação inflamatória granulomatosa (RI) produz um trajeto que conduz os ovos do parasito (*) das camadas mais internas até a luz dos intestinos, conforme mostrado pelas setas. Note no detalhe (Ai), um ovo de *S. mansoni* saindo da vilosidade em direção à luz do intestino delgado. Os intestinos delgados foram corados com HE e os intestinos grossos foram corados com Tricrômico de Gomori e observados em microscopia de luz. As imagens foram obtidas em scanner de lâminas Panoramic Scan 3D Hitech. Barra=160 μ m (A); 120 μ m (B, C, D); 80 μ m (Ai).

4.3.3.4 Outras alterações do tecido hepático

Além do comprometimento tecidual causado pela reação inflamatória, outras alterações foram observadas durante as análises histológicas do fígado, em ambas as espécies de animais infectados pelo *S. mansoni*. Por exemplo, algumas regiões do tecido hepático de animais infectados e até mesmo de animais controles apresentaram estruturas arredondadas, mal coradas, presentes nos hepatócitos, sugestivas de corpúsculos lipídicos. No processamento histológico para microscopia de luz, os lipídios são perdidos e os corpúsculos lipídicos são identificados por espaços em branco no interior das células (imagem negativa) (Fig.36). Sabe-se que a presença de corpúsculos lipídicos em excesso no fígado produz uma condição conhecida como esteatose hepática, que pode contribuir de maneira importante para o aumento do grau de dano hepatocelular (KUCERA e CERVINKOVA, 2014). Este aspecto será estudado detalhadamente no Capítulo 2, referente aos Corpúsculos Lipídicos.

Além disso, foi possível a observação de grumos marrons nas áreas de granuloma e de infiltrados inflamatórios no tecido hepático dos animais infectados (Fig.37). Estes representam o pigmento esquistossomótico denominado hemozoína, geralmente encontrado no citoplasma de macrófagos durante a infecção parasitária (CORRÊA SOARES *et al.*, 2007).

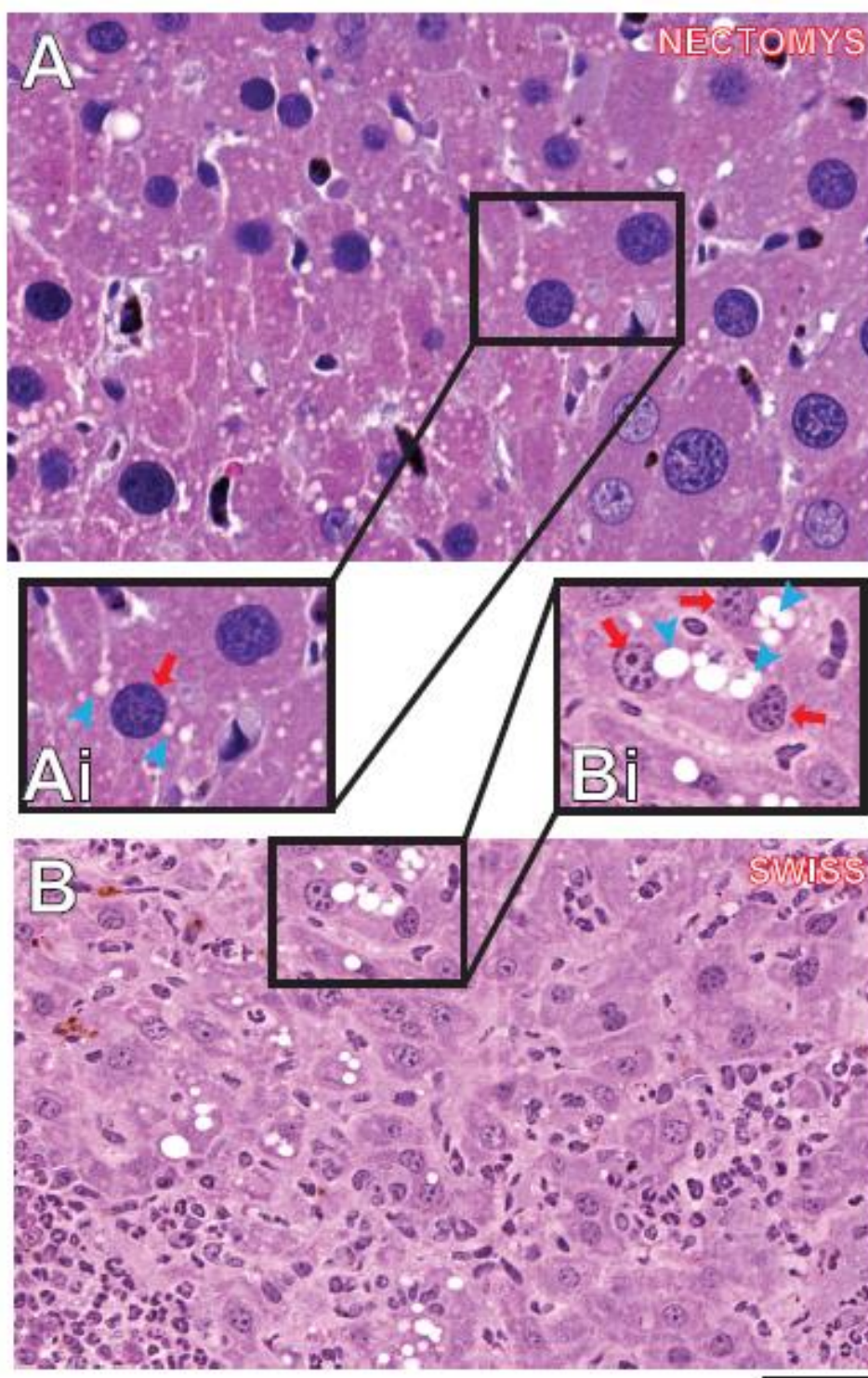


Figura 36: Corpúsculos lipídicos de fígados de *Nectomys squamipes* e de Swiss visualizados à microscopia de luz (A e B), corados com Hematoxilina-Eosina (HE). Note nos detalhes (Ai, Bi) corpúsculos lipídicos (cabeças de setas), que aparecem como estruturas arredondadas, mal coradas, próximas aos núcleos dos hepatócitos (setas). As imagens foram obtidas em scanner de lâminas Panoramic Scan 3D Histech. Barra=50 μ m (B); 30 μ m (A, Bi); 25 μ m (Ai).

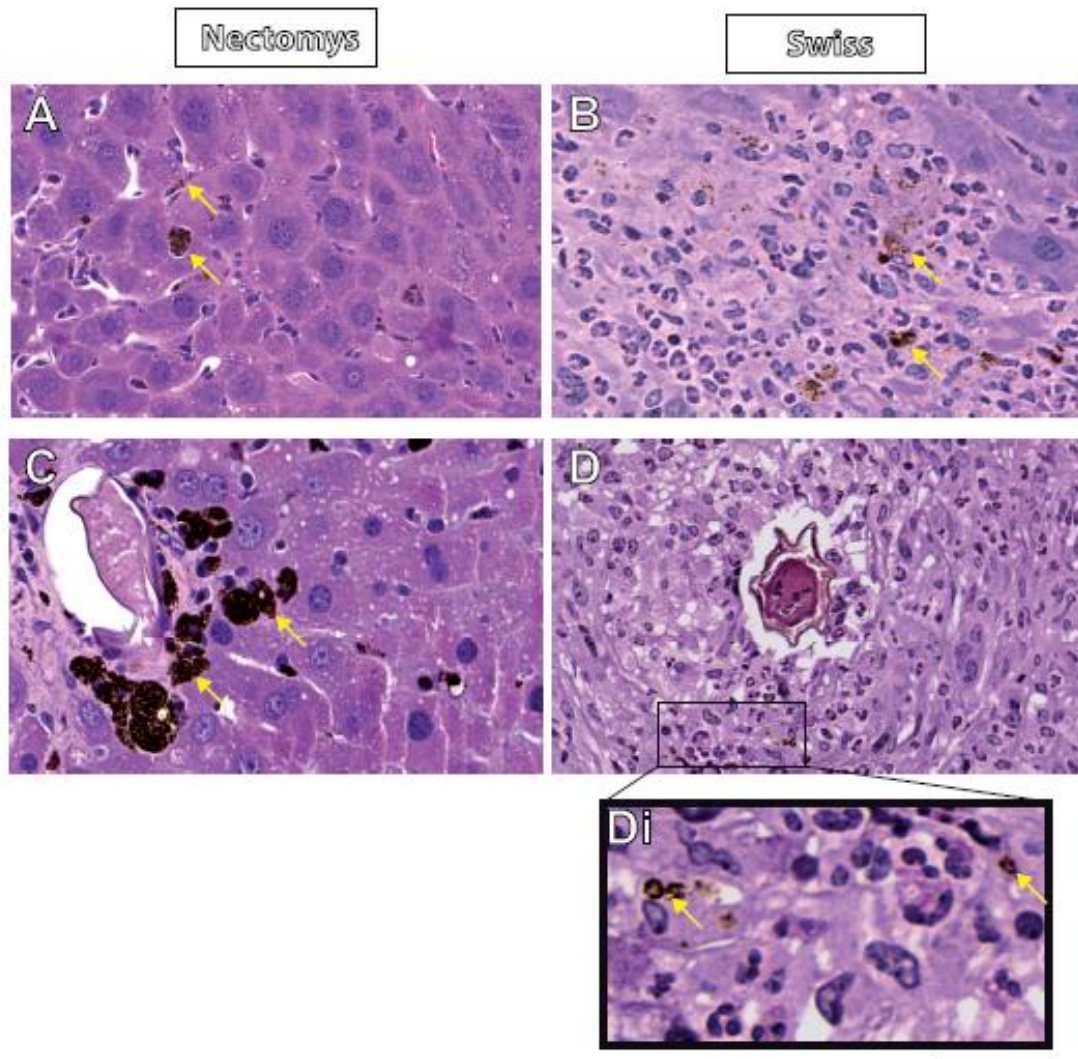


Figura 37: Pigmento esquistossomótico no fígado de *Nectomys squamipes* (A, C) e de Swiss (B, D) infectados por *Schistosoma mansoni*. Observe a presença do pigmento hemozoína (setas), de coloração marrom, no tecido hepático (A, B) e nos granulomas (C, D). No detalhe (Di), é possível notar a hemozoína dentro de células inflamatórias (macrófagos) no tecido hepático do Swiss. O fígado do Swiss foi incluído em glicolmetacrilato e o de *N. squamipes* em Paraplast, e estes foram corados com HE. As imagens foram obtidas em scanner de lâminas Panoramic Scan 3D Histech. Barra=50 μ m (A, B, C, D); 25 μ m (Di).

4.3.3.5 Granulomas confluentes

Foi investigada a ocorrência e foram calculadas as proporções de granulomas confluentes nos fígados e intestinos delgados e grossos dos animais utilizados neste estudo.

A ocorrência de granulomas confluentes foi observada em todos os tecidos analisados, com exceção dos intestinos grossos de camundongos Swiss na fase aguda da infecção. Este processo foi comumente encontrado nos fígados (Fig.38A), intestinos delgados (Fig.38B) e intestinos grossos (Fig.38C) dos animais infectados com o *S. mansoni*.

Quanto à proporção de granulomas confluentes presentes nos tecidos hepáticos dos animais, *N. squamipes* apresentou proporção significativamente menor do que as observadas nos outros grupos experimentais (*N. squamipes*=9,57 ± 0,65%; Swiss fase aguda=24,60 ± 0,58%; Swiss fase crônica=29,80 ± 1,06%, média ± EP, $p < 0,05$). Além disso, os resultados mostraram não haver diferença significativa entre as proporções de granulomas confluentes hepáticos de camundongos Swiss nas fases aguda e crônica da infecção pelo *S. mansoni* (Fig.38D). Em relação aos intestinos delgados, os três grupos experimentais apresentaram proporções de granulomas confluentes estatisticamente semelhantes (*N. squamipes*=23,00 ± 0,77%; Swiss fase aguda=25,20 ± 2,73%; Swiss fase crônica=28,20 ± 1,81%, média ± EP, $p > 0,05$). O mesmo ocorreu nos intestinos grossos de *N. squamipes* e de Swiss de fase crônica (*N. squamipes*=2,70 ± 1,42%; Swiss fase crônica=2,77 ± 0,77%, média ± EP, $p > 0,05$, Fig.38D).

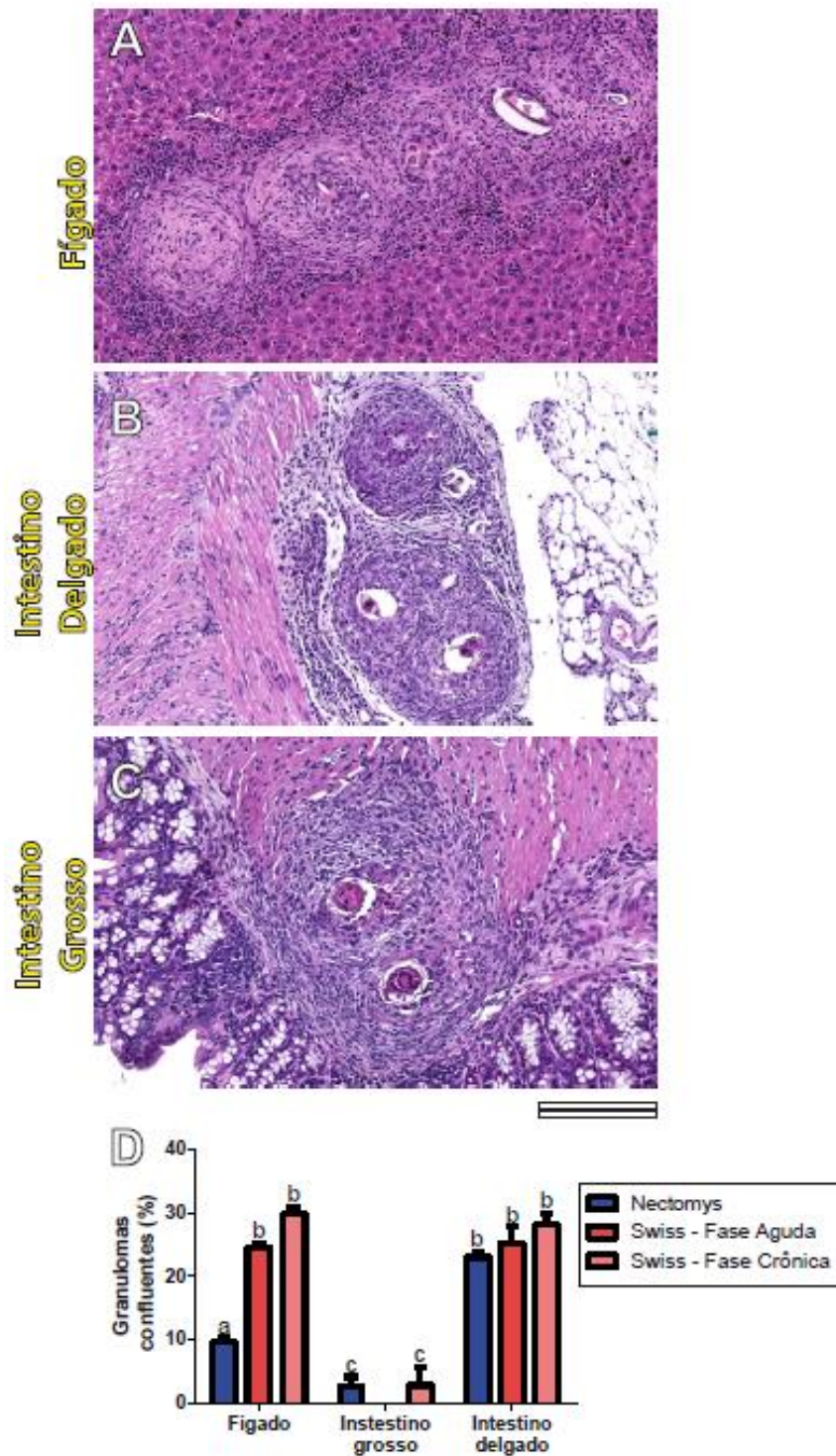


Figura 38: Granulomas confluentes nos fígados e intestinos delgados e grossos de *Nectomys squamipes* e de Swiss infectados com o *Schistosoma mansoni*. Observe em (A, B, C) os aspectos morfológicos gerais da confluência de granulomas esquistossomóticos nos diferentes órgãos do Swiss crônico. O gráfico D mostra a proporção de granulomas confluentes nos fígados e intestinos dos roedores estudados. Cortes histológicos dos tecidos foram corados com HE e as imagens foram obtidas em scanner de lâminas Panoramic Scan 3D Histech. Os granulomas confluentes foram quantificados utilizando o software Panoramic Viewer. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias ($p < 0,05$). Barra=200 μ m (B); 150 μ m (A, C).

4.3.4 Densidade dos Ovos nos Tecidos

Neste estudo, foram realizadas determinações das densidades médias dos ovos de *S. mansoni* nos fígados, intestinos delgados e intestinos grossos, para melhor conhecer a dinâmica da distribuição dos ovos do parasito nos tecidos dos hospedeiros (Fig39A).

Desta forma, em *N. squamipes*, observou-se que as densidades dos ovos presentes no tecido hepático ($1,74 \pm 0,25$, média \pm EP) e no intestino grosso ($1,10 \pm 0,15$, média \pm EP) foram baixas e estatisticamente semelhantes ($p=0,107$), enquanto que, no intestino delgado deste animal, a densidade média foi estatisticamente maior do que as encontradas nos outros órgãos ($6,67 \pm 1,34$, média \pm EP, $p<0,0001$, Fig.39B).

Quanto aos resultados encontrados nos Swiss de fase aguda, a densidade de ovos no fígado ($1,09 \pm 0,11$, média \pm EP) foi a menor dentre os três órgãos estudados, sendo que a maior foi a do intestino delgado ($6,67 \pm 1,46$, média \pm EP, Fig.39C).

No Swiss de fase crônica, observamos uma maior densidade de ovos no intestino delgado ($3,73 \pm 0,50$, média \pm EP), seguida pelo fígado ($3,29 \pm 0,79$, média \pm EP) e pelo intestino grosso ($0,75 \pm 0,14$, média \pm EP, Fig.39D).

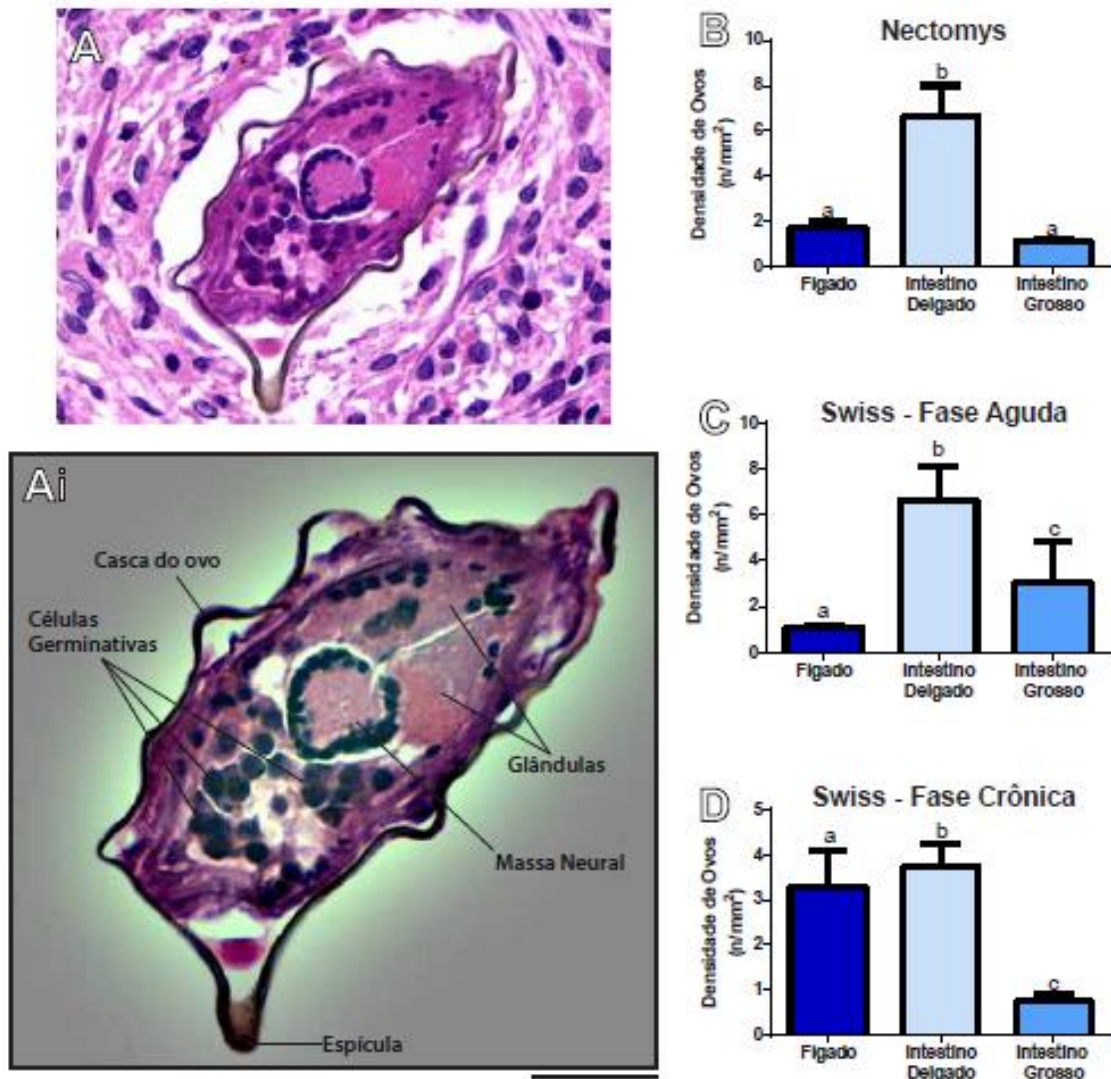


Figura 39: Ovos de *Schistosoma mansoni* em tecido hepático e intestinal de *Nectomys squamipes* e de camundongo Swiss (fases aguda e crônica) da infecção esquistossomótica. Em (A), observe corte histológico transversal de ovo de *S. mansoni* no centro de um granuloma, circundado por células inflamatórias. No detalhe (Ai), estão indicadas algumas estruturas do ovo e da larva miracídio em seu interior (casca, espícula, glândulas, células germinativas e massa neural). Em (B, C, D), os gráficos mostram as densidades dos ovos nos órgãos (fígado, intestino delgado, intestino grosso) de *N. squamipes* (B), Swiss de fase aguda (C) e Swiss de fase crônica (D). Letras diferentes indicam diferenças estatísticas entre médias ($p < 0,05$). As densidades estão expressas em número de ovos por milímetro quadrado de tecido. Barra=20 μ m (A); 15 μ m (Ai).

4.3.5 Dosagens Bioquímicas

4.3.5.1 Proteínas totais e frações

A tabela 1 mostra que *N. squamipes* infectados e controles apresentaram os maiores valores séricos de proteínas totais em relação aos Swiss nas fases aguda e crônica, infectados ou não, apresentando diferenças estatísticas significativas ($p < 0,0001$). Em relação aos valores de albumina, apenas no *N. squamipes* controle foram encontrados níveis séricos superiores aos observados nos outros animais. No caso das globulinas, estas normalmente apresentam-se alteradas nos processos infecciosos ativos. Neste estudo, os níveis séricos de globulinas mais elevados foram encontrados nos roedores silvestres, diferindo significativamente dos valores observados nos demais grupos ($p < 0,0001$). Estes valores de globulinas aumentados sugerem que tanto os *N. squamipes* infectados quanto os não infectados com o parasito *S. mansoni*, são frequentemente expostos a diversos patógenos, estimulando seus sistemas imunes.

Tabela 2: Valores séricos de Proteínas totais e frações de *Nectomys squamipes* e de Swiss (fases aguda e crônica), infectados ou não com o helminto *Schistosoma mansoni*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias de cada grupo, em cada coluna.

Animais	Proteínas Totais	Albumina	Globulinas
Grupos experimentais	Média ± DP (g/dL)	Média ± DP (g/dL)	Média ± DP (g/dL)
Swiss infectado - fase aguda (n=12)	7,5 ± 0,3 ^a	3,2 ± 0,1 ^a	4,3 ± 0,2 ^a
Swiss controle - fase aguda (n=12)	6,7 ± 0,1 ^b	3,2 ± 0,1 ^a	3,5 ± 0,1 ^b
Swiss infectado - fase crônica (n=6)	6,7 ± 0,3 ^b	3,1 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,2 ^c
Swiss controle - fase crônica (n=6)	6,8 ± 0,2 ^b	3,2 ± 0,1 ^a	3,6 ± 0,1 ^c
UFPB Swiss (n=10) *	6,5 ± 0,2	3,4 ± 0,1	3,1 ± 0,2
<i>N. squamipes</i> infectado (n=13)	7,9 ± 0,1 ^c	3,1 ± 0,1 ^a	4,8 ± 0,1 ^d
<i>N. squamipes</i> controle (n=13)	8,3 ± 0,2 ^d	3,7 ± 0,2 ^b	4,6 ± 0,1 ^e
UFPB Wistar (n=10) *	6,9 ± 0,1	3,8 ± 0,1	3,1 ± 0,1
<i>Neotoma fuscipes</i> (n=34) **	6,8 ± 0,1	3,1 ± 0,1	3,7 ± 0,1

* Valores de referência do Biotério da Universidade Federal da Paraíba (Melo Diniz *et al.*, 2006);

**Valores de referência obtidos para o roedor silvestre *Neotoma fuscipes* (Weber *et al.*, 2002).

4.3.5.2 Transaminases hepáticas

As dosagens das transaminases hepáticas (TGO e TGP) revelaram que os níveis séricos destas enzimas aumentaram significativamente nos Swiss infectados em relação aos seus controles, tanto nos animais de fase aguda quanto nos de fase crônica ($p < 0,0001$), indicando dano hepático expressivo causado pela infecção esquistossomótica. Entretanto, os camundongos de fase crônica apresentaram aumentos menores quando comparados aos seus controles, possivelmente devido à imunomodulação presente nesta fase da infecção.

O cálculo do índice DeRitis (razão TGO/TGP) corroborou estes achados, ou seja, o maior valor para este índice foi encontrado nos camundongos Swiss de fase aguda, indicando maior dano hepatocelular.

Curiosamente, *N. squamipes* infectados e controles apresentaram valores estatisticamente semelhantes entre si ($p > 0,999$), mostrando que a infecção pelo *S. mansoni* não foi capaz de gerar dano hepático suficiente para causar aumentos expressivos das transaminases.

Tabela 3: Valores séricos das aminotransferases hepáticas (TGO e TGP) em *Nectomys squamipes* e em Swiss (fases aguda e crônica), infectados ou não com o helminto *Schistosoma mansoni*. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias de cada grupo, em cada coluna.

Animais	TGO	TGP	TGO/TGP
Grupos experimentais	Média ± DP (U/L)	Média ± DP (U/L)	Média ± DP (U/L)
Swiss infectado - fase aguda (n=12)	322 ± 48 ^a	160 ± 24 ^a	2,0 ± 0,1 ^a
Swiss controle - fase aguda (n=12)	76 ± 12 ^b	49 ± 8 ^b	1,6 ± 0,1 ^b
Swiss infectado - fase crônica (n=6)	234 ± 10,2 ^c	119,5 ± 9,1 ^c	1,9 ± 0,1 ^a
Swiss controle - fase crônica (n=6)	102,3 ± 11,2 ^b	60 ± 6,6 ^{b,d}	1,7 ± 0,2 ^c
UFPB Swiss (n=10) *	77,5 ± 6,8	52,5 ± 6,4	-
<i>N. squamipes</i> infectado (n=13)	91 ± 11 ^b	65 ± 6 ^d	1,4 ± 0,1 ^d
<i>N. squamipes</i> controle (n=13)	87 ± 11 ^b	65 ± 6 ^d	1,4 ± 0,1 ^d
UFPB Wistar (n=10) *	78,8 ± 3,1	55,5 ± 3,8	-
<i>Neotoma fuscipes</i> (n=34) **	245,00 ± 154,05	17,20 ± 10,65	-

* Valores de referência do Biotério da Universidade Federal da Paraíba (Melo Diniz *et al.*, 2006);

**Valores de referência obtidos para o roedor silvestre *Neotoma fuscipes* (Weber *et al.*, 2002).

4.4 DISCUSSÃO

Neste trabalho, a esquistossomose mansônica foi estudada em dois modelos de infecção. Um modelo natural, empregando o roedor *Nectomys squamipes*, também conhecido como rato d'água, naturalmente infectado com uma cepa simpátrica do parasito *Schistosoma mansoni*, e um modelo experimental, utilizando o camundongo Swiss experimentalmente infectado com a cepa LE/BH do parasito.

Vale salientar que as cepas do parasito utilizadas nos modelos estudados não foram as mesmas. Desta forma, a comparação de parâmetros relacionados à infecção esquistossomótica em modelos experimentais diferentes deve levar em consideração que cepas geograficamente distintas de *Schistosoma mansoni* podem exibir variações relativas à infectividade, período pré-patente, excreção fecal dos ovos e contagem dos ovos nos órgãos (INCANI *et al.*, 2001). Entretanto, SOUZA *et al.* (1992) infectaram *N. squamipes* criados em laboratório com a cepa LE/BH e observaram que as características histopatológicas apresentadas não diferiram das encontradas nas infecções naturais deste roedor. Além disso, já foi demonstrado que *N. squamipes* é suscetível a outras cepas do parasito provenientes de várias regiões brasileiras, não apresentando patologia diferente da desenvolvida quando infectado com a cepa simpátrica (MARTINEZ *et al.*, 2008). Desta forma, podemos inferir que a comparação entre o modelo natural de infecção, utilizando *N. squamipes* infectado por cepa simpátrica, e o modelo experimental, utilizando o camundongo Swiss infectado pela cepa LE/BH, pode ser considerada válida para a investigação de parâmetros biológicos da esquistossomose mansônica neste trabalho.

4.4.1 Frequência e Área dos Granulomas

As análises histopatológicas dos fígados de *N. squamipes* infectados com o *S. mansoni* revelaram a ocorrência das seguintes fases evolutivas dos granulomas esquistossomóticos: uma fase pré-granulomatosa exsudativa (PE) e três fases granulomatosas: granuloma necrótico-exsudativo (NE), granuloma exsudativo-produtivo (EP) e granuloma produtivo (P). As fases evolutivas dos granulomas de *N. squamipes* encontradas neste trabalho já foram documentadas neste roedor por outros autores (SILVA e ANDRADE, 1989; COSTA-SILVA *et al.*, 2002). Através das

análises das frequências das fases evolutivas dos granulomas hepáticos, observou-se que *N. squamipes* apresentou maior frequência de granulomas EP e P. Estes granulomas são geralmente mais prevalentes na fase crônica da esquistossomose mansônica em modelos murinos experimentais (LENZI, 1987). Porém, no presente trabalho, apenas o granuloma EP foi mais prevalente na fase crônica da infecção experimental.

Ao analisarmos a evolução da infecção no modelo experimental, observamos que na fase aguda da infecção ocorreu uma prevalência de granulomas NE. Inclusive, estes granulomas também apresentaram as maiores áreas dentre os granulomas hepáticos dos três grupos estudados. Isto pode indicar a ocorrência de exacerbação da resposta inflamatória nesta fase da infecção, já que estes granulomas são volumosos e ricos em células inflamatórias. LAMBERTTUCCI (2010) observou uma frequência de granulomas NE de até 100% nesta fase da infecção.

Neste estudo, observou-se que granulomas produtivos que estavam ausentes na fase aguda da infecção, passaram a ser encontrados na fase crônica, indicando uma evolução das lesões granulomatosas para a fase de cura por fibrose. Além disso, a frequência de granulomas NE diminuiu significativamente nesta fase.

Com a infecção em curso, novos ovos continuam a chegar ao fígado e novos granulomas são formados, porém, devido à imunomodulação, estes são menores e os já existentes evoluem para fases mais fibróticas, como as fases EP e P (LENZI *et al.*, 1987; SILVA *et al.*, 2000; MACHADO-SILVA *et al.*, 2011).

Em geral, as análises histológicas realizadas em *N. squamipes* revelaram granulomas semelhantes aos encontrados na fase crônica dos camundongos Swiss. Estes se apresentaram pequenos, fibróticos e com escassa celularidade. Isto pode ser devido às múltiplas reinfecções que o roedor silvestre sofre durante seu tempo de vida e à subsequente imunidade adquirida. COELHO *et al.* (1996) realizaram um experimento no qual demonstraram que camundongos Swiss infectados e tratados, ao serem reinfecados, apresentaram granulomas típicos de fase crônica.

As análises histológicas dos intestinos delgados e grossos dos animais infectados neste estudo mostraram granulomas com poucas variações de tamanho e de fase evolutiva. LENZI *et al.* (1987) também encontraram resultados semelhantes ao analisar granulomas intestinais em *N. squamipes* e em Swiss.

Desta forma, nossos dados sugerem que os granulomas intestinais não sofreram imunomodulação tão pronunciada quanto à observada nos granulomas do fígado. Os granulomas formados ao redor dos ovos maduros do parasito, presentes nos intestinos dos animais infectados (*N. squamipes* e Swiss) foram predominantemente do tipo EP, com exceção dos intestinos grossos dos camundongos Swiss de fase aguda, onde foram encontrados principalmente lesões do tipo PE.

SILVA *et al.* (2000) investigaram o fenômeno da imunomodulação em camundongos Swiss infectados experimentalmente com o *S. mansoni* e concluíram que este é um fenômeno exclusivamente hepático, uma vez que granulomas intestinais, formados em torno de ovos maduros, não mudam de tamanho e aparência com tempo. A grande quantidade de componentes da matriz extracelular encontrada nos granulomas hepáticos foi a principal responsável pela mudança nos aspectos morfológicos da modulação. Segundo WEINSTOCK e BOROS (1983), granulomas intestinais podem ser considerados modulados desde o início no íleo.

4.4.2 Comprometimento Tecidual

Durante a esquistossomose, a resposta inflamatória granulomatosa é responsável tanto pela progressão do ciclo de vida do parasito quanto pela imunopatologia causada no hospedeiro. Este é um processo dinâmico, no qual os parasitos exploram a resposta imune do hospedeiro para expelir seus ovos (DOENHOFF *et al.*, 1986; LENZI *et al.*, 1987; BRINDLEY, 2005), enquanto a infecção provoca uma inflamação celular em torno dos ovos maduros presos nos tecidos do hospedeiro (ANDRADE, 2009).

As análises de comprometimento tecidual, realizadas nos fígados e intestinos de *N. squamipes* e de Swiss (fases aguda e crônica) indicaram que, no camundongo Swiss, durante os estágios iniciais da esquistossomose mansônica, a reação inflamatória direcionada ao fígado foi mais intensa ($46,40 \pm 4,74\%$, média \pm EP). À medida que a infecção evoluiu, ocorreu uma modulação do sistema imune do hospedeiro, diminuindo o grau de comprometimento hepático ($26,62 \pm 0,15\%$, média \pm EP).

No caso específico do *N. squamipes*, o menor comprometimento hepático ($5,05 \pm 1,19\%$, média \pm EP) e o maior comprometimento do intestino delgado ($17,72$

$\pm 0,88\%$, média \pm EP), dentre os três grupos estudados, sugerem uma maior capacidade adaptativa ao parasitismo pelo *S. mansoni*. O baixo grau de comprometimento hepático encontrado poderia justificar a excelente modulação das lesões periovulares observadas no fígado deste animal (RODRIGUES-SILVA *et al.*, 1988). Por outro lado, a intensa reação inflamatória observada no intestino delgado deste roedor explicaria porque ele elimina elevado número de ovos de *S. mansoni* nas fezes durante todo o seu tempo de vida, atuando como importante reservatório silvestre do parasito *S. mansoni* (COSTA-SILVA, 2000).

De fato, nossos resultados sugerem uma melhor modulação da resposta imune tanto em *N. squamipes* quanto no Swiss de fase crônica, visto que ambos intensificaram suas respostas inflamatórias no intestino delgado, ao mesmo tempo em que diminuíram a inflamação no fígado. Este “direcionamento” da resposta imune para o intestino delgado parece ser importante para que estes hospedeiros consigam lidar melhor com o parasitismo. Ao conseguir eliminar maiores quantidades de ovos do parasito, um menor número de ovos alcançaria o fígado, diminuindo as lesões decorrentes da reação inflamatória granulomatosa neste órgão (LENZI, 1987).

4.4.3 Outras Alterações do Tecido Hepático

Além da intensa reação inflamatória, outras alterações, observadas principalmente nos fígados dos animais infectados pelo parasito *S. mansoni*, podem ser responsáveis tanto pelo agravamento das lesões teciduais, quanto pela proteção dos tecidos do hospedeiro.

4.4.3.1 Hemozoína

Um exemplo seria a presença do pigmento esquistossomótico hemozoína, observado nas regiões de infiltrados inflamatórios e também em algumas células que compõem os granulomas hepáticos. Segundo TRUSCOT *et al.* (2013), a hemozoína acumulada no fígado do hospedeiro é retirada por fagócitos num momento que coincide com o desenvolvimento da resposta imune granulomatosa Th2 induzida por antígenos do ovo. Além disso, a captação da hemozoína coincide com a expressão hepática de marcadores de ativação alternativa de macrófagos.

Macrófagos alternativamente ativados representam uma população de células efetoras chave associadas à proteção contra a esquistossomose.

Assim, a hemozoína não representaria apenas um mecanismo de detoxificação do grupo heme pelo parasito, mas também poderia atuar na modulação da resposta granulomatosa protetora do hospedeiro. Alguns autores que já trabalharam com *N. squamipes* observaram um tipo particular de granuloma hepático, que eles denominaram “granuloma exsudativo-macrofágico”, pela presença expressiva de macrófagos cheios de pigmento (RODRIGUES-SILVA *et al.*, 1992; LENZI *et al.*, 1995; COSTA-SILVA *et al.*, 2002). Neste trabalho, também foram observados granulomas hepáticos ricos em macrófagos, alguns com abundante conteúdo em hemozoína.

4.4.3.2 Corpúsculos lipídicos

Durante as análises histológicas do tecido hepático de animais infectados (*N. squamipes* e Swiss), foram observadas estruturas arredondadas, sugestivas de CLs, presentes no interior dos hepatócitos. Em excesso, estes CLs podem gerar uma patologia conhecida como esteatose hepática, que pode contribuir para aumentar o dano tecidual no fígado. Desta forma, a ocorrência e aspectos específicos destas estruturas serão estudados no Capítulo 2, relativo aos CLs.

4.4.4 Granulomas Confluentes

Neste estudo, foi realizada a determinação da proporção de granulomas confluentes nos tecidos hepáticos e intestinais de *N. squamipes* e de Swiss (fases aguda e crônica) para compreender como a sua formação poderia contribuir para o processo de fibrose hepática. Mesmo considerando que a fibrose é um processo que ocorre predominantemente no fígado dos animais infectados pelo *S. mansoni* (SANTOS *et al.*, 1992), a observação da ocorrência de granulomas confluentes nos intestinos motivou a determinação das proporções destes granulomas nos tecidos intestinais.

Os resultados mostraram que a proporção dos granulomas confluentes nos intestinos delgados não variou entre os grupos estudados. No caso dos intestinos grossos, somente foram observados granulomas confluentes em *N. squamipes* e em

Swiss de fase crônica e as proporções também não diferiram significativamente entre estes dois hospedeiros ($p > 0,05$). Quanto às proporções dos granulomas confluentes encontradas nos fígados dos animais estudados, vale ressaltar que, em *N. squamipes*, foram encontradas as menores proporções ($9,57 \pm 0,65\%$, média \pm EP) e em Swiss de fase crônica foram observadas as maiores ($29,80 \pm 1,06\%$, média \pm EP). Este dado pode ser considerado mais um indicativo de que este roedor silvestre apresenta eficiente modulação das lesões granulomatosas hepáticas, visto que não existem relatos na literatura sobre a ocorrência de fibrose periportal em *N. squamipes* naturalmente infectados.

Já foram documentados granulomas confluentes nos fígados e intestinos em modelos murinos de esquistossomose experimental (CHEEVER e YAP, 1997; SILVA e ANDRADE, 1989) e humana (RASO *et al.*, 2012). Porém, estudos sobre o fenômeno da confluência de granulomas são escassos. Portanto, as causas e os fatores envolvidos nesta confluência ainda precisam ser elucidados.

4.4.5 Densidade de Ovos nos Tecidos

Foram feitas determinações das densidades de ovos nos tecidos (fígados e intestinos) dos animais estudados. Foi encontrada uma maior densidade de ovos no intestino delgado de *N. squamipes*, justamente onde foi verificada uma maior reação inflamatória. Desta forma, os dados relativos à densidade de ovos nos tecidos em *N. squamipes* estão de acordo com os resultados das análises de comprometimento tecidual, sugerindo que este animal elimina grandes quantidades de ovos do parasito nas fezes durante todo o curso da infecção. Já é conhecido que a maior eliminação de ovos do parasito ocorre no intestino delgado dos hospedeiros, devido ao fato dos vermes adultos se situarem preferencialmente nas veias superiores do plexo mesentérico, o que facilita o fluxo dos ovos para esta região do trato gastrointestinal (SILVA e ANDRADE, 1989).

Neste estudo, foi encontrado maior número de ovos do parasito *S. mansoni* no intestino delgado, seguido pelo fígado e intestino grosso de *N. squamipes*. RIBEIRO *et al.* (1998), realizaram contagem de ovos nos mesmos órgãos de *N. squamipes* experimentalmente infectados, sendo observadas densidades de ovos nos tecidos semelhantes as que encontramos.

Por outro lado, nos camundongos Swiss de fase aguda, foi encontrada uma maior densidade de ovos nos intestinos delgados em relação aos outros órgãos e uma reação inflamatória granulomatosa menor do que a do fígado. Quando a infecção inicial evoluiu para a fase crônica, o número de ovos nos fígados dos animais aumentou consideravelmente, por causa do efeito cumulativo da chegada de novos ovos com o decorrer do tempo. Concomitantemente, o número de ovos presentes nos intestinos delgados de Swiss de fase crônica diminuiu.

4.4.6 Proteínas Totais e Frações

As proteínas totais são resultantes da soma de suas frações, albumina e globulinas. Qualquer alteração em uma das partes ocasiona alterações nos valores das proteínas totais. Desta forma, quando comparamos as proteínas totais do camundongo Swiss infectado de fase aguda com o seu controle, observamos que as proteínas totais estavam aumentadas, devido ao aumento das globulinas observado nos animais infectados. De modo semelhante, proteínas totais em *N. squamipes* infectados apresentaram-se aumentadas em relação aos controles, pois estas também aumentaram em decorrência do aumento das globulinas.

A dosagem de albumina é um marcador sensível da função hepática. Valores diminuídos são encontrados em casos de desnutrição ou quando ocorre perda extensa de função do fígado (THAPA e WALIA, 2007). Neste estudo, os valores séricos de albumina encontrados estavam dentro dos valores de referência utilizados, sendo, portanto, considerados normais. Isto indica que, apesar da reação granulomatosa inflamatória presente no fígado dos animais estudados, com consequente dano tecidual, a função hepática, em geral, foi preservada.

Em relação às globulinas, estas normalmente se encontram elevadas nos processos infecciosos ativos, que induzem à produção de anticorpos em hospedeiros imunologicamente competentes (SEMSARI *et al.*, 2011).

Neste estudo, os valores de globulinas no Swiss de fase aguda encontraram-se elevados em relação ao seu controle, porque o parasito *S. mansoni*, ao infectar o camundongo, induz à formação de anticorpos, o que se reflete num aumento das taxas de globulinas nos soros destes animais. Apesar de se esperar que os Swiss crônicos infectados apresentassem valores séricos de globulinas superiores aos seus controles, como a infecção já se cronificou e as respostas imunes já foram

moduladas, provavelmente por esta razão os níveis séricos de globulinas voltaram ao normal.

No caso do *N. squamipes*, tanto os animais infectados como os animais controles apresentaram taxas de globulinas aumentadas. Isto pode ser decorrente da infecção pelo *S. mansoni* e também da coinfeção com outros helmintos, vírus e bactérias, tão comuns no meio silvestre onde estes animais foram capturados. No caso dos *N. squamipes* controles, apesar destes animais não se encontrarem infectados pelo *S. mansoni*, por terem contato frequente com múltiplos patógenos, isto pode justificar as altas taxas de globulinas presentes no soro destes roedores.

4.4.7 Transaminases

As dosagens das transaminases hepáticas foram realizadas para conhecer o grau de dano hepatocelular decorrente da infecção pelo *S. mansoni*, da esteatose hepática presente nos animais infectados e não infectados ou de ambas. Foram feitas as dosagens de TGO (transaminase glutâmico oxalacética) ou AST (aspartato aminotransferase) e de TGP (transaminase glutâmico pirúvica) ou ALT (alanina aminotransferase). Em caso de lesão hepática, normalmente ocorre uma alteração nos valores de ambas.

Aumentos consideráveis na TGO sérica podem indicar danos celulares profundos, capazes de afetar inclusive a integridade de mitocôndrias. Estes aumentos podem estar presentes nas hepatites virais, hepatites tóxicas, danos necróticos decorrentes de infecções e danos relacionados à presença de esteatose hepática. A TGP é uma enzima predominantemente hepática, de origem citoplasmática, que se eleva rapidamente após a ocorrência da lesão hepática. Alterações importantes nos níveis de TGP estão presentes nos casos de hepatites agudas de qualquer etiologia (GIANNINI *et al.*, 2005). A relação TGO/TGP, também conhecida como índice DeRitis, é usada para auxiliar no diagnóstico diferencial das hepatopatias (NYBLOM *et al.*, 2004).

Os níveis séricos de transaminases dos camundongos Swiss infectados na fase aguda da esquistossomose mostraram-se aumentados em relação aos Swiss controles e em relação aos valores de referência. Por outro lado, quando comparamos os valores de transaminases do Swiss de fase aguda com os do Swiss de fase crônica, observamos uma diminuição destes valores, provavelmente devido

à imunomodulação ocorrida na fase crônica da doença, com consequente diminuição do grau de dano tecidual. De fato, as análises histopatológicas sugeriram que o Swiss de fase crônica apresentou uma imunomodulação capaz de diminuir o grau de dano hepático.

Quando comparamos o Swiss de fase crônica infectado com o *N. squamipes* infectado, os valores das transaminases encontrados foram bem menores em *N. squamipes*. Conforme demonstrado nas análises de comprometimento tecidual, este roedor silvestre apresentou excelente imunomodulação, o que pode explicar os baixos valores das transaminases encontrados neste hospedeiro.

É interessante notar que não foram observadas diferenças entre os níveis séricos de transaminases encontrados em *N. squamipes* infectados e em seus controles. Este dado pode significar que, mesmo estando infectado, o rato d'água apresentou baixo grau de lesão tecidual hepática, sendo mais um indício de que este reservatório silvestre apresenta alta compatibilidade na relação parasito-hospedeiro (CARVALHO, 1982).

Quando estes valores foram comparados com os valores de referência de ratos Wistar da UFPB (MELO-DINIZ *et al.*, 2006), percebemos um pequeno aumento nas transaminases de *N. squamipes*. Isto se justifica porque, no caso dos animais infectados, mesmo em menor grau, alguma lesão tecidual está presente devido à infecção pelo *S. mansoni*. Nos animais controles, por serem roedores silvestres, alguma alteração hepática pode ocorrer devido a infecções adquiridas no ambiente natural.

Entretanto, as dosagens séricas de TGO em *N. squamipes* (infectado e controle), apresentaram-se abaixo do valor de referência para outro roedor silvestre (*Neotoma fuscipes*) (WEBER *et al.*, 2002), enquanto os valores de TGP estavam acima do valor de referência. Vale salientar que *Neotoma fuscipes* é um animal silvestre da mesma família do *N. squamipes*. As discrepâncias entre os valores de referência deste animal e os valores de *N. squamipes* podem ser explicadas pelo fato destes animais, apesar de apresentarem genealogia próxima, possuírem nichos ecológicos e fisiologias distintas.

Além dos fatores relacionados à infecção parasitária, existe a questão da esteatose hepática observada nos animais estudados (*N. squamipes* e Swiss) infectados e não infectados. A esteatose também pode ser responsabilizada por certo grau de dano hepático nestes roedores, principalmente quando causada por

acúmulo de ácidos graxos saturados, gerando, conseqüentemente, alterações nos valores das transaminases (GIANNINI *et al.*, 2005).

Quanto à razão TGO/TGP, esta é utilizada para estabelecer o grau de comprometimento tecidual do fígado. Quanto maior o valor desta razão, maior é o grau de lesão hepatocelular. Assim, no caso do Swiss experimentalmente infectado, observamos que este valor foi de $2,0 \pm 0,1$, média \pm EP, enquanto que no Swiss controle, o valor médio encontrado foi de $1,6 \pm 0,1$, média \pm EP. Quanto aos *N. squamipes* infectados e controles, os valores médios de TGO/TGP encontrados foram exatamente iguais ($1,4 \pm 0,1$), ou seja, inferiores até mesmo ao valor médio encontrado para o Swiss controle. Elevações mais acentuadas, onde o índice DeRitis é igual ou superior a dois, estão presentes em hepatopatias onde ocorre maior lesão mitocondrial, como nas hepatites alcoólicas e nos eventos necróticos (como os que ocorrem na esquistossomose aguda).

4.5 CONCLUSÕES

- As análises histopatológicas realizadas em *N. squamipes* revelaram eficiente modulação da resposta imune no fígado, gerando um comprometimento tecidual reduzido. No caso do intestino delgado, observamos reação inflamatória granulomatosa intensa, favorável à eliminação dos ovos do parasito *S. mansoni* nas fezes;

- A maior densidade de ovos de *S. mansoni* presente no intestino delgado de *N. squamipes*, também contribuiu para uma efetiva eliminação dos ovos e resolução da infecção;

- Os granulomas hepáticos de *N. squamipes* mostraram-se bem modulados, enquanto que os granulomas intestinais apresentaram poucas variações de tamanho e morfologia (fase evolutiva);

- Ao estudarmos a evolução da esquistossomose mansônica em modelo murino experimental, concluímos que a infecção esquistossomótica em *N. squamipes* apresentou características mais próximas da fase crônica da infecção no Swiss, com a presença de granulomas hepáticos predominantemente menores e mais fibróticos;

- Quanto às determinações bioquímicas realizadas em *N. squamipes*, vale ressaltar que os níveis séricos de transaminases não sofreram aumentos significativos nos animais infectados, como ocorreu com os camundongos Swiss, indicando pequeno dano hepático causado pela esquistossomose mansônica neste modelo de infecção natural.

5 CAPÍTULO 2 - ESTEATOSE HEPÁTICA E SUA RELAÇÃO COM A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EM MODELO NATURAL E EXPERIMENTAL

5.1 INTRODUÇÃO

Os corpúsculos lipídicos (CLs) são organelas celulares ricas em lipídios, envolvidas em diversos mecanismos celulares e fisiológicos (GUO *et al.*, 2009). Além disso, podem estar relacionados a processos inflamatórios e infecciosos. Por exemplo, nas células do sistema imune, os CLs constituem sítios de síntese de mediadores lipídicos eicosanoides, sendo formados no citoplasma em resposta às doenças inflamatórias e infecciosas (MELO *et al.*, 2011). Nos hepatócitos, a formação e a mobilização de CLs fazem parte da fisiologia normal. O acúmulo anormal de CLs caracteriza a esteatose hepática (KLEINER *et al.*, 2005).

A ocorrência e os papéis dos CLs nos fígados de modelos naturais de esquistossomose mansônica são desconhecidos até o presente momento. As análises histopatológicas deste estudo mostraram formação acentuada destas organelas principalmente nos tecidos hepáticos de *N. squamipes*, mas também de camundongos Swiss (Figura 36, Capítulo 1), sugerindo sua participação nesta infecção parasitária. Portanto, neste capítulo, serão mostrados e discutidos, pela primeira vez, fatores relacionados à estrutura e à formação dos CLs em *N. squamipes*, considerado um importante reservatório silvestre do parasito *S. mansoni*. Além do modelo natural, foi utilizado o modelo murino de infecção experimental, como base de comparação.

Foram realizadas as seguintes análises nos modelos de infecção: [1] análises quantitativas dos CLs por microscopia de luz (ver seção Materiais e Métodos, nº 3.4); [2] análises ultraestruturais dos CLs, através de MET (ver seção Materiais e Métodos, nº 3.5.2); [3] dosagens bioquímicas de glicose, ácido úrico, colesterol total e triglicerídeos (ver seção Materiais e Métodos, nº 3.6); [4] cálculo do índice de Lee (ver seção Materiais e Métodos, nº 3.7); [5] Espectroscopia Raman (ver seção Materiais e Métodos, nº 3.8).

5.2 OBJETIVOS

5.2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a ocorrência e a ultraestrutura de CLs em hepatócitos durante infecção esquistossomótica nas duas espécies de roedores: *Nectomys squamipes*, um roedor silvestre encontrado naturalmente infectado com o parasito *Schistosoma mansoni* e o camundongo Swiss infectado experimentalmente com este parasito (fases aguda e crônica). Além disso, caracterizar a relação da esteatose hepática com o parasitismo pelo *S. mansoni* em modelo natural de infecção.

5.2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o número de CLs em hepatócitos de modelos murinos de infecção esquistossomótica natural e experimental, utilizando coloração com o corante Oil Red O, por microscopia de luz;

- Avaliar a ultraestrutura e quantificar CLs em hepatócitos de *N. squamipes*, infectados e controles, através de microscopia eletrônica de transmissão (MET);

- Determinar parâmetros bioquímicos de *N. squamipes* e de Swiss (fases aguda e crônica), infectados ou não, para conhecer os perfis glicêmico e lipídico dos animais estudados;

- Verificar o status nutricional dos roedores, através de dosagens bioquímicas e do cálculo do índice de Lee;

- Avaliar o perfil lipídico dos tecidos hepáticos de *N. squamipes* e de camundongos Swiss (fases aguda e crônica) infectados ou não com o parasito *S. mansoni*, através de espectroscopia Raman;

- Correlacionar os dados obtidos nas análises histológicas e ultraestruturais com os relacionados ao metabolismo lipídico dos animais para tentar compreender como estes dois hospedeiros lidam com o parasitismo pelo *S. mansoni*, utilizando-se dos CLs.

5.3. RESULTADOS

5.3.1 Análises dos Corpúsculos Lipídicos por Microscopia de Luz

Foram quantificados CLs presentes em hepatócitos de *N. squamipes* e de camundongos Swiss (fases aguda e crônica), infectados ou não com o parasito *S. mansoni*, através da coloração com o corante Oil Red O e os tecidos corados foram visualizados à microscopia de luz.

Na figura 40A, observamos imagem de tecido hepático apresentando esteatose, caracterizada pela presença de muitos CLs, de diversos tamanhos, situados no citoplasma dos hepatócitos e evidenciados por coloração com ORO. A quantificação dos CLs mostrou um maior número destas estruturas por hepatócito em *N. squamipes* infectados ($15,90 \pm 1,08$, média \pm EP) em relação aos demais grupos estudados (*N. squamipes* não infectado= $7,31 \pm 0,98$; Swiss fase aguda infectado= $2,81 \pm 0,66$; Swiss fase aguda não infectado= $3,59 \pm 0,40$; Swiss fase crônica infectado= $2,25 \pm 0,83$; Swiss fase crônica não infectado= $2,04 \pm 0,58$, média \pm EP), inclusive apresentando diferenças estatísticas significativas ($p < 0,0001$, Fig.40B). Além disso, mesmo os *N. squamipes* não infectados apresentaram contagens de CLs superiores às encontradas nos Swiss nas fases aguda e crônica, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$). Vale ressaltar que não foram encontradas diferenças estatísticas entre camundongos Swiss de fase aguda com os de fase crônica, ($p > 0,05$).

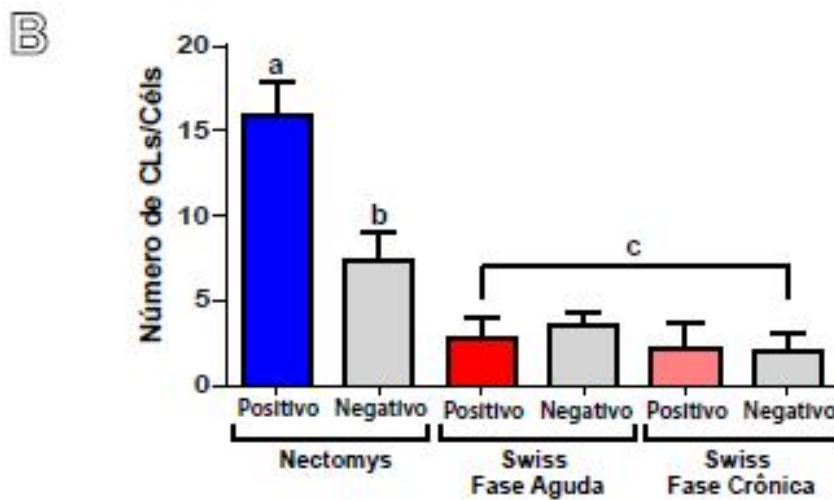
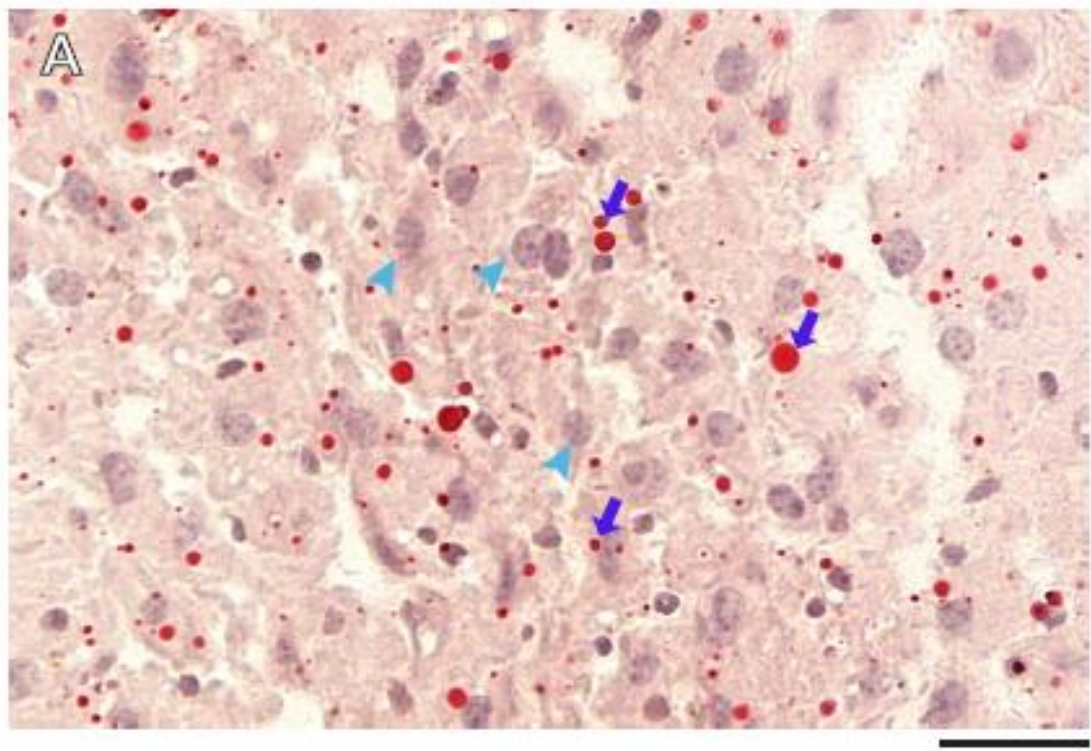


Figura 40: Corpúsculos lipídicos em hepatócitos vistos por microscopia de luz. Em (A), imagem representativa de um corte histológico de fígado de camundongo infectado (fase crônica) mostrando corpúsculos lipídicos com tamanhos variados, no citoplasma dos hepatócitos corados em vermelho pelo Oil Red-O (setas). Os núcleos foram contracorados com hematoxilina. Em (B), gráfico mostrando número de corpúsculos por hepatócito nos diferentes grupos experimentais. Os fígados foram fixados, cortados em criostato e corados com ORO. As imagens foram obtidas em scanner de lâminas Panoramic Viewer 3D Hitech e as análises quantitativas foram realizadas com o software Histoquant. Os dados são mostrados como média \pm erro padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias. Barra=30 μ m.

5.3.2 Análises Ultraestruturais dos Corpúsculos Lipídicos

Para estudar os aspectos ultraestruturais dos CLs presentes nos tecidos hepáticos de *N. squamipes*, infectados e não infectados com o *S. mansoni*, foram realizadas análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Foi observada a ocorrência de CLs em hepatócitos dos animais infectados e dos controles. Estes mostraram ultraestrutura típica, delimitados por membrana constituída por uma monocamada de fosfolipídios, apresentando-se com tamanhos e elétrôn-densidades diferentes (Fig.41).

Os CLs foram quantificados por área seccional. Suas áreas foram medidas (em μm^2) e estes foram classificados por faixas de tamanhos. Nas micrografias de tecido hepático deste roedor, foram observados vários CLs no citoplasma das células (Fig.42A). Os resultados das contagens indicaram que *N. squamipes* infectados apresentaram um número de CLs por área seccional estatisticamente superior ao encontrado nos roedores não infectados ($p=0,0006$, Fig.42B). Quanto à distribuição dos CLs por faixas de tamanhos, estes se encontraram distribuídos principalmente nas faixas de 0-10 (*N. squamipes* infectado=52,79%; *N. squamipes* não infectado=45,55%) de 10-20 (*N. squamipes* infectado=20,53%; *N. squamipes* não infectado=23,56%) e de 20-30 μm^2 (*N. squamipes* infectado=10,85%; *N. squamipes* não infectado=8,38%), indicando que *N. squamipes* apresentou CLs de tamanhos variados (Fig.42C).

As análises ultraestruturais também revelaram imagens representativas de associações entre CLs e outras organelas celulares. Por exemplo, foi observada uma íntima associação entre CLs e mitocôndrias (Figs.43, 44) e entre CLs e autofagossomos (Fig.44). Outro achado bastante comum foi a interação destas organelas com os núcleos dos hepatócitos (Fig.45). Os CLs também foram encontrados em estreita proximidade com o RE dos hepatócitos de *N. squamipes* (Fig.43). Adicionalmente, foram encontrados CLs de tamanhos variados se fundindo uns com os outros, formando corpúsculos maiores (Fig.46). Também foram observados CLs contendo estruturas membranosas internas (Fig.41) e, em algumas destas organelas, foram observadas faixas elétrôn-densas, de espessuras variadas, em suas superfícies (Fig.47).

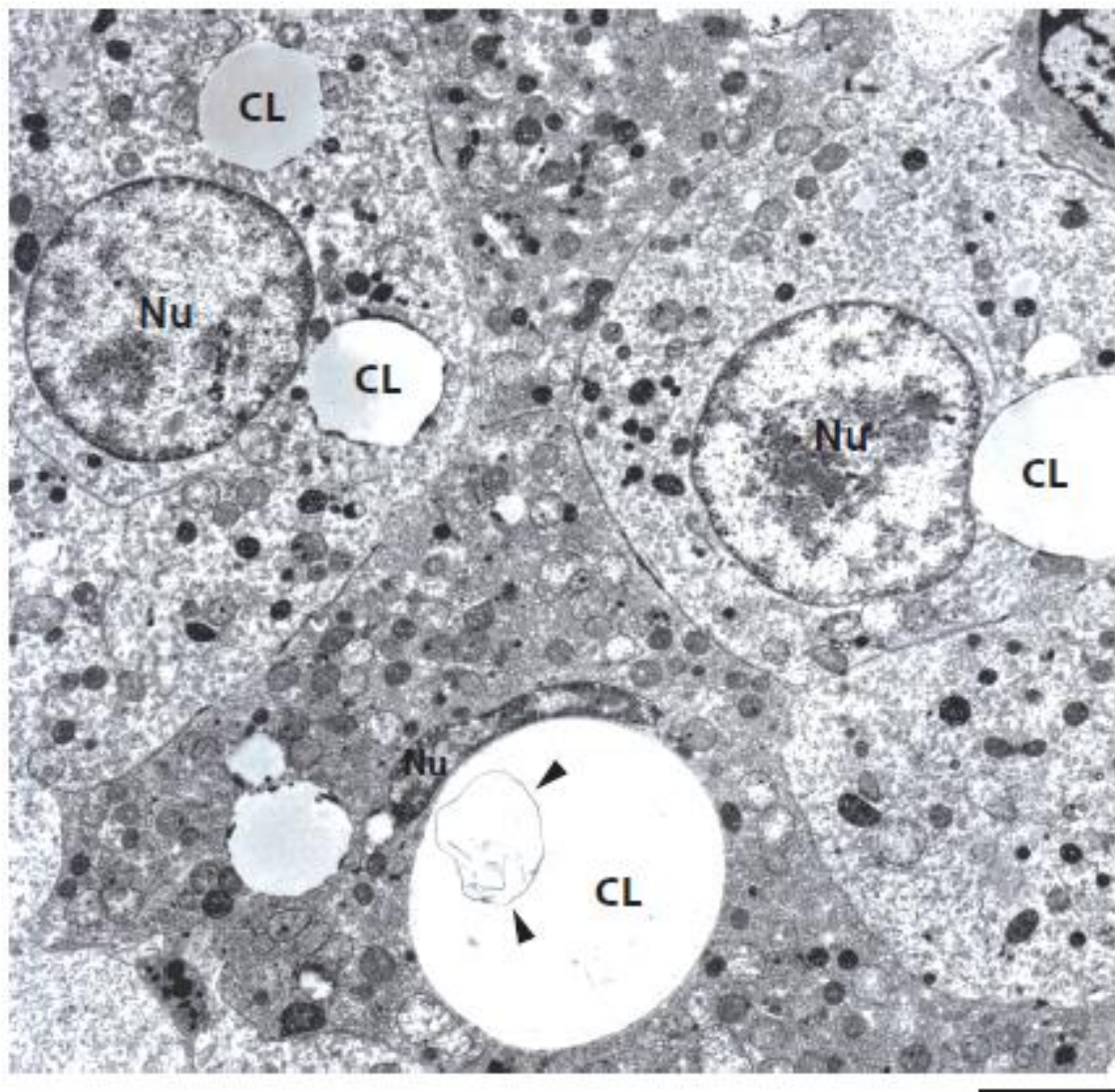


Figura 41: Corpúsculos lipídicos em hepatócitos de *Nectomys squamipes* infectados com o *Schistosoma mansoni*. Observe corpúsculos lipídicos (CL) com diferentes tamanhos e elétrondensidades. Note a presença de estrutura membranosa (cabeças de seta) no interior de um CL. Fragmentos de fígado de *N. squamipes* naturalmente infectados foram fixados e processados para MET. Barra=4 μ m.

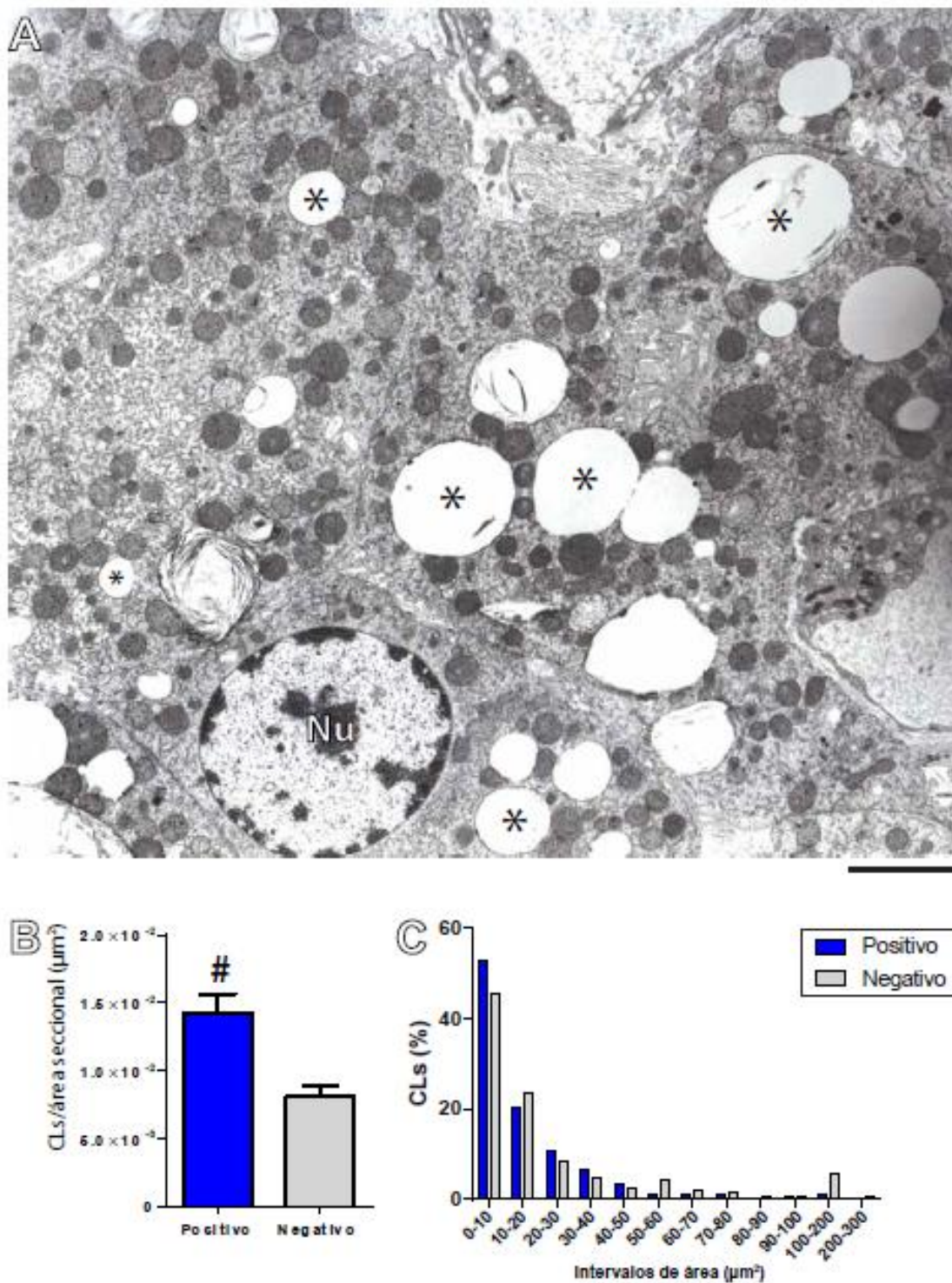


Figura 42: Análises ultraestruturais de corpúsculos lipídicos em hepatócitos de *Nectomys squamipes*. Em (A), tecido hepático de *N. squamipes*, onde se observam hepatócitos e vários corpúsculos lipídicos (*) de tamanhos diferentes, presentes no citoplasma das células. O gráfico (B) mostra os resultados das quantificações dos CLs por área seccional em *N. squamipes* infectados e não infectados. Note em (C), a distribuição dos CLs encontrados em *N. squamipes* por faixas de tamanhos. Os tecidos hepáticos foram fixados e processados para MET e as análises quantitativas foram realizadas utilizando o software Image J. # $p=0,0006$. Nu=núcleo; Barra= $8,5 \mu\text{m}$.

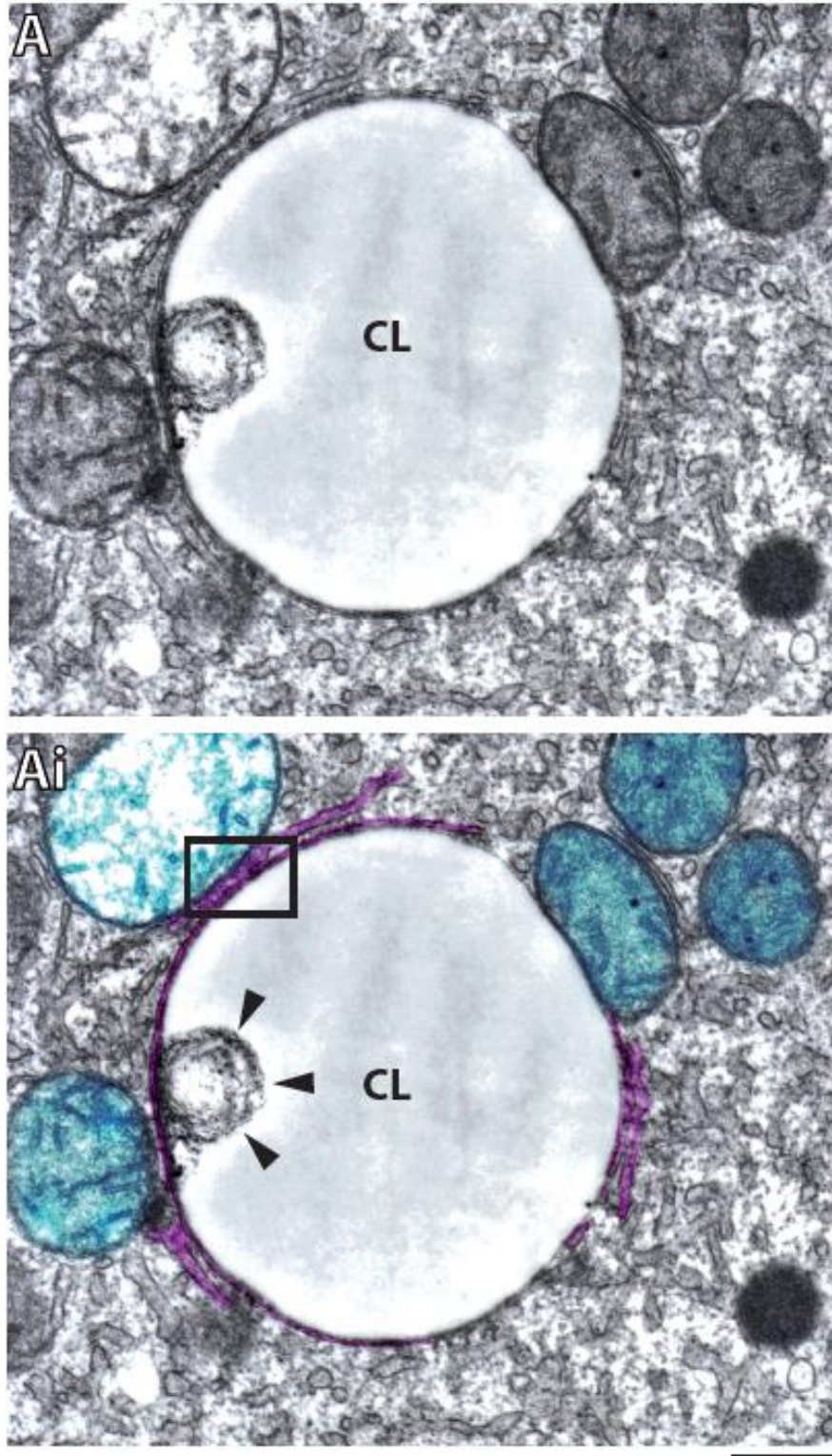


Figura 43: Corpúsculo lipídico associado a mitocôndrias e ao retículo endoplasmático em hepatócito de *Nectomys squamipes* infectado com o *Schistosoma mansoni* (A, Ai). Observe corpúsculo lipídico (CL) em íntima associação com mitocôndrias (Ai, azul) e retículo endoplasmático (Ai, rosa). Note, em algumas regiões, a estreita relação entre as três organelas: CL, mitocôndria e retículo (Box). O CL apresenta conteúdo elétron-lúcido e estrutura membranosa interna (Ai, cabeças de seta). Fragmentos de fígado de *N. squamipes* naturalmente infectados foram fixados e processados para MET. Barra=450 nm.

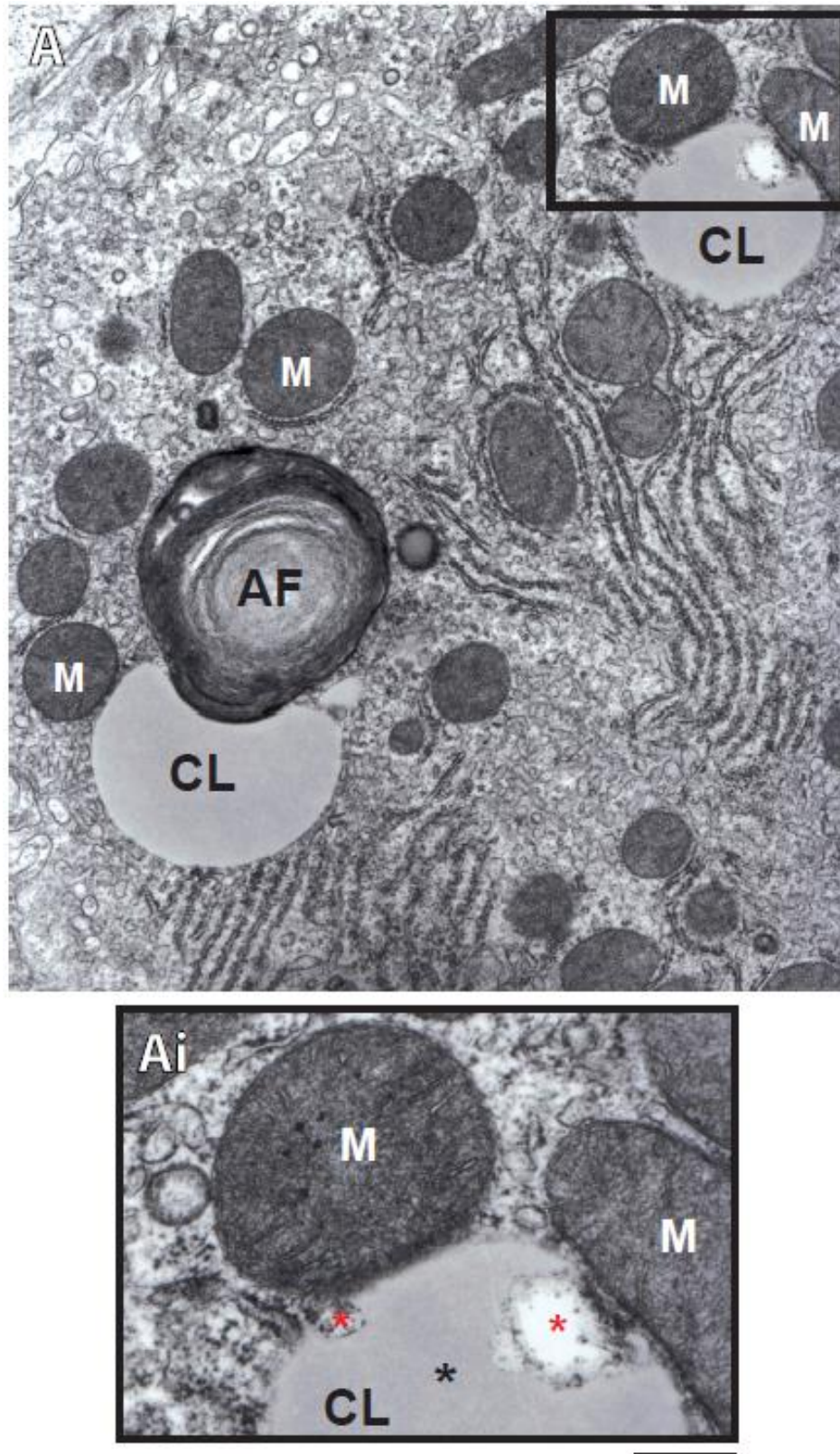


Figura 44: Corpúsculo lipídico (CL) associado a mitocôndrias e a um autofagossomo em hepatócito de *Nectomys squamipes* infectado com o *Schistosoma mansoni*. Em (A), observe estreita relação do CL com um autofagossomo (AF). No detalhe (Ai), é possível visualizar uma alteração no padrão de elétron-densidade (compare os*) nos pontos de contato do CL com as mitocôndrias (M). Barra= 2,5 μ m (A); 900 nm (Ai).

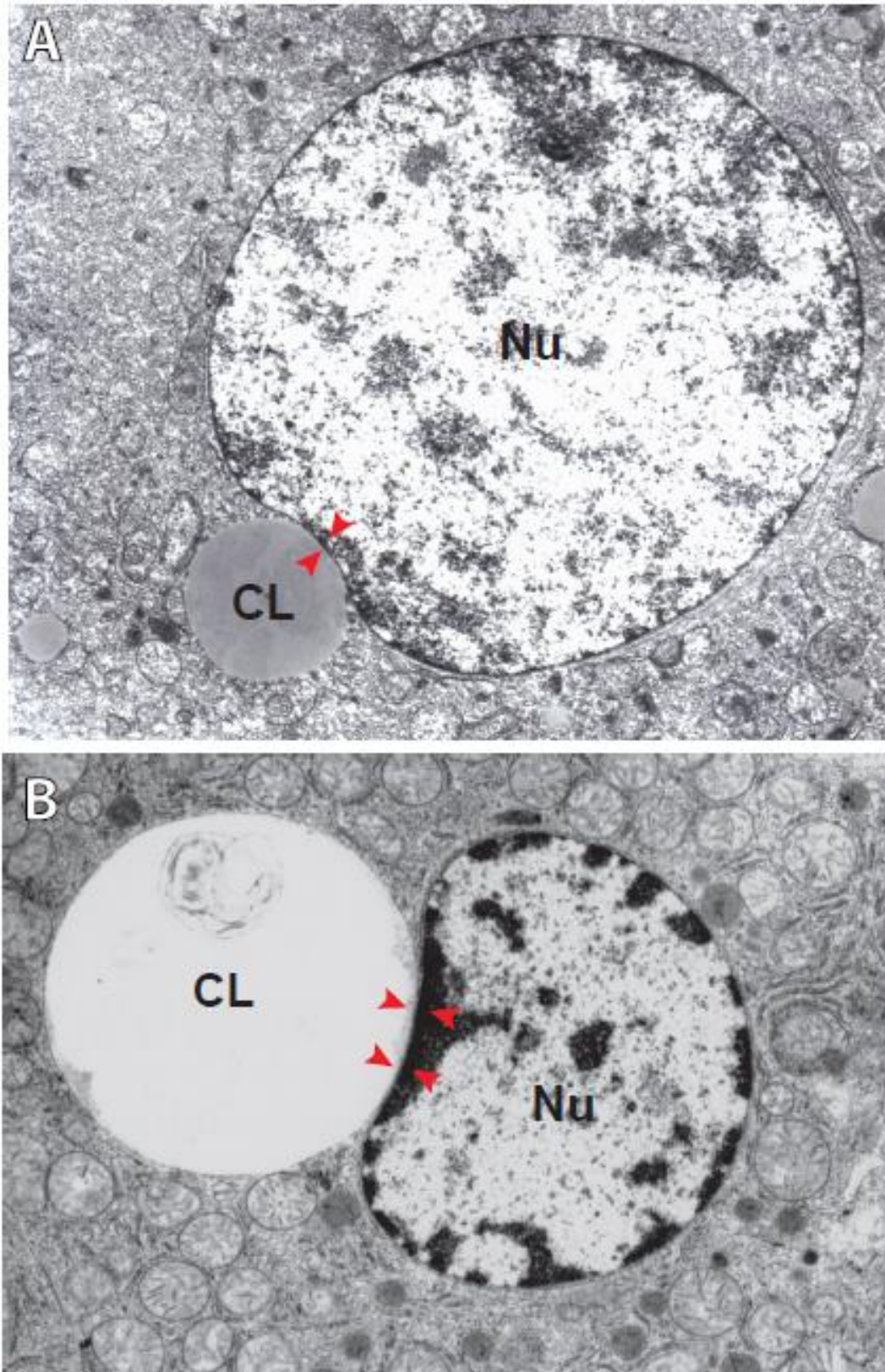


Figura 45: Interação núcleo e corpúsculos lipídicos de hepatócitos de *Nectomys squamipes* infectados ou não com o parasito *Schistosoma mansoni*. Em (A e B), observe corpúsculos lipídicos (CL) de diferentes tamanhos e elétron-densidades em contato próximo (cabeças de setas) com os núcleos (Nu) dos hepatócitos do roedor infectado (A) e não infectado (B). Barra=7,5 μ m (A); 4,5 μ m (B).

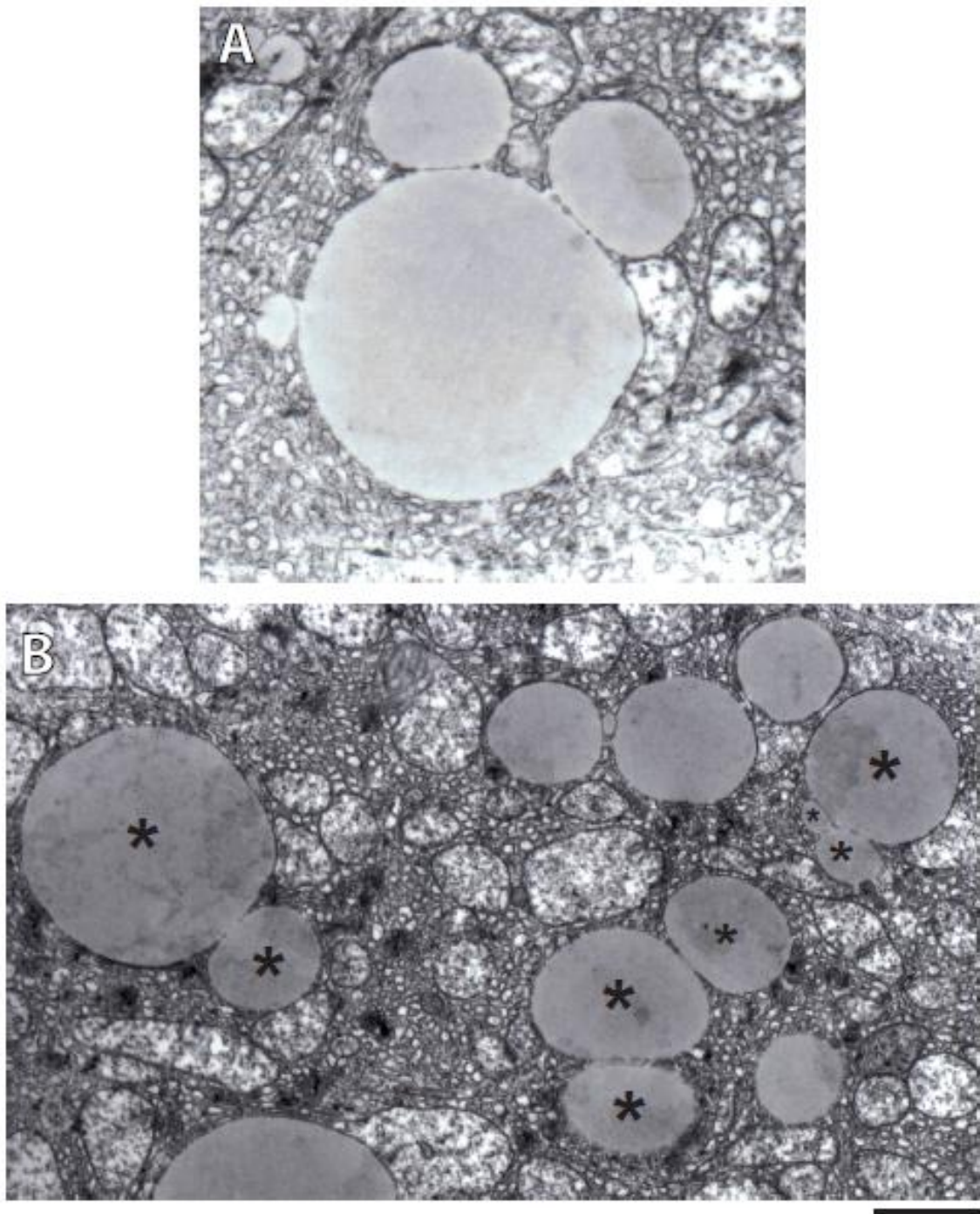


Figura 46: Fusão de corpúsculos lipídicos em hepatócitos do roedor silvestre *Nectomys squamipes* com esquistossomose. Em (A), observe CLs em contato próximo. Note em (B), área do citoplasma de hepatócitos mostrando CLs de diversos tamanhos e elétrion-densidades, próximos ou em processo de fusão (*). Barra= 4 μ m (B); 2,5 μ m (A).

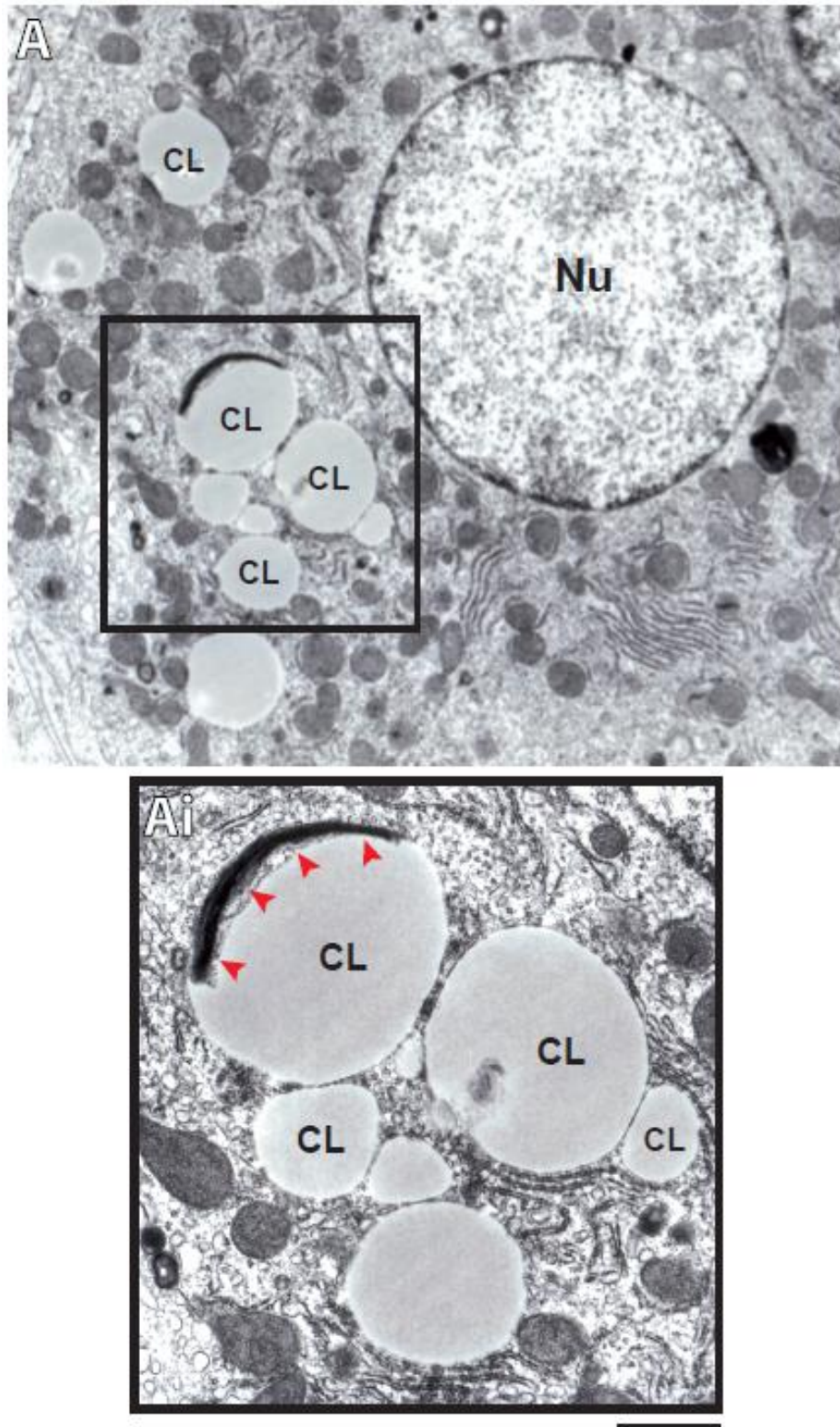


Figura 47: Corpúsculos lipídicos em hepatócitos de *Nectomys squamipes* infectados naturalmente com o parasito *Schistosoma mansoni*. Observe em (A), hepatócito apresentando núcleo eucromático (Nu), com diversos corpúsculos lipídicos (CL) no citoplasma. No detalhe (Ai), note grupo de CLs, dentre eles, um apresentando uma faixa elétron-densa (cabeças de seta), sugerindo polarização do seu conteúdo. Barra= 5,5 μm (A); 3 μm (B).

5.3.3 Dosagens Bioquímicas

5.3.3.1 Glicose e ácido úrico

Neste estudo, os valores médios de glicemia encontrados em *N. squamipes* infectados foram 45,56% menores do que os encontrados nos animais controles. De modo semelhante, os valores médios de glicemia nos camundongos Swiss infectados na fase aguda da doença foram 57,75% menores do que os valores dos Swiss controles. Com a evolução da infecção para a fase crônica, este padrão se manteve, com os Swiss de fase crônica infectados apresentando valores séricos de glicose 53,40% menores dos que seus controles. Todas estas comparações apresentaram diferenças significativas entre os grupos estudados ($p < 0,0001$). Quando comparamos os *N. squamipes* controles com os Swiss controles de fase aguda e crônica, foram observadas diferenças estatísticas significativas entre estes grupos ($p < 0,05$), indicando que o roedor silvestre não infectado apresentou valores basais de glicemia maiores dos que os animais de laboratório (Tabela 1).

Em relação às dosagens de ácido úrico, os resultados encontrados em *N. squamipes* e em camundongos Swiss (fases aguda e crônica), infectados e controles, não diferiram significativamente entre si ($p > 0,05$). Porém, estavam acima dos valores de referência para ratos Wistar e para camundongos Swiss, segundo MELO-DINIZ *et al.* (2006) (Tabela 4).

Tabela 4: Valores séricos de glicose e ácido úrico em *Nectomys squamipes* e em Swiss, nas fases aguda e crônica. Os valores foram expressos em média \pm DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias de cada grupo, em cada coluna.

Animais	Glicose	Ácido Úrico
Grupos experimentais	Média \pm DP (mg/dL)	Média \pm DP (mg/dL)
Swiss infectado - fase aguda (n=12)	60,0 \pm 5,0 ^a	3,3 \pm 0,2
Swiss controle - fase aguda (n=12)	142 \pm 15,0 ^b	3,5 \pm 0,2
Swiss infectado - fase crônica (n=6)	68,5 \pm 6,2 ^a	3,7 \pm 0,3
Swiss controle - fase crônica (n=6)	147,0 \pm 10,0 ^b	3,6 \pm 0,2
UFPB Swiss (n=10)*	112 \pm 10,37	1,8 \pm 0,33
<i>N. squamipes</i> infectado (n=13)	92,0 \pm 12,0 ^a	3,3 \pm 0,4
<i>N. squamipes</i> controle (n=13)	169,0 \pm 22,0 ^c	3,4 \pm 0,4
UFPB Wistar (n=10)*	82 \pm 3,80	1,6 \pm 0,09
<i>Neotoma fuscipes</i> (n=34)**	116 \pm 34,90	-

* Valores de referência do Biotério da Universidade Federal da Paraíba (Melo Diniz *et al.*, 2006);

**Valores de referência obtidos para o roedor silvestre *Neotoma fuscipes* (Weber *et al.*, 2002).

5.3.3.2 Colesterol total e triglicerídeos

Os camundongos Swiss infectados de fase aguda apresentaram valores médios de colesterol total e de triglicerídeos 42,86% e 42,03% inferiores aos valores encontrados nos camundongos Swiss controles, respectivamente ($p < 0,0001$). Nos swiss de fase crônica, foram encontrados níveis séricos de colesterol total e de triglicerídeos 38,29% e 55,17% menores dos que os valores dos animais controles, nesta ordem ($p < 0,0001$). Diferentemente do observado nos camundongos Swiss, *N. squamipes* infectados apresentaram valores de colesterol total e de triglicerídeos superiores aos encontrados nos roedores silvestres controles, ou seja, as taxas de colesterol total dos animais infectados estavam 38,29% acima das taxas encontradas nos controles e as taxas de triglicerídeos estavam 36,49% maiores do que nos controles ($p < 0,0001$). Nos *N. squamipes* infectados, ao compararmos seus valores de colesterol total e de triglicerídeos com os valores encontrados nos Swiss infectados (fases aguda e crônica), foram observadas diferenças estatísticas significativas para os dois parâmetros analisados, com *N. squamipes* apresentando os maiores valores ($p < 0,0001$) (Tabela 5).

Tabela 5: Valores séricos de colesterol total e de triglicerídeos em *Nectomys squamipes* e em Swiss, nas fases aguda e crônica. Os valores foram expressos em média \pm DP. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre as médias de cada grupo, em cada coluna.

Animais	Colesterol	Triglicerídeos
Grupos experimentais	Média \pm DP (mg/dL)	Média \pm DP (mg/dL)
Swiss infectado - fase aguda (n=12)	68,0 \pm 5,0 ^a	160,0 \pm 18,0 ^a
Swiss controle - fase aguda (n=12)	119,0 \pm 7,0 ^b	276,0 \pm 21,0 ^b
Swiss infectado - fase crônica (n=6)	68,5 \pm 5,6 ^a	130,0 \pm 87,0 ^a
Swiss controle - fase crônica (n=6)	111,0 \pm 6,6 ^b	290,0 \pm 26,0 ^b
UFPB Swiss (n=10)*	66 \pm 2,84	87 \pm 5,03
<i>N. squamipes</i> infectado (n=13)	157,0 \pm 19 ^c	359,0 \pm 52 ^c
<i>N. squamipes</i> controle (n=13)	109,0 \pm 14,0 ^b	228,0 \pm 25,0 ^d
UFPB Wistar (n=10) *	46 \pm 5,81	82 \pm 10,2
<i>Neotoma fuscipes</i> (n=34)**	127 \pm 39,90	-

* Valores de referência do Biotério da Universidade Federal da Paraíba (Melo Diniz *et al.*, 2006);

**Valores de referência obtidos para o roedor silvestre *Neotoma fuscipes* (Weber *et al.*, 2002).

5.3.4 Índice de Lee

Para o cálculo do índice de Lee, foram considerados os pesos e os tamanhos corporais dos animais experimentais. Desta forma, foram obtidos valores médios de índice de Lee para *N. squamipes* infectados de $0,296 \pm 0,005$, média \pm DP e de $0,304 \pm 0,006$, média \pm DP para *N. squamipes* não infectados, sendo estes animais considerados com peso normal. Apesar disso, foi observada diferença significativa entre *N. squamipes* infectados e não infectados ($p < 0,05$). Por outro lado, nos swiss infectados de fase aguda, o valor encontrado foi de $0,346 \pm 0,002$, média \pm DP e nos Swiss controles, o valor foi de $0,342 \pm 0,003$, média \pm DP. Nos Swiss de fase crônica, infectados e controles, os valores obtidos foram de $0,347 \pm 0,001$, média \pm DP e de $0,345 \pm 0,002$, média \pm DP, respectivamente, sendo que não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos ($p > 0,05$). Os Swiss foram considerados com sobrepeso (Fig.48).

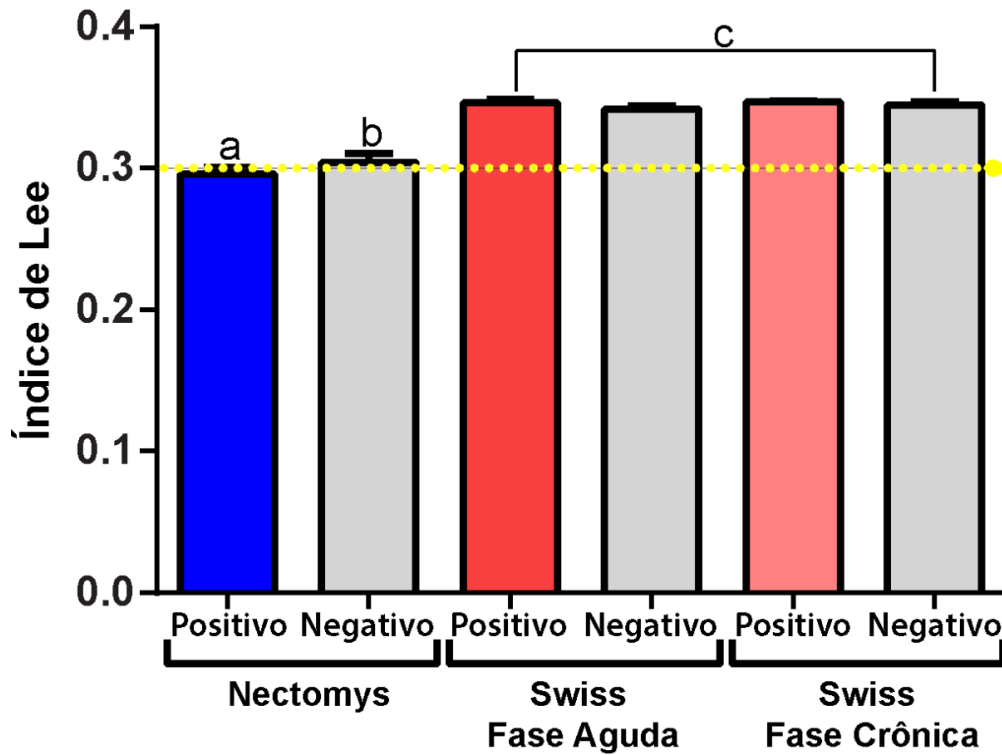


Figura 48: Índice de Lee de *Nectomys squamipes* e de camundongos Swiss, nas fases aguda e crônica, infectados ou não pelo parasito *Schistosoma mansoni*. No gráfico, observe uma linha pontilhada em amarelo representando o limite de normalidade para o índice de Lee (0,300). Abaixo desta linha, os valores indicam que os animais possuem peso normal. Acima, os animais são considerados com sobrepeso. Os valores foram expressos como média \pm DP. Letras diferentes significam diferenças estatísticas entre médias ($p < 0,05$).

5.3.5 Espectroscopia Raman

5.3.5.1 Espectros raman médios

A espectroscopia Raman pode ser considerada uma técnica adequada para o estudo de lipídios devido à presença de cadeia apolar em suas estruturas e, por esse motivo, as bandas de lipídios tendem a apresentar sinais intensos no espectro Raman. O estudo de lipídios por espectroscopia Raman permite avaliar a composição química destes compostos em células e tecidos e determinar o grau de insaturação das amostras estudadas.

A Figura 49 mostra os espectros Raman médios (médias das triplicatas) obtidos para os animais estudados. Os espectros Raman dos tecidos apresentaram modos vibracionais de lipídios, composto de interesse neste estudo, mas também foram observados modos vibracionais de outros compostos, como proteínas e heme. As bandas características de lipídios são observadas em 1300, 1448 e 2855 cm^{-1} para lipídios saturados. A presença de insaturações é revelada pelas bandas em 1658 cm^{-1} , 1269 e 3008 cm^{-1} . As bandas Raman de proteínas podem ser identificadas pelas bandas em 1650 cm^{-1} e em 1004 cm^{-1} , e as bandas em 1130 e 1590 cm^{-1} podem ser atribuídas ao grupo heme (CZAMARA *et al.*, 2015).

A análise visual dos espectros Raman médios permitiu obter algumas informações em relação à composição lipídica dos tecidos hepáticos. A principal diferença entre os espectros Raman das amostras dos tecidos infectados e não infectados em relação aos modos vibracionais de lipídios foi observada na banda em 3008 cm^{-1} e na razão das intensidades das bandas na região de 1650 e 1450 cm^{-1} . O sinal Raman suave em 3008 cm^{-1} apareceu nos espectros Raman de *N. squamipes* positivo, enquanto que para os demais animais, essa banda não foi observada. A banda em 3008 cm^{-1} é atribuída ao modo vibracional de estiramento da ligação química =C-H, característica de ácidos graxos insaturados. Esta banda é mais proeminente no ácido araquidônico, quando comparado com outros ácidos poli-insaturados (CZAMARA *et al.*, 2015). Esse resultado pode ser um indicativo de uma maior quantidade deste ácido graxo nos tecidos hepáticos de *N. squamipes* infectado.

As bandas Raman na região de 1650 e 1450 cm^{-1} forneceram informações sobre a composição lipídica dos tecidos. A razão da intensidade das bandas em 1659 e 1446 cm^{-1} foi empregada para o cálculo do grau de insaturação. Para cada espectro obtido, foi calculada a razão de intensidade entre as duas bandas. A Figura 50 mostra o resultado do grau de insaturação para os animais estudados. Neste gráfico, são mostradas as médias obtidas, sendo que uma razão de intensidade maior indica uma maior insaturação. As amostras de *N. squamipes* positivo, *N. squamipes* negativo e de Swiss agudo positivo apresentaram um grau de insaturação maior que os demais animais.

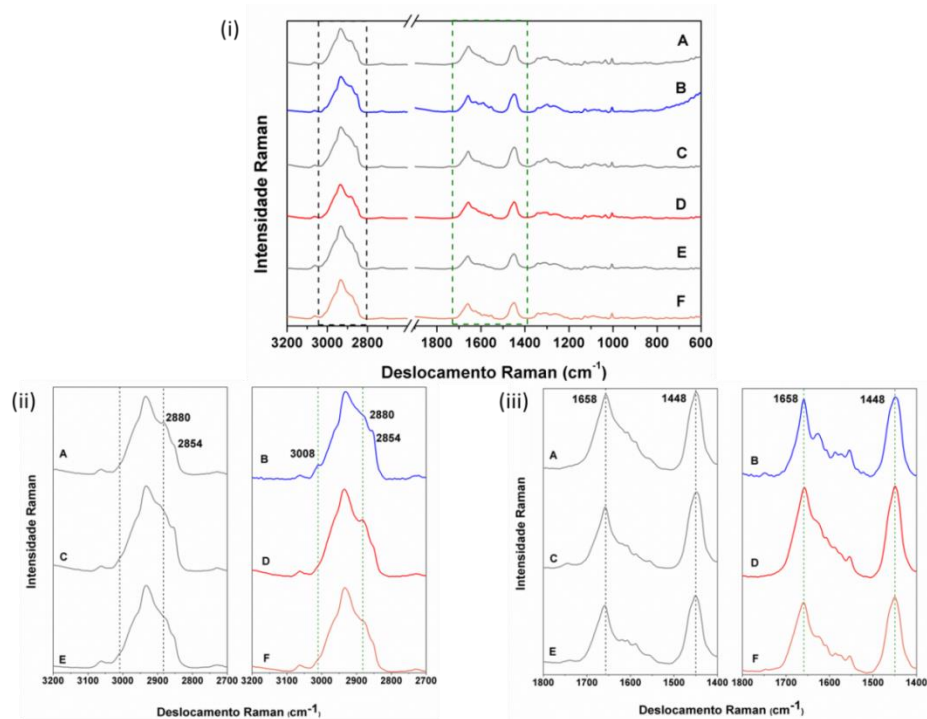


Figura 49: Espectros Raman de amostras de tecidos hepáticos de *Nectomys squamipes* e de camundongos Swiss (fases aguda e crônica), de animais infectados pelo *Schistosoma mansoni* e seus respectivos controles. Em (i), observe o espectro Raman médio das amostras dos tecidos hepáticos dos animais: (A) *N. squamipes* negativo; (B) *N. squamipes* positivo; (C) Swiss agudo negativo; (D) Swiss agudo positivo; (E) Swiss crônico negativo; (F) Swiss crônico positivo. Em (ii), destaque para a região espectral de 3200 a 2700 cm^{-1} em *N. squamipes* positivo e em (iii) note as diferenças espectrais entre as amostras.

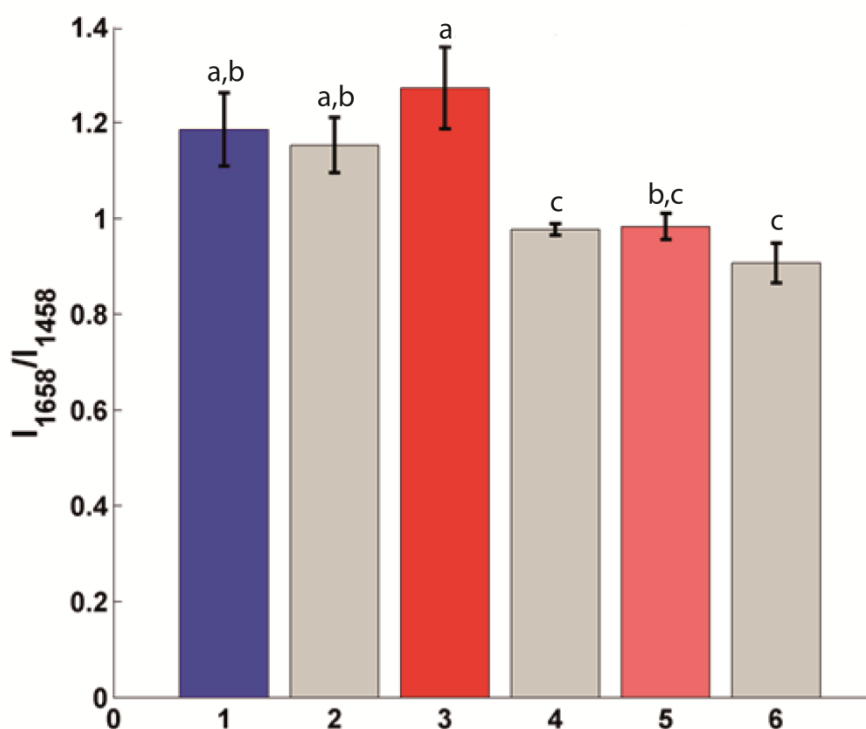


Figura 50: Gráfico de barras representando a razão da intensidade das bandas em 1658 e 1458 cm^{-1} para as amostras de tecidos hepáticos dos animais estudados. *N. squamipes* positivo (1); *N. squamipes* negativo (2); Swiss fase aguda positivo (3); Swiss fase aguda negativo (4); Swiss fase crônica positivo (5); Swiss fase crônica negativo (6). A Análise de Variância (ANOVA), com nível de confiança de 95%, seguida do teste Tukey, mostrou diferenças significativas entre as médias dos graus de insaturação dos roedores, expressas por letras diferentes.

5.3.5.2 Análise de componentes principais (PCA)

Para estudo comparativo entre amostras de *N. squamipes* e de Swiss, foi realizada análise exploratória dos espectros com o objetivo de identificar similaridades e diferenças entre as amostras e correlacionar os achados com a composição química dos tecidos. O gráfico dos escores da PCA, mostrado na Figura 51, permitiu visualizar a distribuição das amostras e inferir algumas informações quanto à sua homogeneidade.

A primeira componente principal separou as amostras dos tecidos infectados das amostras não infectadas. Uma exceção foi o *N. squamipes* negativo (não infectado) que ficou agrupado junto com as amostras infectadas. Esta separação pode ser devida a uma menor quantidade de ácidos graxos insaturados presentes nos tecidos dos Swiss não infectados.

No gráfico dos escores, observa-se que algumas amostras ficaram fora da elipse de 95% de confiança do parâmetro estatístico T^2 de Hotelling, que é empregado para detectar amostras anômalas (outliers). A estatística T^2 de Hotelling calcula a variação de cada amostra dentro do modelo PCA a partir da soma normalizada do quadrado dos escores. As amostras fora da elipse podem ser consideradas anômalas e a segunda componente é responsável pela separação dessas amostras das demais.

O gráfico dos pesos das variáveis permite avaliar quais bandas Raman são responsáveis pela separação das amostras. A Figura 52 mostra o gráfico dos pesos da primeira e da segunda componentes. Na primeira componente, a banda Raman na região de 1650 cm^{-1} apresenta maior peso e é responsável pela separação das amostras infectadas das amostras não infectadas, exceto para *N. squamipes* negativo. Esta região tem contribuição do modo de estiramento C=C, presente nos ácidos graxos insaturados. Este resultado sugere que as amostras infectadas possuem um maior teor de ácidos graxos insaturados na sua composição. O gráfico dos pesos das variáveis da segunda componente principal mostra que a região das bandas de 1590 , 1430 e 1350 cm^{-1} possuem contribuição de grupos de proteínas e do grupo heme presentes nos tecidos e são responsáveis pela presença das amostras anômalas. Os fragmentos dessas amostras apresentaram um teor de lipídio baixo comparado com as outras amostras, por isso a separação das demais.

No estudo da PCA, usando as triplicatas das amostras, foi observada uma heterogeneidade nos perfis espectrais, principalmente para as amostras infectadas e para as amostras de *N. squamipes* não infectado. No entanto, observou-se que as amostras controles (Swiss negativos) apresentaram um perfil espectral mais homogêneo.

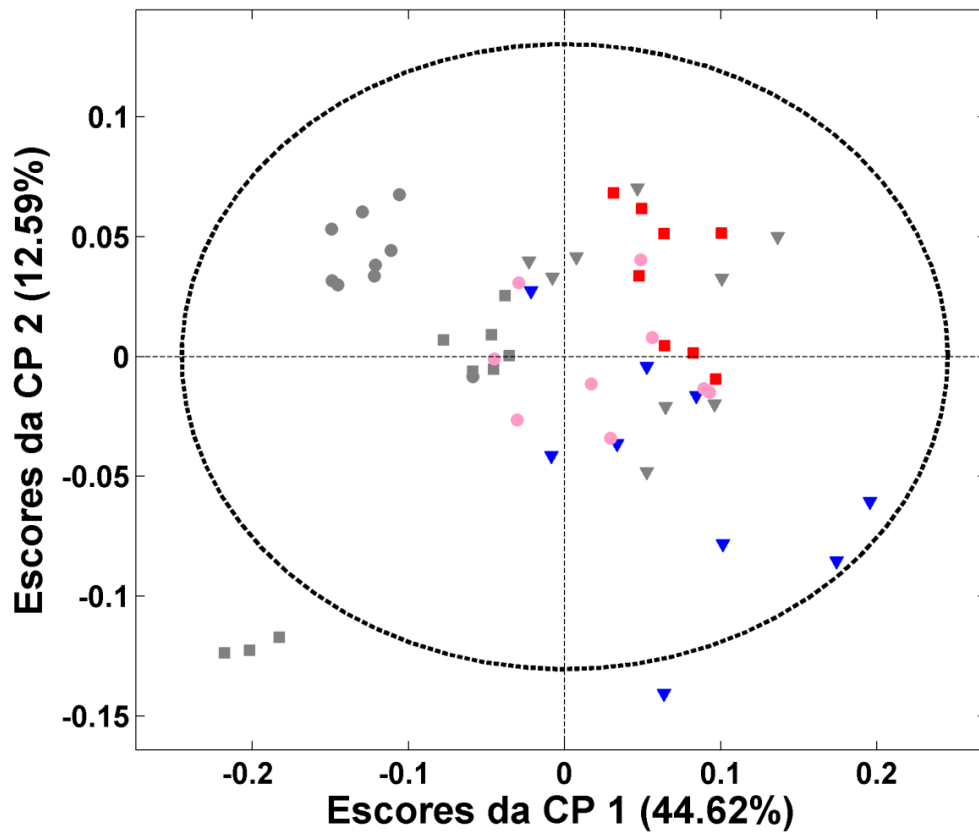


Figura 51: Gráfico dos escores da análise dos componentes principais. O gráfico mostra a distribuição das amostras dos tecidos hepáticos dos roedores estudados. Os animais encontram-se representados pelos seguintes símbolos gráficos: *N. squamipes* positivo (▼), *N. squamipes* negativo (▼), Swiss fase aguda positivo (■), Swiss fase aguda negativo (■), Swiss fase crônica positivo (●), Swiss fase crônica negativo (●).

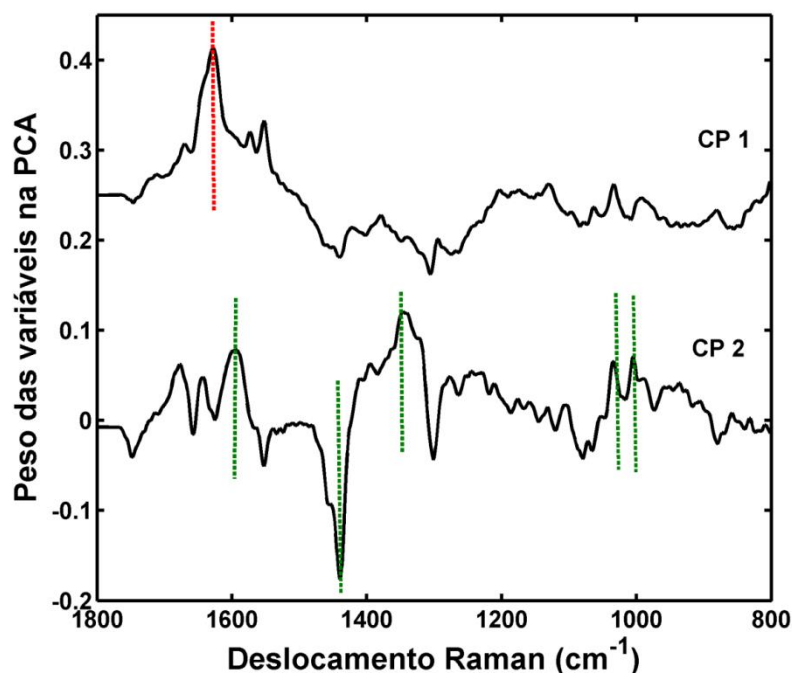


Figura 52: Gráfico dos pesos das variáveis na CP1 e CP2 no modelo da PCA. O gráfico mostra as regiões do espectro Raman que representam a CP1 (região destacada em vermelho) e a CP2 (região destacada em verde).

5.3.5.3 Análise dos componentes hierárquicos (HCA)

Para a análise dos componentes hierárquicos, as distâncias entre as amostras foram calculadas, baseadas nos espectros médios de cada animal. A análise de agrupamentos foi feita para um melhor entendimento da heterogeneidade dos perfis espectrais dos tecidos. A Figura 53 mostra o resultado da HCA usando o algoritmo KNN para o cálculo das distâncias. O dendograma mostrou que as amostras de *N. squamipes* positivo e negativo apresentaram perfis espectrais mais heterogêneos em relação aos demais. O espectro Raman médio de cada animal estudado apresentou diferenças entre eles. Para as amostras dos Swiss, os espectros Raman dos diferentes animais apresentaram uma maior similaridade, visto que as amostras ficaram próximas. No entanto, para o Swiss agudo negativo, a amostra obtida de um animal chamou atenção por apresentar uma maior distância entre as demais amostras. Na análise da HCA, essa amostra foi nomeada de amostra 11 no dendograma e na PCA, a triplicata dessa amostra aparece distante das demais (fora da elipse) e pode ser considerada uma amostra anômala.

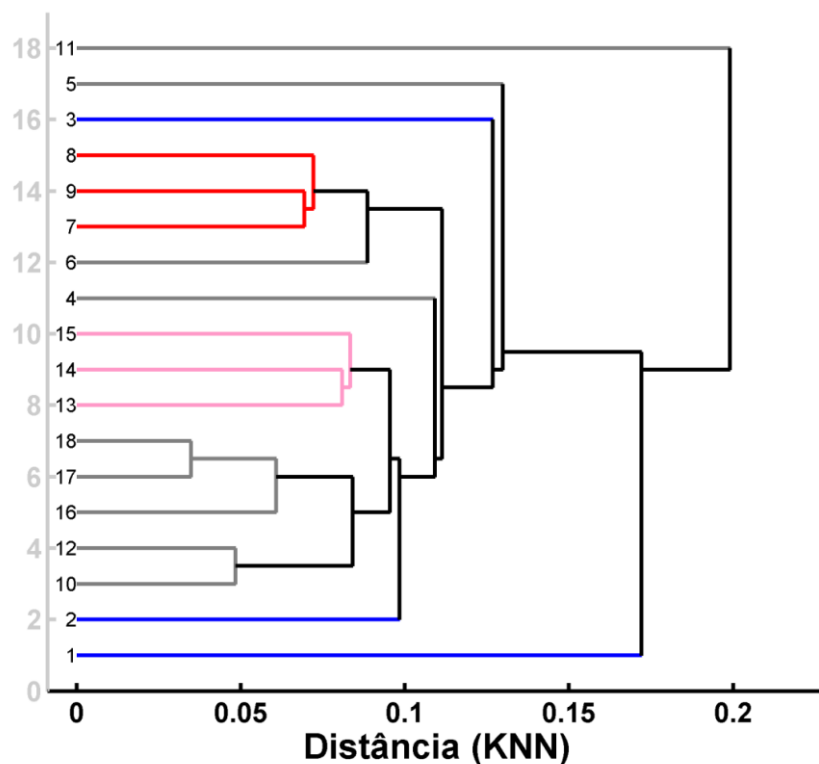


Figura 53: Dendrograma da análise de componentes hierárquicos (HCA). As amostras representam os espectros médios de cada animal: *N. squamipes* positivo (1, 2, 3); *N. squamipes* negativo (4, 5, 6); Swiss fase aguda positivo (7, 8, 9), Swiss fase aguda negativo (10, 11, 12), Swiss fase crônica positivo (13, 14, 15), Swiss fase crônica negativo (16, 17, 18).

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 Corpúsculos Lipídicos

Estas análises permitiram uma melhor compreensão sobre a relação dos CLs presentes nos hepatócitos dos roedores estudados com o parasitismo pelo *S. mansoni*. Este estudo foi particularmente relevante no caso do roedor *N. squamipes*, visto que não existem estudos disponíveis na literatura mostrando as relações entre os CLs e a esquistossomose mansônica neste modelo natural de infecção.

Assim, as análises por microscopia de luz revelaram que a infecção esquistossomótica em *N. squamipes* induziu à formação de grandes quantidades de CLs nos hepatócitos destes animais. Mesmo nos *N. squamipes* não infectados, foram encontradas quantidades de CLs superiores às encontradas nos swiss nas fases aguda e crônica, infectados ou não. Estes achados podem significar que os CLs desempenham papéis relevantes na infecção esquistossomótica no roedor silvestre.

A esteatose hepática presente em *N. squamipes* pode estar associada à sua dieta. Dietas ricas em colesterol e em frutose podem induzir à esteatose hepática (KUCERA e CERVINKOVA, 2014). Dados da literatura sugerem que a esteatose hepática induzida por dieta pode ser um fator essencial para a regeneração dos hepatócitos danificados na esquistossomose mansônica experimental (SHTEYER *et al.*, 2004). Hepatócitos em regeneração normalmente acumulam microgotículas de gordura, representando uma adaptação metabólica, de forma que as novas células emergentes tenham energia facilmente disponível, bem como matéria-prima para a construção de suas membranas celulares (MICHALOPOULOS, 2007).

Por outro lado, mediadores inflamatórios também poderiam ser produzidos pelos CLs presentes nos hepatócitos de *N. squamipes*, contribuindo com a modulação da resposta imune inata. BOZZA *et al.* (2009) observaram que a formação de eicosanoides não está restrita às células do sistema imune, mas que outros tipos celulares também podem produzir eicosanoides em seus CLs.

No presente trabalho, os dados quantitativos das análises ultraestruturais corroboraram os dados obtidos nas análises por microscopia de luz, ou seja, as contagens de CLs por área seccional em *N. squamipes* infectados foram estatisticamente maiores do que as encontradas nos *N. squamipes* controles.

Quanto ao tamanho dos CLs, foram encontrados CLs de tamanhos variados. Os CLs podem aumentar de tamanho através da fusão entre CLs (WELTE, 2009), ou pela síntese de lipídios através de enzimas presentes em suas superfícies (DIGEL *et al.*, 2010). Os CLs constituem sítios de síntese e armazenamento de mediadores inflamatórios. Por isso, é possível encontrar alterações quantitativas e de tamanho destas estruturas em vários processos infecciosos, principalmente nas células dos órgãos alvos do patógeno ou em leucócitos do hospedeiro (MELO *et al.*, 2011). Já foi observado que processos infecciosos podem induzir mudanças significativas nos números e áreas dos CLs, representando indícios importantes da participação destas organelas nas respostas imunes inatas contra agentes infecciosos e parasitários (MELO *et al.*, 2006).

Por outro lado, patógenos utilizam CLs para favorecer sua replicação e/ou persistência no hospedeiro (MELO *et al.*, 2006; D'AVILA *et al.*, 2006; D'AVILA *et al.*, 2012). No caso do parasito *Schistosoma mansoni*, este utiliza os CLs do hospedeiro como fonte de energia e para detoxificação do grupo heme, além de diversas outras funções (FURLONG *et al.*, 1995; HERKER *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2012).

A MET revelou estreitas relações dos CLs de *N. squamipes* com outras organelas celulares, podendo ter importância fisiológica (GUO *et al.*, 2009). Foram observadas, muito comumente, interações de CLs com mitocôndrias, visto que os ácidos graxos liberados pela lipólise, que ocorre na superfície dos CLs, são utilizados pelas mitocôndrias para β -oxidação e geração de energia (STURMEY *et al.*, 2006). Além disso, foram observados CLs em estreita proximidade com os núcleos dos hepatócitos e com o retículo endoplasmático (RE), sendo que esta última interação pode representar a chave para a compreensão da biossíntese destas organelas (ZWEYTICK *et al.*, 2000). Nossas análises ainda revelaram a presença de faixas elétron-densas nas superfícies de CLs. Tem sido sugerido que estas diferenças de elétron-densidades poderiam estar associadas a infecções em modelos experimentais (MELO *et al.*, 2006). Porém, no presente trabalho, estas estruturas foram observadas tanto nos animais silvestres naturalmente infectados quanto nos não infectados. Adicionalmente, estruturas membranosas foram frequentemente observadas no interior dos CLs. MELO *et al.* (2013), utilizando tomógrafo digital de alta resolução, observaram um intrincado sistema de membranas internas nos CLs, organizadas como uma rede de túbulos semelhantes ao RE.

5.4.2 Dosagens Bioquímicas

5.4.2.1 Glicose e ácido úrico

Na esquistossomose mansônica, espera-se que ocorra uma hipoglicemia no hospedeiro, visto que o parasito *S. mansoni* espolia as reservas de glicose de seus hospedeiros (BUEDING, 1950).

No presente trabalho, foram encontrados valores séricos de glicose nos roedores infectados (*N. squamipes* e Swiss, fases aguda e crônica) bem inferiores aos encontrados nos animais controles, sugerindo que o parasito se utilizou das reservas séricas de glicose de seus hospedeiros.

Diferentemente do encontrado neste estudo, COSTA-NETO *et al.* (2013) encontraram um aumento de 25,27% nos valores de glicose sérica em *N. squamipes* naturalmente infectados com o *S. mansoni* em relação aos animais não infectados. Por outro lado, COUTO *et al.* (2008) observaram que camundongos Swiss infectados experimentalmente com o *S. mansoni* apresentaram uma diminuição expressiva da glicose sérica, em resposta à espoliação por parte do parasito.

Ao compararmos as glicemias médias dos animais controles de ambas as espécies estudadas, observamos que *N. squamipes* apresentou valores significativamente maiores. Já foi documentado que *N. squamipes* percorre pouco seu território, sendo considerado um animal de hábitos sedentários; além disso, é um animal onívoro, não sofrendo escassez de alimentos em nenhuma das estações do ano (LIMA, 2009). Assim, provavelmente, ele consegue suprir as deficiências nutricionais geradas pelo parasitismo pelo *S. mansoni* através de uma alimentação mais reforçada.

O consumo excessivo de frutose, uma hexose presente em vários vegetais, favorece a síntese de gorduras através da gliconeogênese no fígado, podendo resultar em esteatose hepática, além de aumento da pressão arterial e dos níveis séricos de ácido úrico e ácido láctico (HALLFRISCH, 1990).

Portanto, para verificar se a dieta de *N. squamipes* no ambiente natural é rica em frutose, o que poderia contribuir para gerar esteatose nos animais, foram realizadas dosagens séricas de ácido úrico. No caso dos animais de laboratório, estes foram submetidos a uma dieta padrão para roedores (Nuvilab CR-1) *ad libitum*, composta por milho integral moído, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de

cálcio, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, premix vitamínico mineral e aminoácidos, contendo um teor de gorduras totais de 4,5%.

Os valores séricos de ácido úrico encontrados nos roedores estudados não diferiram entre si. Apenas, os valores encontrados, tanto para *N. squamipes* quanto para o Swiss, apresentaram-se acima dos valores referência para ratos Wistar e para camundongos Swiss, segundo MELO-DINIZ *et al.* (2006). Estes valores mais elevados nos animais experimentais em relação aos valores de referência podem ser devidos ao fato de que os animais experimentais não foram submetidos a jejum previamente às coletas de sangue, enquanto os valores de referência foram obtidos a partir de animais submetidos a jejum prévio.

As elevações de ácido úrico encontradas nos animais experimentais, não podem, portanto, ser associadas a uma dieta rica em frutose, pois tanto os animais silvestres, que tiveram acesso a uma dieta diversificada, quanto os animais de laboratório, que receberam uma dieta controlada, apresentaram tais elevações. Portanto, outras causas podem estar associadas a estes aumentos.

5.4.2.2 Colesterol total e triglicerídeos

No presente trabalho, os camundongos Swiss infectados, nas fases aguda e crônica, apresentaram valores médios de colesterol total e de triglicerídeos inferiores aos valores encontrados nos camundongos controles, indicando a utilização dos lipídios do hospedeiro por parte do *S. mansoni*.

Este parasito é incapaz de sintetizar seus próprios lipídios e, portanto, precisa obtê-los a partir do hospedeiro (TEMPONE *et al.*, 1997). O *Schistosoma mansoni* utiliza os lipídios principalmente para a produção de ovos (HUANG *et al.*, 2012), nos mecanismos de imunoevasão do sistema imune do hospedeiro (FURLONG *et al.*, 1995) e para detoxificação do grupo heme tóxico resultante do catabolismo da hemoglobina (CORRÊA SOARES *et al.*, 2007).

Por outro lado, o hospedeiro também se beneficia da espoliação de seus lipídios, pois já foi demonstrado que o sequestro destes por parte do *S. mansoni* é tão intenso que é capaz de gerar uma diminuição acentuada de lipídios séricos, como o colesterol e os triglicerídeos, o que significa proteção para o sistema cardiovascular dos hospedeiros (CHEN *et al.*, 2013). Assim, tanto o parasito quanto o hospedeiro passam por adaptações evolutivas, cujo principal objetivo é minimizar

os prejuízos e maximizar as vantagens desta relação ecológica para ambas as espécies.

Quando comparamos os resultados dos lipídios em *N. squamipes* infectados e não infectados, verificamos que, ao contrário do observado nos camundongos Swiss, os níveis séricos de colesterol total e de triglicerídeos foram maiores nos animais infectados. Neste caso, apesar do parasito também utilizar as reservas lipídicas do hospedeiro no seu metabolismo, parece que o rato d'água infectado aumenta a ingestão de alimentos (hiperfagia), investindo em suas reservas lipídicas para lidar melhor com o parasitismo pelo *S. mansoni*. Esta maior ingestão de alimentos provavelmente produz uma esteatose hepática que irá favorecê-lo, visto que a presença de grandes quantidades de CLs no fígado do animal parasitado possibilita uma melhor regeneração dos tecidos hepáticos danificados pela reação inflamatória.

Vale ressaltar que, em relação aos triglicerídeos, os valores observados em *N. squamipes* infectados foram significativamente maiores do que os encontrados nos Swiss infectados ($p < 0,05$). Estes valores aumentados de triglicerídeos em *N. squamipes* seriam mais um indicativo do desenvolvimento de esteatose hepática a partir da dieta livre à qual estes animais têm acesso no ambiente natural. Além disso, estes valores estão em concordância com a esteatose hepática mais pronunciada, observada nestes animais, quando comparados aos camundongos Swiss nas fases aguda e crônica. Este fato é explicado pela melhor adaptação do rato d'água ao parasitismo. Quanto mais triglicerídeos ele obtém através da alimentação, mais estes lipídios são armazenados nos hepatócitos, na forma de corpúsculos lipídicos, que serão utilizados para suprir as necessidades metabólicas do parasito e também para auxiliar nos mecanismos de regeneração celular do tecido hepático.

Em suma, uma dieta hipercalórica ou hiperlipídica, aliada à suscetibilidade genética do animal, poderia levá-lo a desenvolver conjuntamente esteatose hepática e hiperglicemia. Estas duas condições estão interligadas (NEUSCHWANDER-TETRI *et al.*, 2010) e, no caso do rato d'água, poderiam ajudá-lo a lidar com o parasitismo pelo *S. mansoni*. Por outro lado, o parasito, ao sequestrar os recursos do rato d'água (glicose e lipídios), ajuda a equilibrar as taxas séricas de ambos.

5.4.3 Índice de Lee

Neste estudo, foi calculado o índice de Lee, tanto dos animais silvestres quanto dos animais de laboratório utilizados. Este índice, semelhante ao IMC para humanos, serve para avaliar o peso do roedor em relação ao seu tamanho corporal, ajudando a identificar o estado de obesidade ou de desnutrição do animal. Segundo BERNARDIS e PATTERSON (1968), um índice de Lee igual ou inferior a 0,300 é indicativo de peso normal. No caso de valores superiores a 0,300, os roedores são classificados como acima do peso ideal. Este cálculo foi incluído neste estudo com o objetivo de verificar quais os efeitos que a infecção pelo *S. mansoni* poderia produzir nos parâmetros peso e tamanho corporal, refletindo o status nutricional dos animais.

Portanto, obtivemos valores de índices de Lee para *N. squamipes* muito próximos do valor de 0,300, considerado como normal, enquanto que os valores encontrados para os camundongos Swiss estavam acima do valor limítrofe, indicando sobrepeso nos animais.

Animais silvestres, vivendo no ambiente natural, são submetidos a vários estressores ambientais. Assim, estes têm que atender a várias demandas, com atividades variadas relacionadas a diversos fatores como reprodução, aquisição de recursos e fuga de predadores (VASCONCELLOS, 2009). Todo este esforço gera um custo energético alto. Em contrapartida, animais de laboratório, criados em cativeiro, são dispensados deste gasto energético, visto que as condições ambientais são controladas.

Assim, ao avaliarmos os valores dos índices de Lee de *Nectomys squamipes* e de Swiss, torna-se necessário levar em conta a questão do gasto energético dos animais. No caso dos Swiss, o principal estressor ao qual estes roedores foram submetidos neste experimento foi a infecção pelo helminto *S. mansoni*.

Apesar de *N. squamipes* terem sido capturados na natureza e de estarem parasitados com o *S. mansoni* e/ou com outros parasitos, sugere-se que, pelo investimento que fazem na alimentação, conseguem se manter bem nutridos, de modo a lidar eficazmente com o parasitismo pelo *S. mansoni*. Em contrapartida, o fato dos Swiss estarem acima do peso ideal reflete principalmente a falta de gasto energético devido ao cativeiro e à oferta de alimentos *ad libitum*, mesmo nos animais infectados.

5.4.4 Espectroscopia Raman

Os espectros Raman são obtidos ao incidir um laser na amostra, que gera transferência de energia e provoca espalhamento da radiação. Desta forma, as bandas observadas nos espectros Raman fornecem informações sobre ligações químicas das moléculas presentes na amostra. Devido às suas características marcantes, como a capacidade de fornecer impressões digitais moleculares de forma não invasiva, com pouca ou nenhuma preparação da amostra, a espectroscopia Raman tem encontrado aplicações no campo das ciências biomédicas. A espectroscopia Raman vem aparecendo nas publicações da área biomédica como uma ferramenta de análise inovadora, poderosa e sensível para o estudo de processos que ocorrem nas células e tecidos. Os espectros Raman são úteis para a avaliação de proteínas, ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos e substâncias inorgânicas (BARANSKA *et al.*, 2014).

Pesquisas recentes têm mostrado novas perspectivas para o estudo dos corpúsculos lipídicos. Diversas funções têm sido descritas para estas organelas, como participação na sinalização celular, tráfego de membrana e homeostase de lipídios. Estas estruturas também apresentam importantes papéis em várias patologias, infecciosas ou não. A espectroscopia Raman se mostra uma técnica adequada para o estudo de lipídios devido à presença de cadeia apolar em suas estruturas e, por esse motivo, as bandas de lipídios tendem a apresentar sinais intensos no espectro Raman (ABRAMCZYK *et al.*, 2015).

No presente trabalho, a espectroscopia Raman forneceu informações relevantes sobre a composição química dos tecidos hepáticos estudados. Por exemplo, a comparação entre as amostras de tecido hepático de *N. squamipes* e de Swiss (fases aguda e crônica), infectados ou não com o *S. mansoni*, permitiu inferir informações a respeito do grau de insaturação das amostras. Desta forma, foi observado que *N. squamipes* positivos e negativos e Swiss de fase aguda positivos apresentaram grau de insaturação maior do que as outras amostras estudadas. Estes resultados, obtidos pela PCA e HCA, podem ser correlacionados com as análises quantitativas dos CLs presentes nas mesmas amostras. O maior grau de insaturação observado nestes animais pode indicar o desenvolvimento de uma esteatose benéfica, capaz de proporcionar uma melhor regeneração dos tecidos hepáticos danificados pela reação inflamatória. Mesmo em *N. squamipes* não

infectado, este alto grau de insaturação presente nas amostras de fígado sugerem uma adaptação evolutiva em relação ao parasitismo pelo *S. mansoni*.

Vale salientar que o *N. squamipes* infectado apresentou banda em 3008 cm^{-1} , o que pode indicar a presença de ácido araquidônico (AA), considerado um precursor de mediadores inflamatórios eicosanoides, podendo contribuir com a modulação da resposta imune inata.

Como perspectivas futuras, para uma melhor compreensão do metabolismo lipídico nestes dois modelos de infecção esquistossomótica, pretendemos mapear o conteúdo do corpúsculo lipídico, através da microscopia Raman, para acessar a composição de ácidos graxos no interior destas organelas presentes no citoplasma dos hepatócitos destes roedores. Assim, teremos dados mais consistentes a respeito dos papéis destas organelas na esquistossomose mansônica natural e experimental.

5.5 CONCLUSÕES

- As análises dos tecidos hepáticos de *N. squamipes* infectados pelo *S. mansoni* revelaram a presença de numerosos CLs, sugerindo que estas organelas poderiam atuar de maneira relevante na esquistossomose mansônica neste roedor silvestre;

- Mesmo os animais silvestres não infectados desenvolveram esteatose hepática, sendo que a presença de CLs no fígado destes hospedeiros poderia significar proteção contra um provável parasitismo pelo *S. mansoni*;

- Os CLs de *N. squamipes*, analisados por MET, apresentaram morfologia típica e interações características com outras organelas celulares;

- A infecção esquistossomótica produziu diminuição nos níveis séricos de glicose em todos os grupos estudados, devido à espoliação do parasito *S. mansoni*. Por outro lado, as dosagens de ácido úrico geraram resultados inconclusivos;

- Roedores infectados experimentalmente com o *S. mansoni* apresentaram valores séricos de colesterol total e triglicérides diminuídos em relação aos controles, por causa da espoliação do parasito. Por outro lado, em *N. squamipes*, foram observados valores maiores de colesterol e de triglicérides nos animais infectados. Apesar da espoliação de seus lipídios por parte do parasito, provavelmente estes animais investem mais na alimentação, garantindo altas taxas lipídios em seus organismos, podendo ser utilizados na proteção contra a infecção parasitária;

- O cálculo do índice de Lee mostrou que o parasitismo pelo *S. mansoni* não causou efeitos deletérios no desenvolvimento ponderal dos animais estudados (*N. squamipes* e Swiss);

- A espectroscopia Raman mostrou que as amostras de *N. squamipes* positivos e negativos e de Swiss de fase aguda positivos apresentaram graus de insaturação maiores do que as outras amostras estudadas, sugerindo a ocorrência de uma esteatose benéfica nestes animais, corroborando os resultados obtidos nas análises quantitativas dos CLs;

- Os resultados obtidos pela PCA e HCA revelaram que *N. squamipes* positivo apresentou banda em 3008 cm^{-1} , podendo indicar presença de ácido araquidônico (AA) neste roedor. Este achado sugere a produção de mediadores inflamatórios pelos CLs presentes nos hepatócitos de *N. squamipes* infectados pelo *S. mansoni*.

6 CAPÍTULO 3 - PARTICIPAÇÃO DOS EOSINÓFILOS DURANTE A RESPOSTA INFLAMATÓRIA GRANULOMATOSA NA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA EM MODELO NATURAL E EXPERIMENTAL

6.1 INTRODUÇÃO

Os eosinófilos constituem a principal população de células inflamatórias durante a esquistossomose mansônica murina experimental (MAHMOUD, 1982).

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* provoca aumentos dramáticos nos níveis de eosinófilos no sangue periférico e nos granulomas, observados nos tecidos do hospedeiro, induzidos pela presença dos ovos do parasito, principalmente durante a fase aguda da infecção. Embora níveis elevados de eosinófilos tenham sido associados com uma resposta protetora nas infecções helmínticas, estudos têm apontado que os eosinófilos também podem causar danos e contribuir para a patologia dos tecidos. Além disso, estas células podem ser consideradas uma fonte significativa de várias citocinas e fatores de crescimento e, por conseguinte, apresentam atividades pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e imunorreguladoras (THORNE e MAZZA, 1991).

Para investigar a participação dos eosinófilos presentes na reação inflamatória granulomatosa em modelo natural e experimental de esquistossomose mansônica, foram realizadas as seguintes análises: [1] análises quantitativas dos eosinófilos por microscopia de luz (ver seção Materiais e Métodos, nº 3.3.5); [2] análises ultraestruturais dos eosinófilos por MET (ver seção Materiais e Métodos, nºs 3.5.1 e 3.5.3).

6.2 OBJETIVOS

6.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a participação dos eosinófilos na resposta inflamatória granulomatosa presente em *Nectomys squamipes* naturalmente infectados com o helminto *Schistosoma mansoni* e em camundongos Swiss experimentalmente infectados com este parasito.

6.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases evolutivas dos granulomas esquistossomóticos presentes nos fígados e intestinos de *N. squamipes* e de camundongos Swiss infectados, nas fases aguda e crônica, por microscopia de luz;
- Determinar a proporção de eosinófilos nas diferentes fases evolutivas dos granulomas hepáticos e intestinais de *N. squamipes* e de Swiss infectados pelo parasito *S. mansoni*, nas fases aguda e crônica, por microscopia de luz;
- Determinar a proporção de eosinófilos no tipo de granuloma mais frequentemente encontrado em cada grupo estudado;
- Caracterizar a ultraestrutura de eosinófilos de *N. squamipes* e de Swiss por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

6.3 RESULTADOS

6.3.1 Quantificação de Eosinófilos nos Granulomas por Microscopia de Luz

6.3.1.1 Eosinófilos nas fases evolutivas dos granulomas

Os eosinófilos foram observados em todas as fases evolutivas dos granulomas esquistossomóticos, presentes nos fígados e intestinos de *N. squamipes* e de camundongos Swiss (fases aguda e crônica) (Fig.54). Foram feitas quantificações destas células por tipo de granuloma presente nos órgãos-alvo da infecção, nos dois modelos estudados. Desta forma, verificou-se que as maiores quantidades de eosinófilos foram encontradas nos granulomas hepáticos e intestinais de camundongos Swiss de fase aguda (Fígado: 223 ± 22 ; Intestino delgado: 122 ± 48 ; Intestino grosso: 164 ± 18 , média \pm DP), justamente quando a reação inflamatória presente nos tecidos foi mais intensa, enquanto que os menores números destas células foram observados nos granulomas hepáticos e intestinais de *N. squamipes* (Fígado: 43 ± 15 , Intestino delgado: 61 ± 5 , Intestino grosso: 43 ± 3 , média \pm DP, $p < 0,05$, Fig.55A).

As distribuições das proporções de eosinófilos por tipo de granuloma mostraram que no fígado de *N. squamipes*, a proporção de eosinófilos em PE foi maior. Além disso, neste órgão, a distribuição dos eosinófilos foi mais homogênea no camundongo Swiss (fases aguda e crônica). No intestino delgado de *N. squamipes*, foi encontrada maior proporção de eosinófilos em granulomas EP (Fig.55B).

Através das análises por microscopia de luz, foi possível observar, tanto em *N. squamipes* quanto em camundongos Swiss, a presença de eosinófilos aderidos às cascas dos ovos do parasito e eosinófilos invadindo cascas de ovos vazias, já sem a larva miracídio em seu interior. Também foram obtidas imagens de granulomas em camundongos Swiss contendo numerosos eosinófilos, com coloração mais intensa em torno dos ovos do parasito, sugerindo a ocorrência do fenômeno de Splendore-Hoeppli, que pode estar associado à deposição extracelular de MBP presente nos grânulos específicos dos eosinófilos (KEPHART *et al.*, 1988) (Fig.56).

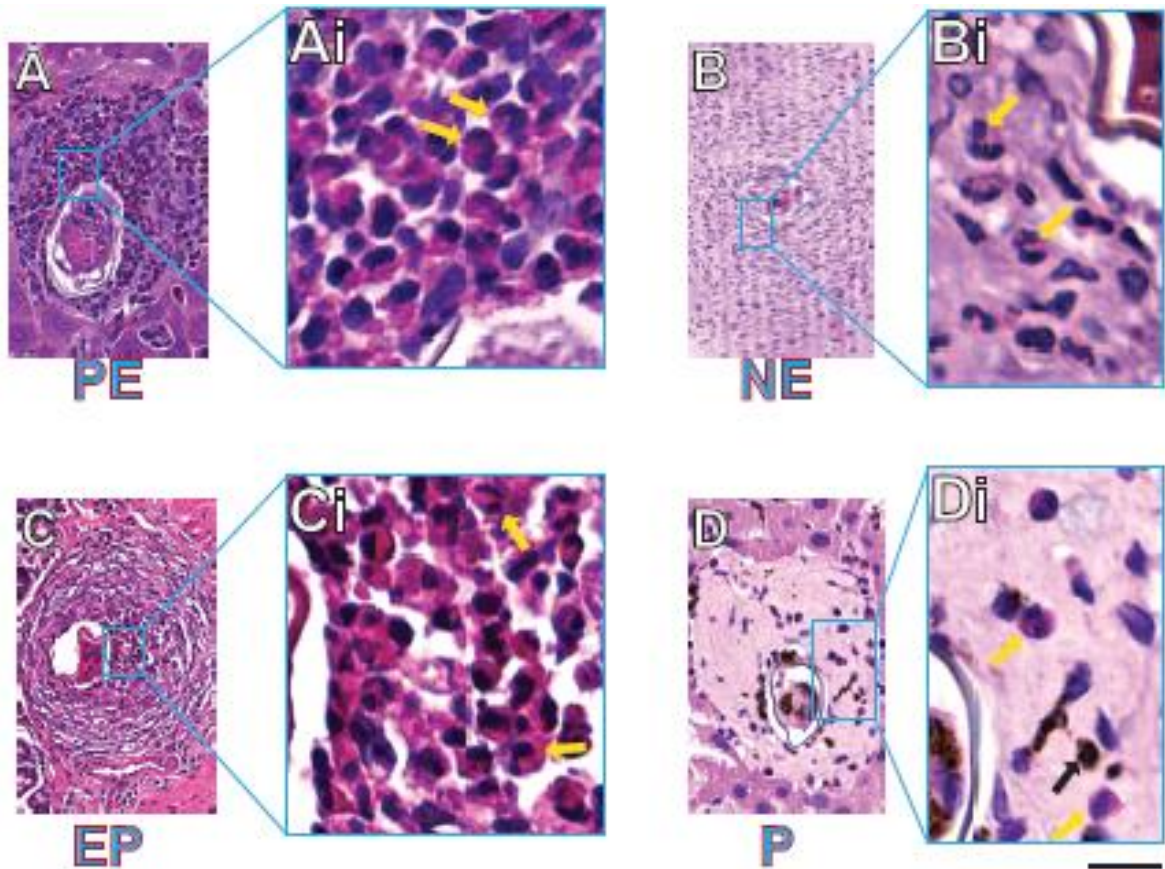


Figura 54: Imagens representativas da ocorrência de eosinófilos nas diversas fases evolutivas dos granulomas esquistossomóticos em *Nectomys squamipes* (A, C, D) e Swiss (B). Foram observados eosinófilos nas fases pré-granulomatosa exsudativa (A, PE), necrótico-exsudativa (B, NE), exsudativo-productiva (C, EP) e produtiva (D, P) de granulomas hepáticos e intestinais de *N. squamipes* e de camundongos Swiss (nas fases aguda e crônica). Note nos detalhes (Ai, Bi, Ci e Di), que os eosinófilos apresentam núcleo lobulado e grânulos eosinofílicos, corados em rosa pela eosina (setas). Os cortes histológicos foram corados com HE e as imagens foram capturadas em scanner de lâminas em campo claro. As análises quantitativas foram feitas com o uso do software Histoquant. Barra=50 μ m (A, B, C, D); 20 μ m (Ai, Bi, Ci, Di).

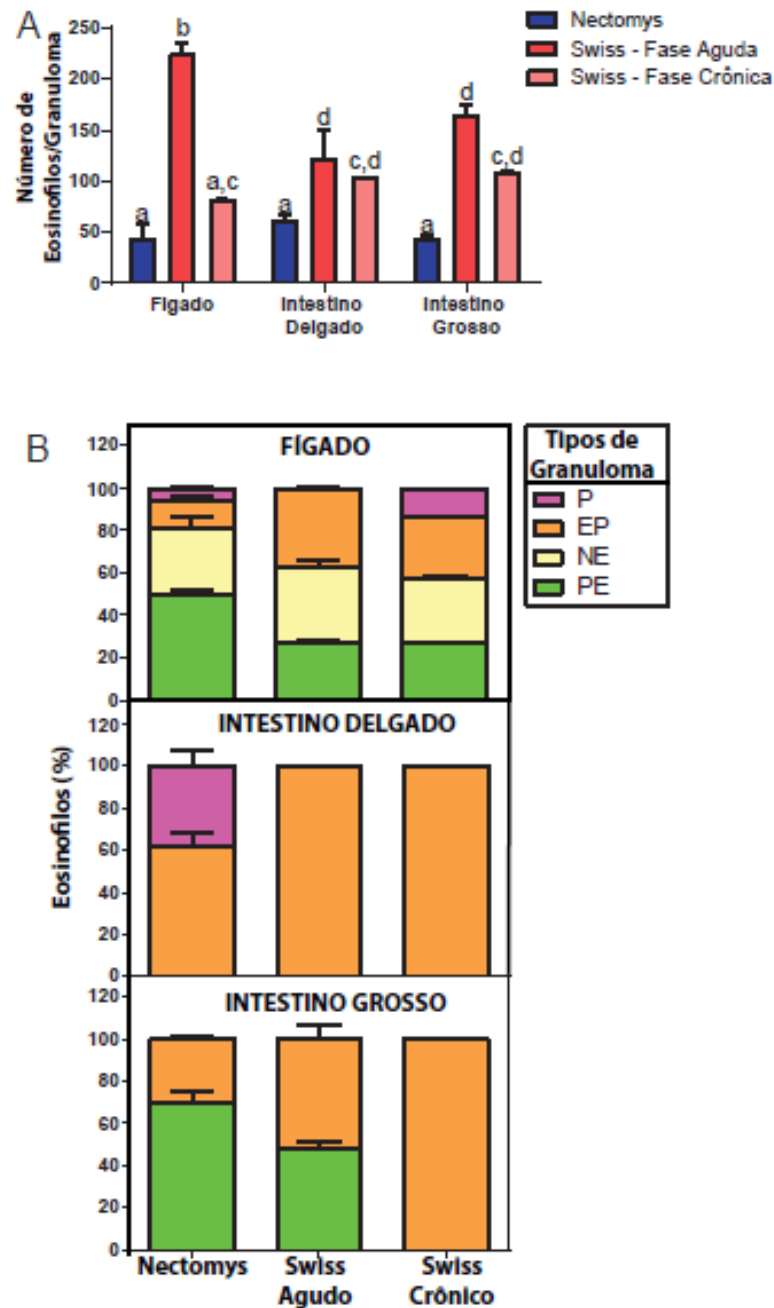


Figura 55: Quantificação e proporção dos eosinófilos nas diferentes fases evolutivas dos granulomas esquistossomóticos. Em (A), gráfico mostrando o número médio de eosinófilos por tipo de granuloma presente nos tecidos hepáticos e intestinais de *N. squamipes* e de camundongos Swiss, nas fases aguda e crônica. Observe em (B), as proporções destas células nas diferentes fases evolutivas dos granulomas. As quantificações dos eosinófilos foram realizadas utilizando o programa computacional Histoquant. Letras diferentes indicam diferenças significativas entre médias.

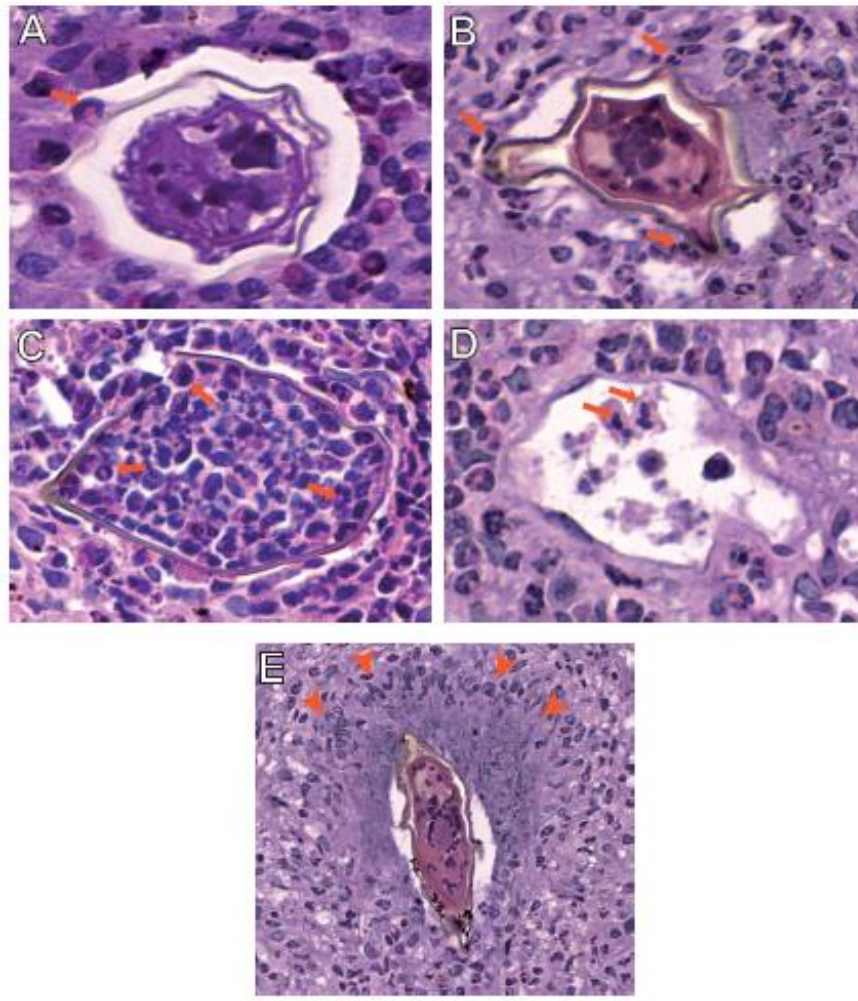


Figura 56: Presença de eosinófilos em granulomas de *Nectomys squamipes* e de camundongos Swiss infectados próximos aos ovos do parasito *Schistosoma mansoni*. As setas indicam eosinófilos aderidos às cascas de ovos do parasito (A, B) ou invadindo cascas de ovos vazias (C, D) em *N. squamipes* (A, C) e em camundongos Swiss (B, D). Observe em (E), coloração mais intensa em torno do ovo de *S. mansoni* (cabeças de setas), sugestiva de deposição de material granular, semelhante a observada no fenômeno de Splendori-Hoeppli, em granuloma presente no tecido hepático de camundongo Swiss. Secções de tecido hepático dos animais infectados foram coradas em HE, escaneadas em scanner de lâminas 3D Histech e analisadas com o uso do software Panoramic Viewer. Barra= 50 μ m (E); 25 μ m (A, B, C, D).

6. 3.1.2 Eosinófilos em relação à população geral das células do granuloma

Para calcular a proporção de eosinófilos em relação à população total das células do granuloma, foram selecionados granulomas hepáticos da fase evolutiva mais frequentemente encontrada em cada grupo experimental. Portanto, em *N. squamipes*, os granulomas mais frequentes foram os do tipo EP, no Swiss de fase aguda, foram os granulomas NE e, no Swiss de fase crônica, foram os granulomas EP (ver Capítulo 1, item 4.3.2). A quantificação destas células mostrou que os eosinófilos representaram $29,20 \pm 0,97\%$ (média \pm DP) das células presentes nos granulomas EP de *N. squamipes*, enquanto que, nos Swiss de fase aguda, os eosinófilos dos granulomas NE corresponderam a $60,60 \pm 1,42\%$ (média \pm DP) da população de células presentes neste tipo de granuloma. Nos camundongos Swiss de fase crônica, os eosinófilos constituíram $44,30 \pm 0,70\%$ (média \pm DP) das células dos granulomas EP. Como os tipos de granulomas mais frequentes tanto em *N. squamipes* quanto em Swiss de fase crônica foram os granulomas EP, foi possível realizar comparação entre estes grupos e a diferença encontrada foi estatisticamente significativa, ou seja, os granulomas EP de *N. squamipes* apresentaram proporção de eosinófilos significativamente menor do que a encontrada nos granulomas EP de Swiss de fase crônica (Fig.57, $p < 0.0001$).

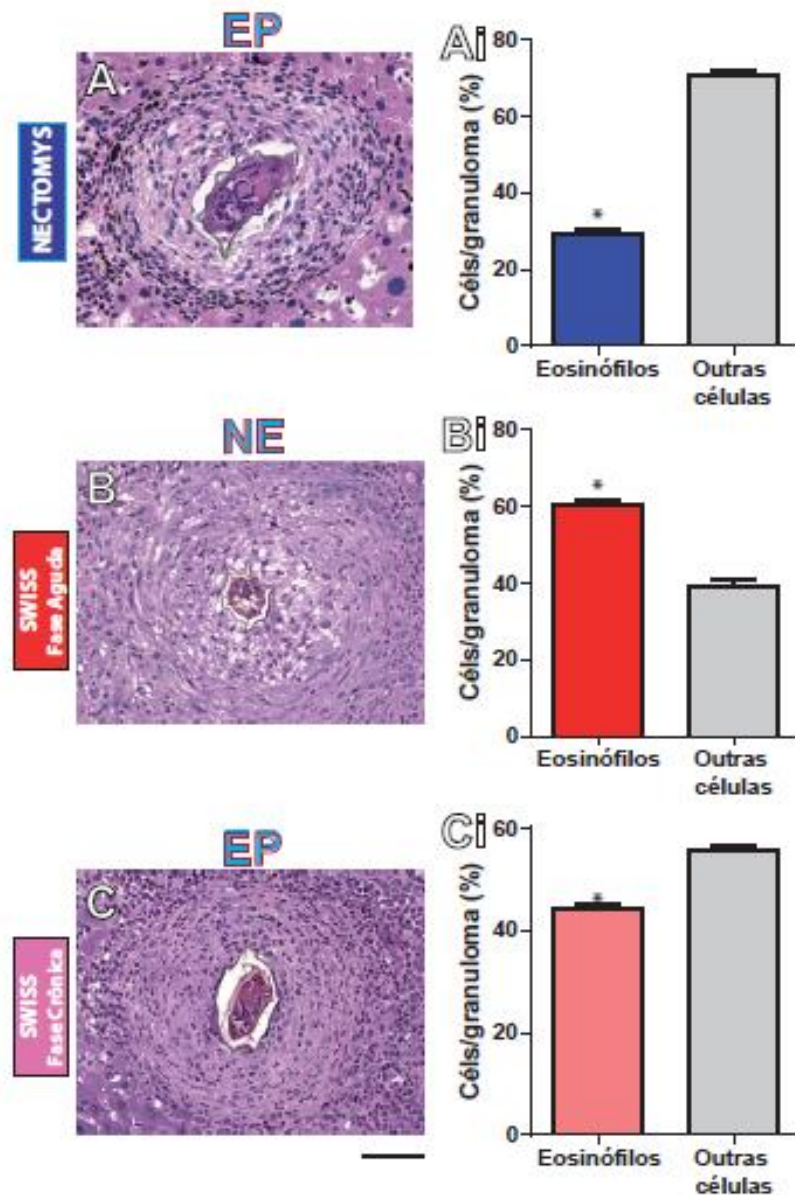


Figura 57: Proporção de eosinófilos em relação à população geral das células do granuloma. Em (A, B, C), observe imagens representativas dos granulomas mais predominantes em cada grupo experimental (*N. squamipes*: EP; Swiss de fase aguda: NE; Swiss de fase crônica: EP). Em (Ai, Bi, Ci), os gráficos mostram as proporções dos eosinófilos em relação às outras células presentes nos granulomas mais frequentes de cada grupo. Fragmentos de tecido hepático (n=3) de cada animal (n=3) foram processados para microscopia de luz e corados com HE. As imagens foram capturadas em scanner de lâminas 3D Histech e as quantificações dos eosinófilos e das demais células foram realizadas utilizando o programa computacional Histoquant. Três granulomas por fragmento foram selecionados aleatoriamente e um total de 100 células foi contado por granuloma. Barra= 50 μ m (A, B, C).

6.3.2 Análises Ultraestruturais dos Eosinófilos de *Nectomys squamipes* e de Swiss

Visto que não existem estudos na literatura sobre a ultraestrutura de eosinófilos de *N. squamipes*, este trabalho foi o primeiro a investigar, em detalhes, características ultraestruturais típicas de eosinófilos deste roedor infectado ou não com o parasito *S. mansoni*. As análises morfométricas dos eosinófilos de *N. squamipes* revelaram que o tamanho médio do eosinófilo do roedor infectado foi de $32,3 \pm 5,9 \mu\text{m}^2$ e do controle foi de $31,5 \pm 4,5 \mu\text{m}^2$ (média \pm DP). Adicionalmente, os grânulos presentes por eosinófilo foram contados, sendo que no *N. squamipes* infectado, foi encontrada uma média de $12,4 \pm 3,8$ grânulos por eosinófilo, enquanto no controle foi encontrada uma média de $7 \pm 2,8$ grânulos por eosinófilo (média \pm DP). O tamanho médio do grânulo do eosinófilo presente no roedor infectado foi de $0,344 \pm 0,136 \mu\text{m}^2$ e o do controle foi de $0,281 \pm 0,097 \mu\text{m}^2$ (média \pm DP).

Através das análises por microscopia eletrônica de transmissão (MET), foi possível observar que estas células apresentaram um núcleo predominantemente eucromático, com presença de heterocromatina próxima ao envoltório nuclear, sendo que, geralmente, foram observadas mais de uma área de núcleo, indicando que este pode ser bi ou polilobulado. Esta é uma característica típica de núcleos de eosinófilos maduros de humanos e de camundongos. Além disso, no citoplasma destas células, foram encontradas mitocôndrias, vesículas e grânulos.

Uma característica marcante observada na ultraestrutura dos eosinófilos de *N. squamipes* foi a presença de grânulos citoplasmáticos de forma arredondada ou alongada, com elétrons-densidades e tamanhos diferentes. Em várias células, inclusive, foi observada a polarização destes grânulos (ou seja, agrupamentos de grânulos em um dos polos da célula) (Fig.58). Estes eosinófilos foram observados em granulomas hepáticos ou intestinais de *N. squamipes* (Fig.59), assim como nos intestinos de animais não infectados pelo *S. mansoni* (Fig.60).

As análises ultraestruturais ainda revelaram a presença de grânulos citoplasmáticos em eosinófilos de *N. squamipes* em diferentes planos de corte (transversal, longitudinal, oblíquo). A partir destas observações, foi possível propor um modelo de grânulo para expressar sua morfologia e ultraestrutura distintas. Neste modelo, propusemos que o grânulo apresenta uma abertura em uma das extremidades e esta parece levar a uma rede de membranas formando compartimentos em seu interior. Inclusive, foram observados conteúdos

heterogêneos, sugerindo vesículas, com diferentes elétrondensidades. Estes compartimentos poderiam desempenhar papéis importantes no armazenamento e na secreção de várias moléculas envolvidas em diversas respostas imunes (Fig.61).

Em contrapartida, em camundongos Swiss não infectados, os eosinófilos maduros apresentaram como características ultraestruturais típicas, núcleos bi ou polilobulados e presença de grânulos específicos alongados contendo cristalóide elétron-denso, composto essencialmente por MBP e circundado por matriz elétron-lúcida (Fig.62). Por outro lado, nos camundongos Swiss infectados pelo parasito *S. mansoni*, foram observados grânulos com cores desfeitos, em processo de desgranulação por piecemeal (Fig.63). Trabalho recente realizado pelo grupo (DIAS, 2015), utilizando este modelo murino de esquistossomose mansônica experimental, revelou a ocorrência dos três mecanismos de secreção de eosinófilos nos locais de estimulação antigênica, com predominância da desgranulação por piecemeal. No caso dos eosinófilos de *N. squamipes* infectados, por causa da morfologia atípica de seus grânulos citoplasmáticos, não foi possível observar nenhum indício de processo de desgranulação nas secções celulares analisadas.

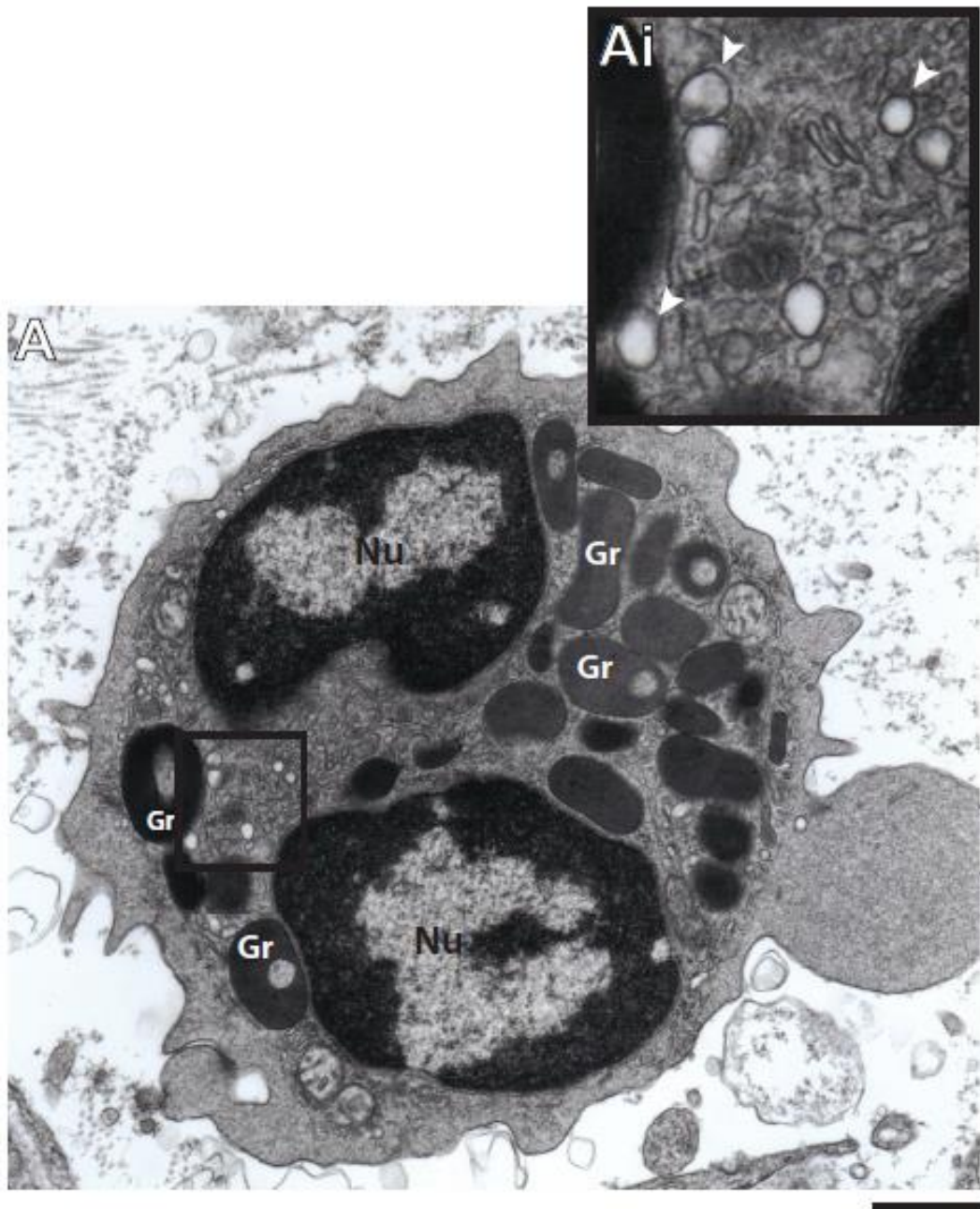


Figura 58: Ultraestrutura de eosinófilo de *Nectomys squamipes* infectado pelo parasito *Schistosoma mansoni*. Em (A), observe a presença de núcleo bilobulado (Nu), com heterocromatina perinuclear e uma população de grânulos citoplasmáticos grandes, arredondados ou alongados, alguns contendo estruturas de diferentes elétrons-densidades (Gr). A maioria dos grânulos encontra-se localizada num dos polos da célula. No detalhe (Ai), observe a presença de vesículas indicadas por cabeças de setas. Barra= 1,5 μ m (A); 650 nm (Ai).

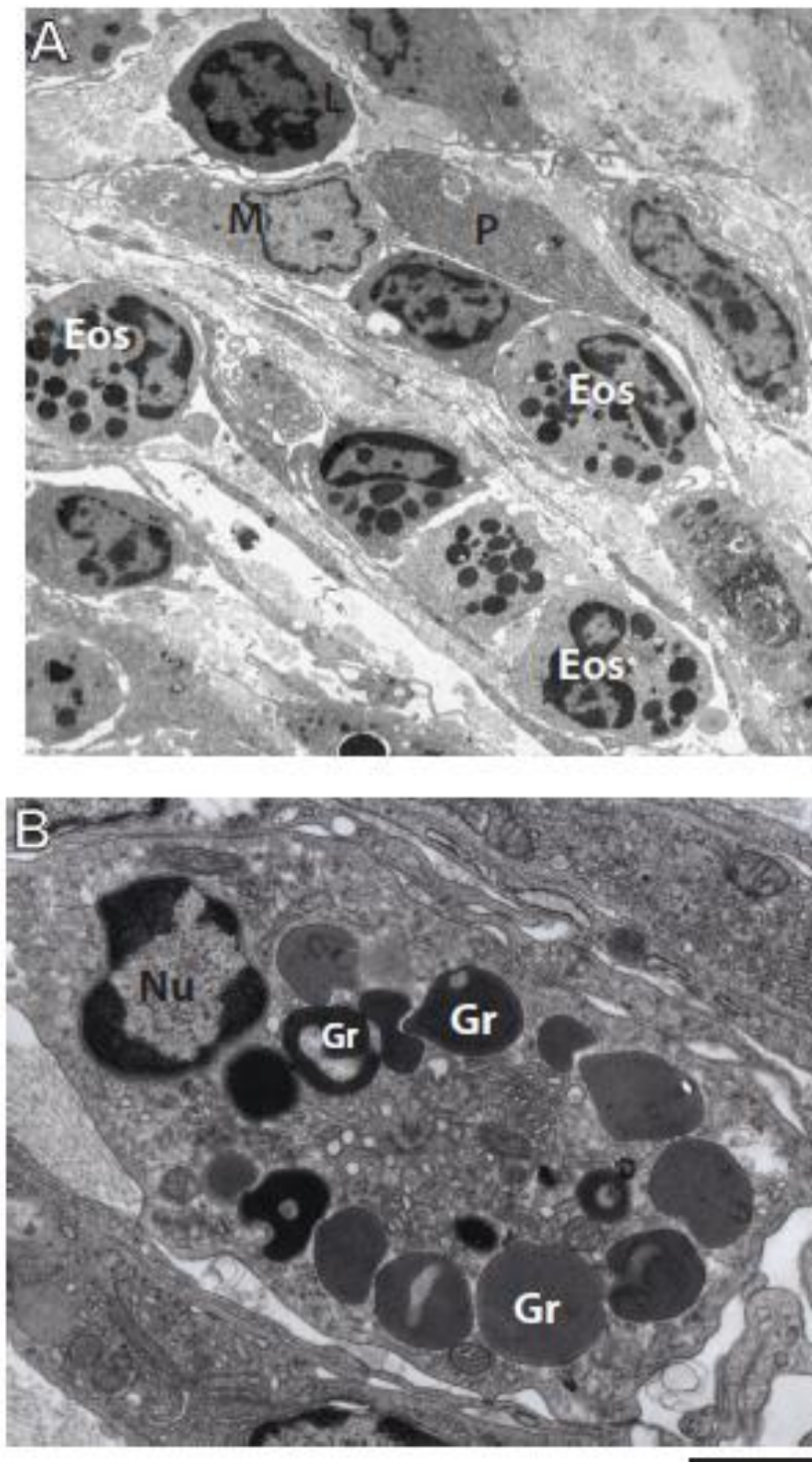


Figura 59: Aspectos ultraestruturais de granuloma e de eosinófilo de *Nectomys squamipes* infectado pelo parasito *Schistosoma mansoni*. Em (A), observe a disposição em fileiras das células presentes no granuloma esquistossomótico intestinal de *N. squamipes*. Nestas fileiras, é possível distinguir vários eosinófilos (Eos), além de outros tipos celulares, como plasmócitos (P), macrófagos (M) e linfócitos (L). Note em (B), eosinófilo do rato d'água, apresentando vários grânulos citoplasmáticos, com tamanhos e densidades diferentes. Barra=6 μm (A); 2 μm (B).

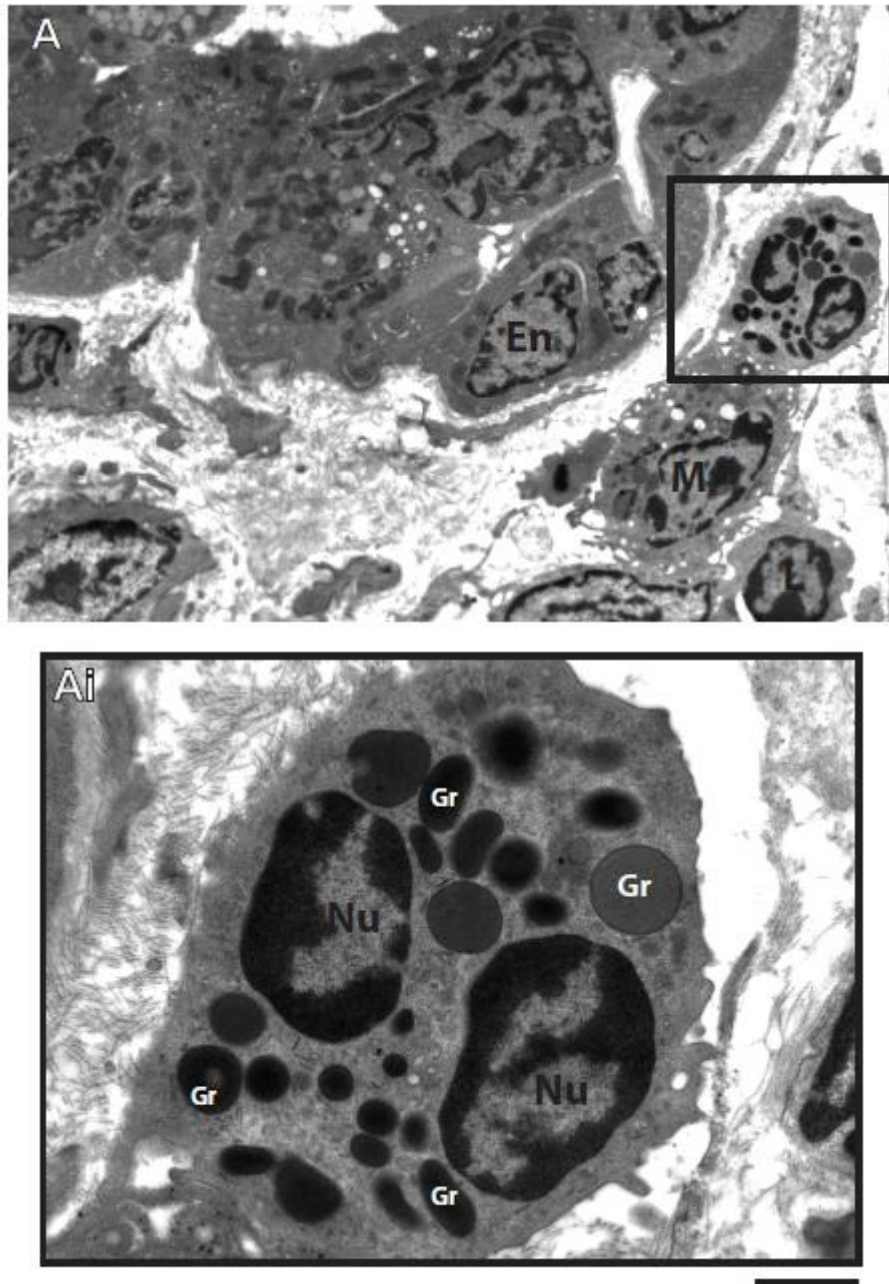


Figura 60: Ultraestrutura de eosinófilo de *Nectomys squamipes* não infectado pelo *Schistosoma mansoni* em tecido intestinal. Observe em (A), ultraestrutura do tecido intestinal de *N. squamipes*, apresentando enterócitos (En) e células residentes do sistema imune, como macrófagos (M) e eosinófilos (Box). Em (Ai), note ultraestrutura de eosinófilo de *N. squamipes* não infectado, apresentando morfologia similar a do eosinófilo encontrado em animal infectado. Destaque para os grandes grânulos (Gr) presentes no citoplasma da célula e para o núcleo (Nu) bilobulado. Barra= 4 μ m (A); 1,2 μ m (Ai).

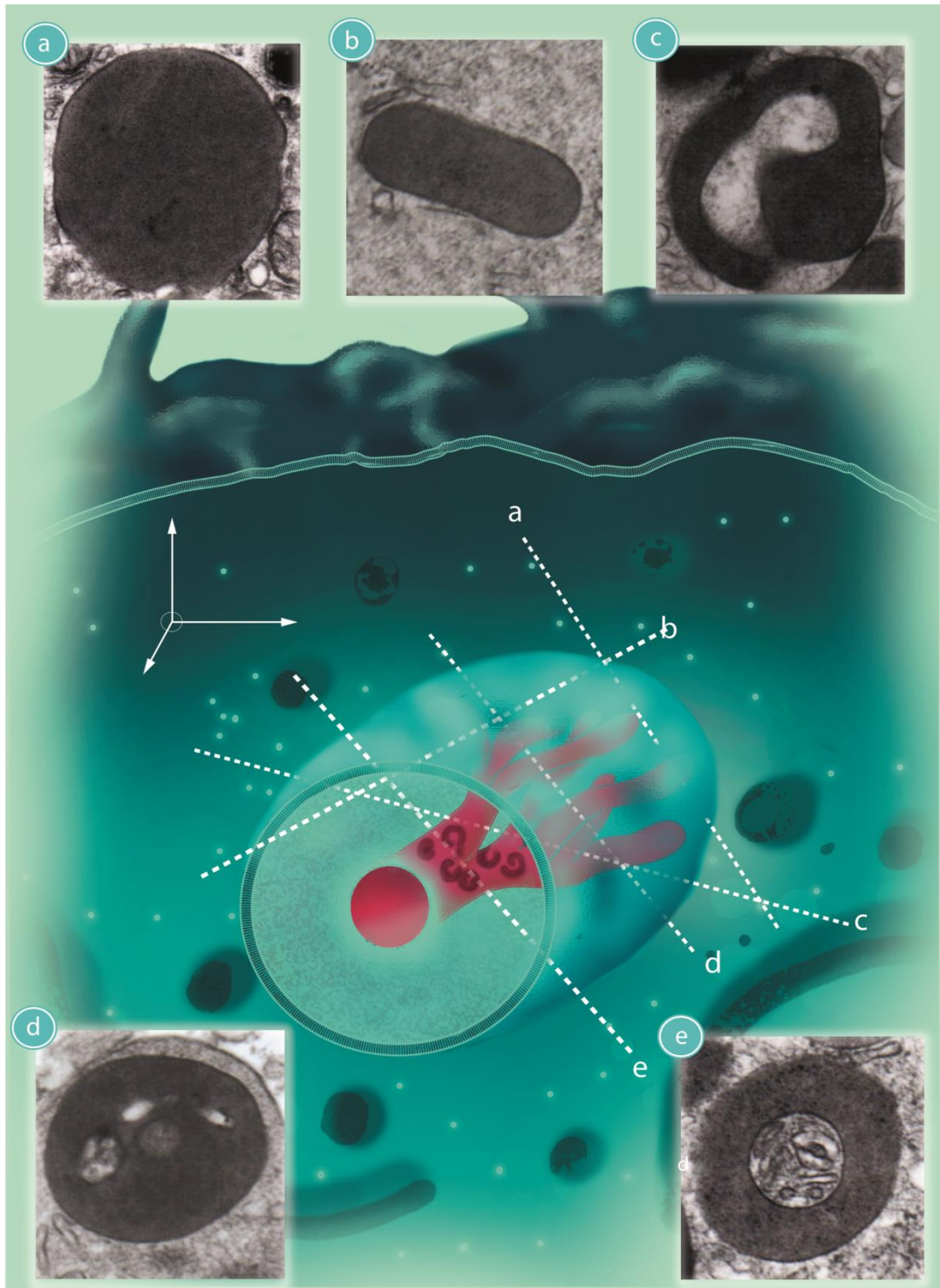


Figura 61: Modelo de grânulo de eosinófilo de *Nectomys squamipes*. Este modelo de grânulo foi proposto baseado em observações de diferentes secções celulares (n=65), que refletem planos de corte transversal (a, d, e), longitudinal (b) e oblíquo (c). O modelo apresenta uma rede de membranas internas (em vermelho), formando compartimentos intragranulares e, possivelmente, originando vesículas transportadoras. Em (a, b, c, d, e) observe as micrografias correspondentes aos eixos seccionais.

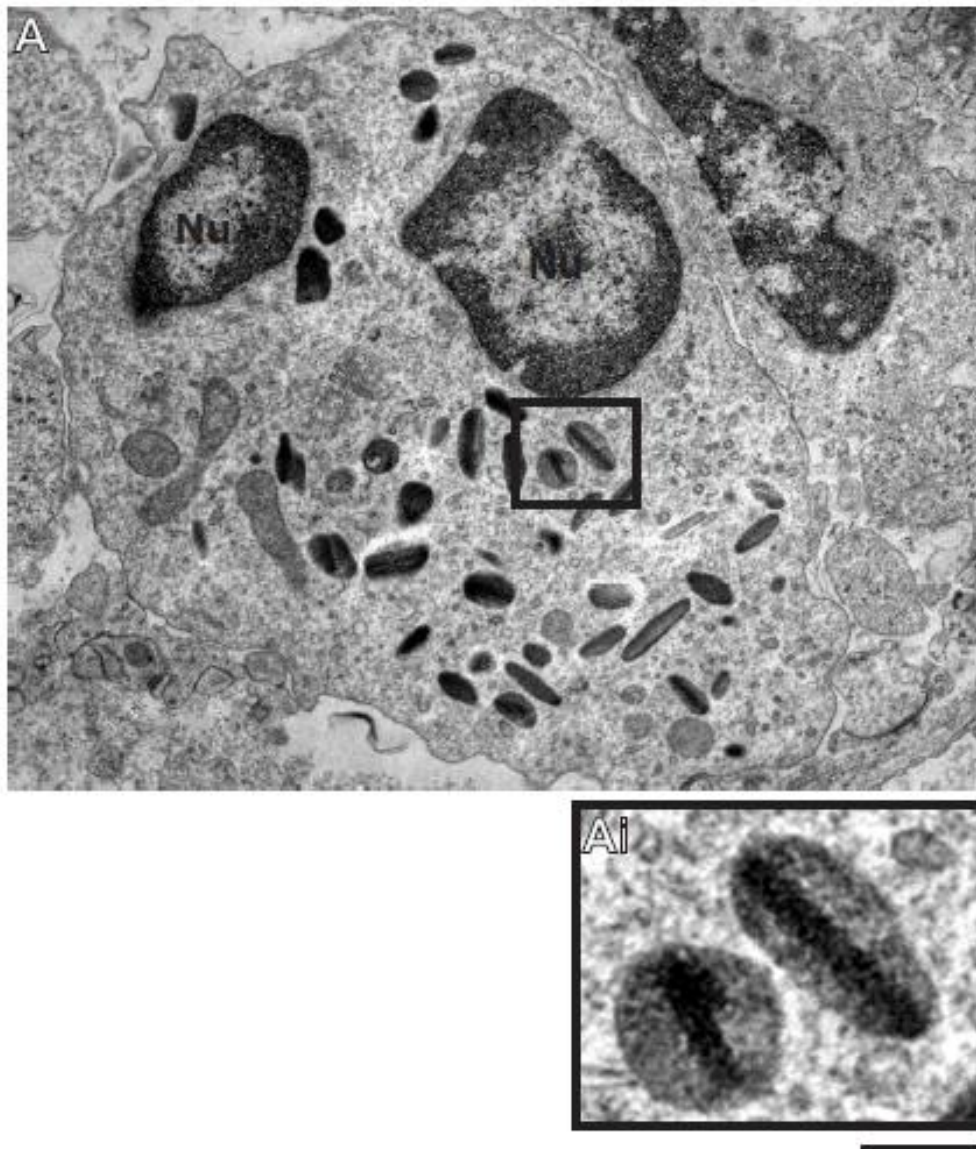


Figura 62: Ultraestrutura de eosinófilo de camundongo Swiss não infectado pelo *Schistosoma mansoni*. Em (A), eosinófilo presente no intestino do camundongo, apresentando morfologia típica, com núcleo bilobulado e numerosos grânulos secundários alongados, constituídos de core cristalino elétron-denso e matriz elétron-lúcida. No detalhe (Ai), observe, em maior ampliação, a morfologia típica dos grânulos. Barra= 2 μ m (A); 500 nm (Ai).



Figura 63: Ultraestrutura de eosinófilo de Swiss infectado com o parasito *Schistosoma mansoni*. Eosinófilo de tecido hepático de camundongo Swiss em processo de desgranulação por PMD (Piecemeal degranulation), caracterizada pela presença de grânulos sofrendo desestruturação do cristalóide (*) e aumento de volume. Barra=2 μ m.

6.4 DISCUSSÃO

6.4.1 Quantificação de Eosinófilos nos Granulomas por Microscopia de Luz

6.4.1.1 Eosinófilos nas fases evolutivas dos granulomas

A quantificação dos eosinófilos presentes nos granulomas hepáticos e intestinais de *N. squamipes* e de camundongos Swiss, nas fases aguda e crônica, mostrou que o Swiss de fase aguda apresentou um maior número destas células, indicando um recrutamento expressivo de eosinófilos durante a resposta inflamatória granulomatosa inicial na esquistossomose murina experimental. Em contrapartida, as médias mais baixas de eosinófilos por granuloma foram observadas em *N. squamipes*, cujos granulomas apresentaram-se menores e mais modulados.

A distribuição das proporções dos eosinófilos nos órgãos dos animais estudados demonstrou ampla participação destas células em todas as fases evolutivas da reação granulomatosa. Além disso, nossos dados indicaram uma participação expressiva dos eosinófilos principalmente no início da formação do granuloma hepático de *N. squamipes* (fase PE, Fig.55). Por outro lado, a maior proporção de eosinófilos encontrada em granulomas EP no intestino delgado de *N. squamipes* provavelmente se deve ao fato de que os granulomas P representam uma fase mais involutiva, com menor celularidade.

As imagens (A, B, C, D) apresentadas na figura 56, mostrando eosinófilos invadindo ovos do parasito *S. mansoni*, tanto em *N. squamipes* quanto em camundongos Swiss, indicam um envolvimento ativo destas células na resposta imune durante a esquistossomose mansônica. Ainda não se sabe precisamente como estas células atuam, pois, além de seus efeitos tóxicos diretos sobre vermes e tecidos, as proteínas granulares eosinofílicas atuam regulando a inflamação do tecido através da ativação de várias células do sistema imune (ALLEN e MAIZELS, 2011). A presença de granulomas hepáticos com uma coloração mais acentuada em torno dos ovos do parasito (Fig.56E), sugerindo a ocorrência do fenômeno de Splendore-Hoeppli (KEPHART *et al.*, 1988), somente foi observada em camundongos Swiss experimentalmente infectados. Em *N. squamipes*, estes possíveis depósitos extracelulares de MBP granular não foram observados.

6.4.1.2 Eosinófilos em relação à população geral das células do granuloma

Para conhecer a participação dos eosinófilos na composição dos granulomas hepáticos de *N. squamipes* e de Swiss (fases aguda e crônica), foi realizado o cálculo da proporção de eosinófilos em relação ao restante das células que compõem os granulomas, nos granulomas mais frequentemente encontrados em cada grupo experimental. Desta forma, obtivemos proporções de eosinófilos representativas de cada grupo estudado. Nos granulomas NE, mais prevalentes nos Swiss de fase aguda, os eosinófilos constituíram acima de 60% das células do granuloma, corroborando os dados da literatura que mostram que estas células são participantes ativos da reação granulomatosa inflamatória de fase aguda da esquistossomose mansônica (LAMBERTUCCI, 2010).

No caso do Swiss de fase crônica, o granuloma mais predominante foi o granuloma EP, visto que, nesta fase da infecção, ocorre uma imunomodulação que produz diminuição do influxo de células para o local de estimulação antigênica e, concomitantemente, produz granulomas menores e mais fibróticos. Assim, foi encontrada uma proporção em torno de 44% de eosinófilos nos granulomas EP.

De modo semelhante ao Swiss crônico, em *N. squamipes*, os granulomas mais representativos foram os granulomas EP; porém, nestes roedores silvestres, a participação dos eosinófilos foi menor do que a encontrada no Swiss, ou seja, em torno de 29%.

6.4.2 Análises Ultraestruturais dos Eosinófilos de *Nectomys squamipes* e de Swiss

A identificação dos grânulos secundários em eosinófilos humanos e murinos é baseada principalmente na microscopia eletrônica, que mostra a presença de um core cristalino elétron-denso, rodeado por uma matriz elétron-lúcida. Este core é formado predominantemente pela proteína catiônica MBP-1 (MELO *et al.*, 2008).

A análise de micrografias de eosinófilos retirados da cavidade peritoneal de camundongos Knockout para MBP-1 revelou grânulos eosinofílicos desprovidos de cristalóide. Esta observação, feita por DENZLER *et al.* (2000) mostrou que a formação do core dos grânulos é dependente da presença de MBP-1. Estes grânulos, observados no referido estudo, são morfológicamente muito semelhantes aos grânulos encontrados em *N. squamipes*, o que nos faz especular sobre a

possibilidade dos grânulos de *N. squamipes* não conterem MBP-1. Assim, a morfologia única dos grânulos dos eosinófilos de *N. squamipes* poderia ser devida à pro-MBP que não foi convertida em MBP, justificando a ausência do cristalóide nos grânulos.

Estudos posteriores deverão ser realizados para investigar esta característica intrigante dos grânulos citoplasmáticos dos eosinófilos de *N. squamipes*, como investigações relacionadas ao genoma do rato d'água, para verificar se este animal não apresenta o gene que codifica a enzima responsável pela formação da MBP, ou se este animal possui alguma proteína que silencia este gene. Outra possibilidade seria a realização de imunomarcção ultraestrutural para pro-MBP ou para MBP, numa tentativa de conhecer a composição química destes grânulos morfológicamente tão diversos.

A proposição de um modelo para representar o grânulo do eosinófilo do rato d'água teve o propósito de tentar elucidar morfológicamente sua estrutura tridimensional. Será que esta morfologia tão distinta não teria relação com a adaptação ao parasitismo apresentada por estes roedores silvestres? Investigações futuras poderão elucidar esta e outras questões relevantes acerca da morfologia e das funções destas células nas infecções parasitárias e em outros processos patológicos ou fisiológicos em que estejam envolvidas.

Curiosamente, observamos um influxo de eosinófilos de *N. squamipes* para os locais de estimulação antigênica nos animais infectados pelo *S. mansoni*, porém, pelas características morfológicas apresentadas, podemos dizer que estas células não se encontram ativadas. Inclusive, os eosinófilos presentes nos granulomas são morfológicamente similares aos eosinófilos de *N. squamipes* presentes nos animais não infectados. Por outro lado, em camundongos swiss infectados experimentalmente com o *Schistosoma mansoni*, observou-se que a PMD foi o principal mecanismo encontrado de desgranulação dos eosinófilos, apresentando aspectos ultraestruturais bem diversos dos apresentados pelas células não ativadas, presentes nos animais não infectados.

6.5 CONCLUSÕES

- Os eosinófilos apresentaram uma importante participação na formação dos granulomas nos três grupos estudados, principalmente nos camundongos Swiss de fase aguda;
- As análises ultraestruturais revelaram semelhanças morfológicas entre os eosinófilos de *N. squamipes* e de camundongos Swiss, porém também foram encontradas algumas características distintas, como os grânulos citoplasmáticos;
- Estas características dos grânulos dos eosinófilos de *N. squamipes* ainda não haviam sido documentadas e podem indicar um papel funcional na modulação da resposta imune contra a infecção pelo *S. mansoni*. Investigações futuras serão necessárias para avaliar melhor o eosinófilo deste roedor;
- O presente estudo colaborou para ampliar a compreensão sobre o eosinófilo. Trabalhos do grupo vem analisando diferentes parâmetros morfológicos e funcionais dos eosinófilos em diferentes modelos de infecção experimental. Este estudo reforçou a importância do entendimento do papel do eosinófilo em modelos naturais de infecção;
- O melhor entendimento sobre os aspectos morfológicos e os relacionados à dinâmica da participação dos eosinófilos durante a infecção natural em reservatórios silvestres pode trazer novos insights sobre a resposta imune envolvida na infecção esquistossomótica, além de elucidar questões relacionadas à adaptação ao parasitismo pelo *N. squamipes*.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram comparados vários parâmetros de uma infecção parasitária em um roedor silvestre naturalmente infectado, habituado a múltiplas reinfecções causadas pelo parasito *Schistosoma mansoni*, e que vem sendo exposto a este parasito por pelo menos quatro séculos (quando da introdução do *S. mansoni* no Brasil, com o tráfico de escravos africanos parasitados), com os de um roedor de laboratório, experimentalmente infectado e que não passou por nenhum processo de adaptação evolutiva em relação a este parasito.

Assim, deve-se refletir sobre o fato de que, ao comparar estes dois modelos de infecção tão diversos (*Nectomys squamipes* – *S. mansoni*, cepa simpátrica; camundongo Swiss – *S. mansoni*, cepa LE/BH), torna-se extremamente relevante considerar a questão da adaptação evolutiva na interpretação das análises. Anos de relação parasito-hospedeiro parecem ter dado uma vantagem evolutiva ao roedor silvestre, no sentido de lidar melhor com o parasitismo pelo *S. mansoni*.

Sabe-se que o *N. squamipes* é um dos principais hospedeiros naturais do *S. mansoni* no Brasil. Isto é devido principalmente à sua suscetibilidade, hábitos semi-aquáticos, habitats peridomiciliares e também à sobreposição de sua distribuição geográfica em áreas endêmicas de esquistossomose humana, garantindo seu contato frequente com o parasito (MALDONADO JR. *et al.*, 1994; D'ANDREA, 1999; D'ANDREA *et al.*, 2000; GENTILE *et al.*, 2006; GENTILE *et al.*, 2012).

No rato d'água naturalmente infectado, a reação inflamatória granulomatosa observada no fígado foi considerada extremamente branda, quando comparada com a reação inflamatória observada no fígado do camundongo Swiss experimentalmente infectado na fase aguda da doença e, mesmo em relação ao Swiss de fase crônica (ver dados referentes ao comprometimento tecidual dos animais no Capítulo 1, item 3.3). Além disso, as dosagens bioquímicas das transaminases hepáticas não apresentaram alterações entre *N. squamipes* infectados e não infectados, demonstrando que a infecção esquistossomótica não gerou danos teciduais expressivos neste hospedeiro, ao contrário do observado nos camundongos Swiss nas fases aguda e crônica da infecção (ver Capítulo 1, item 3.5.2).

De fato, nossos dados, em conjunto, apontam para um provável processo de adaptação evolutiva, que vem ocorrendo entre este hospedeiro e o parasito *S. mansoni*, levando este roedor a lidar mais eficazmente com a infecção parasitária, encontrando mecanismos para manutenção de sua homeostase, de forma a não apresentar comprometimento hepático significativo (SILVA e ANDRADE, 1989; MACHADO-SILVA *et al.*, 1994).

Adicionalmente, quando observamos a esteatose hepática presente em *N. squamipes* infectado ou não com o parasito *S. mansoni* e comparamos com um modelo de infecção experimental, onde também foi observado o desenvolvimento de esteatose hepática (ainda que em grau muito menor), a questão da coevolução entre parasitos e hospedeiros emerge novamente.

Um possível mecanismo através do qual o rato d'água pode ter se utilizado para se adaptar ao parasitismo pelo *S. mansoni* seria o metabolismo lipídico. Ao armazenar grande quantidade de CLs nos hepatócitos, decorrente de uma dieta mais abundante, a regeneração hepática necessária para sanar os danos decorrentes da reação inflamatória granulomatosa estaria assegurada, pelo maior fornecimento de energia para a divisão celular. Outro ponto interessante é que mesmo nos *N. squamipes* controles, os hepatócitos foram encontrados cheios de CLs, ou seja, os animais vivendo no meio silvestre já estariam previamente preparados para um provável parasitismo pelo *S. mansoni*, corroborando a hipótese de uma adaptação evolutiva bem estabelecida de seus organismos para lidar com a infecção esquistossomótica.

Através das análises por espectroscopia Raman, a esteatose desenvolvida nestes animais foi considerada uma esteatose benéfica, visto que, tanto em *N. squamipes* infectados quanto nos não infectados, foi encontrado um maior grau de insaturação no tecido hepático. Já é sabido que os ácidos graxos insaturados promovem uma esteatose capaz de minimizar os efeitos tóxicos causados pelo excesso de ácidos graxos saturados no fígado (WANG *et al.*, 2006).

Dentre os vários mecanismos de adaptação possíveis, provavelmente estes animais utilizaram-se da dieta para gerar uma esteatose hepática que minimizasse os danos causados pelo parasitismo. Em *N. squamipes*, é possível que seus hábitos alimentares produzam uma esteatose hepática com implicações relevantes na relação parasito-hospedeiro, contribuindo para o processo de adaptação deste roedor ao parasitismo pelo *S. mansoni*.

Finalmente, as análises ultraestruturais dos eosinófilos de *N. squamipes* revelaram aspectos morfológicos intrigantes destas células. Uma característica marcante dos eosinófilos de mamíferos e mesmo de outras classes de animais é a presença de grânulos secretores citoplasmáticos, contendo uma estrutura cristalóide elétron-densa, rica em MBP, circundada por uma matriz elétron-lúcida (Muniz *et al.*, 2012). Curiosamente, nos eosinófilos do rato d'água, os grânulos citoplasmáticos são grandes, arredondados ou alongados, alguns contendo estruturas internas com elétrons-densidades diferentes, porém desprovidos de cristalóide. Este achado se mostrou desafiador, à medida que análises mais aprofundadas deverão ser realizadas buscando a compreensão deste aspecto tão distinto destas células.

8 REFERÊNCIAS

- ABATH, F.G.; MORAIS, C.N.; MONTENEGRO, C.E.; WYNN, T.A.; MONTENEGRO, S.M. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends in Parasitology**, v. 22, p. 85-91, 2006.
- ABDUL-GHANI, R.A.; HASSAN, A.A. Murine schistosomiasis as a model for human schistosomiasis mansoni: similarities and discrepancies. **Parasitology Research**, v. 107, p. 1-8, 2010.
- ABRAMCZYK, H.; SURMACKI, J.; KOPEĆ, M.; OLEJNIK, A.K.; LUBECKA-PIETRUSZEWSKA, K; FABIANOWSKA-MAJEWSKA, K. The role of lipid droplets and adipocytes in cancer. Raman imaging of cell cultures: MCF10A, MCF7, and MDA-MB-231 compared to adipocytes in cancerous human breast tissue. **Analyst**, v. 140, p. 2224-2235, 2015.
- ACEVES, S.S.; NEWBURY, R.O.; DOHIL, R.; BASTIAN, J.F.; BROIDE, D.H. Esophageal remodeling in pediatric eosinophilic esophagitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 206-212, 2007.
- ACKERMAN, S.J.; KEPHART, G.M.; FRANCIS, H.; AWADZI, K.; GLEICH, G.J.; OTTESEN, E.A. Eosinophil degranulation: an immunologic determinant in the pathogenesis of the Mazzotti Reaction in human onchocerciasis. **The Journal of Immunology**, v. 144, p. 3961-3969, 1990.
- ACKERMAN, S.J., LIU, L., KWATIA, M.A. Charcot–Leyden crystal protein (galectin-10) is not a dual function galectin with lysophospholipase activity but binds a lysophospholipase inhibitor in a novel structural fashion. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, p. 14859-14868, 2002.
- AGOSTI, J.M.; ALTMAN, L.C.; AYARS, G.H.; LOEGERING, D.A.; GLEICH, G.J.; KLEBANOFF, S.J. The injurious effect of eosinophil peroxidase, hydrogen peroxide, and halides on pneumocytes in vitro. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 79, p. 496-504, 1987.
- AHLSTROM-EMANUELSSON, C.A.; GREIFF, L.; ANDERSSON, M.; PERSSON, C.G.; ERJEFÄLT, J.S. Eosinophil degranulation status in allergic rhinitis: observations before and during seasonal allergen exposure. **European Respiratory Journal**, v. 24, p. 750-757, 2004.
- AKUTOTA, P.; WANG, H.B.; SPENCER, L.A.; WELLER, P.F. Immunoregulatory roles of eosinophils: a new look at a familiar cell. **Clinical and experimental Allergy**, v. 38, n. 8, p. 1254-1263, 2008.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. 2008. **Molecular Biology of the Cell**. New York and Abingdon: Garland Science. p. 799-809.
- ALLEN, J.E.; MAIZELS, R.M. Diversity and dialogue in immunity to helminths. **Nature Reviews in Immunology**, v. 11, p. 375-388, 2011.

ALVAREZ, Y.; VALERA, I.; MUNICIO, C.; HUGO, E.; PADRON, F.; BLANCO, L.; RODRIGUEZ, M.; FERNANDEZ, N.; CRESPO, M. S. Eicosanoids in the innate immune response: TLR and non-TLR routes. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, 201929, 2010.

AMORIM, J.P. Infestação experimental e natural de murídeos pelo *Schistosoma mansoni* (nota prévia). **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 5, p. 219-222, 1953.

ANDRADE DE SOUZA, M.A.; LANE DE MELO, A. (2012). Ecological Aspects of *Biomphalaria* in Endemic Areas for Schistosomiasis in Brazil. In: **Schistosomiasis**, Prof. Mohammad Bagher Rokni (Ed.), ISBN: 978-953-307-852-6, InTech, doi: 10.5772/26822. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/schistosomiasis/ecological-aspects-of-biomphalaria-in-endemic-areas-for-schistosomiasis-in-brazil>. Acesso em: 16 out. 2015.

ANDRADE, Z.A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, v. 31, p. 656-663, 2009.

ANGELI, V.; FAVEEUW, C.; ROYE, O.; FONTAINE, J.; TEISSIER, E.; CAPRON, A.; WOLOWCZUK, I.; CAPRON, M.; TROTTEIN, F. Role of the parasite-derived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 193, p. 1135-1147, 2001.

ANTHONY, B.; ALLEN, J.T.; LI, Y.S.; MCMANUS, D.P. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 60, 2010.

ANTUNES, C.M.F.; MILWARD-DE-ANDRADE, R.; KATZ, N.; COELHO, P.M.Z. Contribuição para o conhecimento do papel do «rato lava-pés», *Nectomys squamipes squamipes* na epidemiologia da esquistossomose mansoni (Rodentia: Cricetidae). **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 23, p. 203-204, 1971.

BABU, S.; BLAUVELT, C.P.; KUMARASWAMI, V.; NUTMAN, T.B. Regulatory networks induced by live parasites impair both Th1 and Th2 pathways in patent lymphatic filariasis: implications for parasite persistence. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. 3248-3256, 2006.

BAFFY, G. Kupffer cells in non-alcoholic fatty liver disease: The emerging view. **Journal of Hepatology**, v. 51, n. 1, p. 212-223, 2009.

BANDEIRA-MELO, C.; PHOOFULO, M.; WELLER, P.F. Extranuclear Lipid Bodies Elicited by CCR3-mediated Signaling Pathways Are the Sites of Chemokine-enhanced Leukotriene C4 Production in Eosinophils and Basophils. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 25, p. 22779-22787, 2001.

BANDEIRA-MELO, C.; SUGIYAMA, K.; WOODS, L.J.; WELLER, P.F. Cutting edge: eotaxin elicits rapid vesicular transport-mediated release of preformed IL-4 from human eosinophils. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 4813-4817, 2001.

BARANSKA, M. Optical Spectroscopy and Computational Methods in Biology and Medicine. 540. (Springer Dordrecht Heidelberg New York London, 2014).

BERGALLO, H.G.; MAGNUSSON, W.E. Factors affecting the use of space by two rodent species in Brazilian Atlantic Forest. **Mammalia**, v. 68, p. 121-232, 2004.

BERGQUIST, N.R. Present aspects of immunodiagnosis of schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 4, p. 29-38, 1992.

BERNARDIS, L.L.; PATTERSON, B.D. Correlation between 'lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. **Journal of Endocrinology**, v. 40, p. 527-528, 1968.

BICA, I.; HAMER, D.H.; STADECKER, M.J. Hepatic Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 14, n. 2, p. 583-604, 2000.

BINA, J.C.; PRATA, A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I – Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 211-216, 2003.

BLACK, C.L.; MWINZI, P.N.M.; MUOK, E.M.O.; ABUDHO, B.; FITZSIMMONS, C.M.; DUNNE, D.W.; KARANJA, D.M.S.; SECOR, W.E.; COLLEY, D.G. Influence of Exposure History on the Immunology and Development of Resistance to Human Schistosomiasis Mansoni. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, e637, 2010.

BODEN, G.; SHE, P.; MOZZOLI, M.; CHEUNG, P.; GUMIREDDY, K.; REDDY, P.; XIANG, X.; LUO, Z.; RUDERMAN, N. Free fatty acids produce insulin resistance and activate the proinflammatory nuclear factor- κ β pathway in rat liver. **Diabetes**, v. 54, n. 12, p. 3458-3465, 2005.

BONECKER, S.T.; PORTUGAL, L.G.; COSTA-NETO, S.F.; GENTILE, R. A long term study of small mammal populations in a Brazilian agricultural landscape. **Mammalian Biology**, v. 74, p. 467-477, 2009.

BONJOUR, K. **Mecanismos de secreção de eosinófilos murinos em resposta a estímulos inflamatórios e à asma experimental**. 2015. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, 102 p., Rio de Janeiro, Brasil.

BONVICINO, C.R.; OLIVEIRA, J.A.; D'ANDREA, P.S. (2008). Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros, baseadas em caracteres externos. Centro Pan-americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS, 120 p., Rio de Janeiro, Brasil.

BOZZA, P.T.; PAYNE, J.L.; MORHAM, S.G.; LANGENBACH, R.; SMITHIES, O.; WELLER, P.F. Leukocyte lipid body formation and eicosanoid generation:

cyclooxygenase-independent inhibition by aspirin. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 93, p. 11091-11096, 1996.

BOZZA, P.T.; PAYNE, J.L.; GOULET, J.K.; WELLER, P.F. Mechanisms of Platelet-activating Factor-induced Lipid Body Formation: Requisite Roles for 5-Lipoxygenase and *De Novo* Protein Synthesis in the Compartmentalization of Neutrophil Lipids. **Journal of Experimental Medicine**, v. 183, p. 1515-1525, 1996a.

BOZZA, P.T.; YU, W.; PENROSE, J.F.; MORGAN, E.S.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Eosinophil Lipid Bodies: Specific, Inducible Intracellular Sites for Enhanced Eicosanoid Formation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 186, n. 6, p. 909-920, 1997.

BOZZA, P.T.; BANDEIRA-MELO, C. Mechanisms of leukocyte lipid body formation and function in inflammation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 1, p. 113-120, 2005.

BOZZA, P.T.; MELO, R.C.N.; BANDEIRA-MELO, C. Leukocyte lipid bodies regulation and function: Contribution to allergy and host defense. **Pharmacology & Therapeutics**, v.113, p. 30-49, 2007.

BOZZA, P.T.; MAGALHÃES, K.G.; WELLER, P.F. Leukocyte lipid bodies - biogenesis and functions in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 6, p. 540-551, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. 2ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 177p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2009. 816 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Situação epidemiológica da esquistossomose no Brasil**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 18p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansonii: Diretrizes Técnicas**. 4ª edição. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 144 p.

BRASAEMLE, D.L.; RUBIN, B.; HARTEN, I.A.; GRUIA-GRAYI, J.; KIMMELI, A.R.; LONDOS, C. Perilipin A Increases Triacylglycerol Storage by Decreasing the Rate of Triacylglycerol Hydrolysis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 49, p. 38486-38493, 2000.

BRASAEMLE, D.L.; DOLIOS, G.; SHAPIRO, L.; WANG, R. Proteomic Analysis of Proteins Associated with Lipid Droplets of Basal and Lipolytically Stimulated 3T3-L1

Adipocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 45, p. 46835-46842, 2004.

BRATTIG, N.W.; TISCHENDORF, F.W.; STROTE, G.; MEDINA DE LA GARZA, C.E. Eosinophil-larval-interaction in onchocerciasis: heterogeneity of in vitro adherence of eosinophils to infective third and fourth stage larvae and microfilariae of *Onchocerca volvulus*. **Parasite Immunology**, v. 13, p. 13-22, 1991.

BRINDLEY, P.J. The molecular biology of schistosomes. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 11, p. 533-536, 2005.

BRO, R.; SMILDE, A.K. Principal component analysis. **Analytical Methods**, v. 6, p. 2812-2831, 2014.

BRUNET, L.R.; SABIN, E.A.; CHEEVER, A.W.; KOPF, M.A.; PEARCE, E.J. Interleukin-5 (IL-5) is not required for expression of a Th2 response of host resistance mechanisms during murine schistosomiasis mansoni but does play a role in development of IL-4 producing non-T non-B cells. **Infection and Immunity**, v. 67, p. 3014-3018, 1999.

BRUNT, E.M. Histopathology of non-alcoholic fatty liver disease. **Clinics in Liver Disease**, v. 13, n. 4, p. 533-544, 2009.

BUEDING, E. Carbohydrate metabolism of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of General Physiology**, v. 33, p. 475-495, 1950.

BULLOCK, E.D.; JOHNSON E.M. Nerve growth factor induces the expression of certain cytokine genes and bcl-2 in mast cells. Potential role in survival promotion. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 27500-27508, 1996.

CARMO, L.A.S.; DIAS, F.F.; MALTA, K.K.; AMARAL, K.B.; SHAMRI, R.; WELLER, P.F.; MELO, R.C.N. Expression and subcellular localization of the Qa-SNARE syntaxin17 in human eosinophils. **Experimental Cell Research**, v. 337, p. 129-135, 2015.

CAROD ARTAL, F.J. Neurological complications of *Schistosoma* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 107-116, 2008.

CARUSO, R.A.; IENI, A.; FEDELE, F.; ZUCCALA, V.; RICCARDO, M.; PARISI, E. Degranulation patterns of eosinophils in advanced gastric carcinoma: an electron microscopic study. **Ultrastructural Pathology**, v. 29, p. 29-36, 2005.

CARVALHO, D.M. **Sobre a importância de *Nectomys squamipes* na epidemiologia da esquistossomose mansônica no município de Sumidouro**. 1982. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, 87 p., Rio de Janeiro, Brasil.

CARVALHO, O.S.; SCHOLTE, R.G.C.; GUIMARÃES, R.J.P.S.; FREITAS, C.C.; DRUMMOND, S.C.; AMARAL, R.S.; DUTRA, L.V.; OLIVEIRA, G.; MASSARA, C.L.,

ENK, M.J. The Estrada Real Project and endemic diseases: the case of schistosomiasis, geoprocessing and tourism. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 532-536, 2010.

CHARRON, A.J.; SIBLEY, L.D. Host cells: mobilizable lipid resources for the intracellular parasite *Toxoplasma gondii*. **Journal of Cell Science**, v. 115, n. 15, p. 3049-3059, 2002.

CHEEVER, A.W. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 39, 328-331, 1968.

CHEEVER, A.W.; YAP, G.S. Immunologic basis of disease and disease regulation in schistosomiasis. **Chemical Immunology**, v. 66, p. 159-176, 1997.

CHEEVER, A.W. Differential regulation of granuloma size and hepatic fibrosis in schistosome infections. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 689-692, 1997.

CHEEVER, A.W.; JANKOVIC, D.; YAP, G.S.; KULLBERG, M.C.; SHER, A.; WYNN, T.A. Role of cytokines in the formation and downregulation of hepatic circumoval granulomas and hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 25-32, 1998.

CHEEVER, A.W.; LENZI, J.A.; LENZI, H.L.; ANDRADE, Z.A. Experimental Models of *Schistosoma mansoni* Infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 917-940, 2002.

CHEN, M.M.; SHI, L.; SULLIVAN, D.J. *Haemoproteus* and *Schistosoma* synthesize heme polymers similar to *Plasmodium* hemozoin and beta-hematin. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 113, n. 1, p. 1-8, 2001.

CHEN, Y.; LU, J.; HUANG, Y.; WANG, T.; XU, Y.; XU, M.; LI, M.; WANG, W.; LI, D.; BI, Y.; NING, G. Association of Previous Schistosome Infection With Diabetes and Metabolic Syndrome: A Cross-Sectional Study in Rural China. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 98, n. 2, p. 283-287, 2013.

CHENG, J.F.; OTT, N.L.; PETERSON, E.A.; GEORGE, T.J.; HUKKEE, M.J.; GLEICH, G.J.; LEIFERMAN, K.M. Dermal eosinophils in atopic dermatitis undergo cytolytic degeneration. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 99, p. 683-692, 1997.

CHIARINI-GARCIA, H.; PARREIRA, G.G.; ALMEIDA, F.R. Glycol methacrylate embedding for improved morphological, morphometrical, and immunohistochemical investigations under light microscopy: testes as a model. **Methods in Molecular Biology**, v. 689, p.3-18, 2011.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, v. 77, p. 41-51, 2000.

- CHU, V.T.; FRÖHLICH, A.; STEINHAUSER, G.; SCHEEL, T.; ROCH, T.; FILLATREAU, S.; LEE, J.J.; LÖHNING, M.; BEREK, C. Eosinophils are required for the maintenance of plasma cells in the bone marrow. **Nature Immunology**, v. 12, p. 151-159, 2011.
- CO, D.O.; HOGAN, L.H.; IL-KIM, S.; SANDOR, M. T cell contributions to the different phases of granuloma formation. **Immunology Letters**, v. 92, p. 135-142, 2004.
- COCCHIARO, J.L.; VALDIVIA, R.H. New insights into Chlamydia intracellular survival mechanisms. **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 11, p. 1571-1578, 2009.
- COELHO, J.R.; BEZERRA, F.S.M. The effects of temperature change on the infection rate of *Biomphalaria glabrata* with *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 2, p. 223-224, 2006.
- CORRÊA, C.L.; LISBOA, P.C.; OLIVEIRA, E.; MOURA, E.G.; OLIVEIRA, R.M.F.; GOMES, A.C.; MACHADO-SILVA, J.R. The outcome of acute schistosomiasis infection in adult mice with postnatal exposure to maternal malnutrition. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 5, p. 584-593, 2011.
- CORRÊA SOARES, J.B.R.; MAYA-MONTEIRO, C.M.; BITTENCOURT-CUNHA, P.R.B.; ATELLA, G.C.; LARA, F.A.; D'AVILA, J.C.P.; MENEZES, D.; VANNIER-SANTOS, M.A.; OLIVEIRA, P.L.; EGAN, T.J.; OLIVEIRA, M.F. Extracellular lipid droplets promote hemozoin crystallization in the gut of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **FEBS Letters**, v. 581, n. 9, p. 1742-1750, 2007.
- COSTA-NETO, S.F.; TUNHOLI-ALVES, V.M.; TUNHOLI, V.; GARCIA, J.S.; SANTOS, M.A.J.; NOGUEIRA, V.A.; BRITO, M.F.; GENTILE, R., PINHEIRO, J. Biochemical and histological changes in liver of *Nectomys squamipes* naturally infected by *Schistosoma mansoni*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 519-524, 2013.
- COSTA-SILVA, M. **Suscetibilidade experimental de *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmodontinae) a cepas de *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae): Estudo morfológico de vermes adultos machos e fêmeas por microscopia de luz.** 2000. Monografia de Bacharelado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 56 p., Rio de Janeiro, Brasil.
- COSTA-SILVA, M.; RODRIGUES-SILVA, R.; HULSTIJN, M.; NEVES, R.H.; PANASCO, M.S.; LENZI, H.L.; MACHADO-SILVA, J.R. Natural *Schistosoma mansoni* Infection in *Nectomys squamipes*: Histopathological and Morphometric Analysis in Comparison to Experimentally Infected *N. squamipes* and C3H/He mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 129-142, 2002.
- COURA, J.R.; AMARAL, R.S. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, p. 13-19, 2004.
- COUTO, J.L.A.; VIEIRA, R.C.S.; BARBOSA, J.M.; MACHADO, S.S.; FERREIRA, H.S. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo

Schistosoma mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 390-393, 2008.

CRIVELLATO, E.; NICO, B.; GALLO, V.P.; RIBATTI, D. Cell Secretion Mediated by Granule-Associated Vesicle Transport: A Glimpse at Evolution. **The Anatomical Record**, v. 293, p. 115-1120, 2010.

CZAMARA, K.; MAJZNER, K.; PACIA, M.Z.; KOCHAN, K.; KACZOR, A.; BARANSKA, M. Raman spectroscopy of lipids: a review. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, p. 4-20, 2015.

D'ANDREA, P.S.; HORTA, C.; CERQUEIRA, R.; REY, L. Breeding of the water rat (*Nectomys squamipes*) in the laboratory. **Laboratory Animals**, v. 30, p. 369-376, 1996.

D'ANDREA, P.S.; GENTILE, R.; CERQUEIRA, R.; GRELLE, C.E.V.; HORTA, C.; REY, L. Ecology of small mammals in a Brazilian rural area. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.16, n. 3, p. 611-620, 1999.

D'ANDREA, P.S.; MAROJA, L.S.; GENTILE, R.; CERQUEIRA, R.; MALDONADO JR, A.; REY, L. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea-Trematoda) in a naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia-Sigmodontinae) in Brazil. **Parasitology**, v. 120, p. 573-582, 2000.

D'ANDREA, P.S.; FERNANDES, F.A.; CERQUEIRA, R.; REY, L. Experimental Evidence and Ecological Perspectives for the Adaptation of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Digenea: Schistosomatidae) to a Wild Host, the Water-rat, *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (Rodentia: Sigmodontinae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 11-14, 2002.

D'ÁVILA, H.; MELO, R.C.N.; PARREIRA, G.G.; WERNECK-BARROSO, E.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T. Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 5, p. 3087-3097, 2006.

D'ÁVILA, H.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; ROQUE, N.R.; TEIXEIRA, L.; BARJA-FIDALGO, C.; SILVA, A.R.; MELO, R.C.N.; DOS REIS, G.A.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T. Host Cell Lipid Bodies Triggered by *Trypanosoma cruzi* Infection and Enhanced by the Uptake of Apoptotic Cells Are Associated With Prostaglandin E2 Generation and Increased Parasite Growth. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 6, p. 951-961, 2011.

D'ÁVILA, H.; TOLEDO, D.A.M.; MELO, R.C.N. Lipid Bodies: Inflammatory Organelles Implicated in Host-*Trypanosoma cruzi* Interplay during Innate Immune Responses. **Mediators of Inflammation**, v. 2012, 478601, 2012.

DAY, C.P.; JAMES, O.F. Steatohepatitis: a tale of two hits? **Gastroenterology**, v. 114, n. 4, p. 842-845, 1998.

DENZLER, K.L.; FARMER, S.C.; CROSBY, J.R.; BORCHERS, M.; CIESLEWICZ, G.; LARSON, K.A.; CORMIER-REGARD, S.; LEE, N.A.; LEE, J.J. Eosinophil Major Basic Protein-1 Does Not Contribute to Allergen-Induced Airway Pathologies in Mouse Models of Asthma. *The Journal of Immunology*, v. 165, p. 5509-5517, 2000.

DESPOMMIER, D.D.; GWADZ, R.W.; HOTEZ, P.J.; KNIRSCH, C.A. **Parasitic Diseases**. Fifth Edition. New York: Apple Trees Productions, LLC, 2005. 375 p.

DESSEIN, A.J.; COUISSINIER, P.; DEMEURE, C.; RIHET, P.; KOHISTAEDT, S.; CARNEIRO-CARVALHO, D.; OUATTARA, M.; GOUDOT-CROZEL, V.; DESSEIN, H.; BOURGOIS, A. Environmental, genetic and immunological factors in human resistance to *Schistosoma mansoni*. **Immunological Investigations**, v. 21, n. 5, p. 423-453, 1992.

DIAS, F.F. **Processos de secreção e transporte vesicular da proteína básica principal (MBP1) em eosinófilos durante a infecção por *Schistosoma mansoni***. 2015. Tese de Doutorado, Fundação Oswaldo Cruz, 171 p., Rio de Janeiro, Brasil.

DIGEL, M.; EHEHALT, R.; FÜLLEKRUG, J. Lipid droplets lighting up: Insights from live microscopy. **FEBS Letters**, v. 584, n. 11, p. 2168-2175, 2010.

DOENHOFF, M.J.; HASSOUNAH, O.; MURARE, B.; BAIN, J.; LUCAS, S. The schistosome egg granuloma: immunopathology in the cause of host protection or parasite survival? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, p. 503-514, 1986.

DUNNE, D.W.; BUTTERWORTH, A.E.; FULFORD, A.J.C.; KARIUKI, H.C.; LANGLEY, J.G.; OUMA, J.H.; CAPRON, A.; PIERCE, R.J.; STURROCK, R.F. Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **European Journal of Immunology**, v. 22, p. 1483-1494, 1992.

DVORAK, H.F.; DVORAK, A.M. Basophilic leucocytes: structure, function and role in disease. **Clinical Haematology**, v. 4, n. 3, p. 651-683, 1975.

DVORAK, A.M.; LETOURNEAU, L.; LOGIN, G.R.; WELLER, P.F.; ACKERMAN, S.J. Ultrastructural Localization of the Charcot-Leyden Crystal Protein (Lysophospholipase) to a Distinct Crystalloid-Free Granule Population in Mature Human Eosinophils. **Blood**, v. 72, n. 1, 1988.

DVORAK, A.M.; MORGAN, E.; SCHLEIMER, R.P.; RYEOM, S.W.; LICHTENSTEIN, L.M.; WELLER, P.F. Ultrastructural immunogold localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to non-membrane-bound cytoplasmic lipid bodies in human lung mast cells, alveolar macrophages, type II pneumocytes and neutrophils. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 40, p. 759-769, 1992.

DVORAK, A.M.; ACKERMAN, S.J.; FURITSU, T.; ESTRELLA, P.; LETOURNEAU, L.; ISHIZAKA, T. Mature eosinophils stimulated to develop in human-cord blood mononuclear cell cultures supplemented with recombinant human interleukin-5. II.

Vesicular transport of specific granule matrix peroxidase, a mechanism for effecting piecemeal degranulation. **American Journal of Pathology**, v. 140, p. 795-807, 1992.

DVORAK, A.M.; ONDERDONK, A.B.; MCLEOD, R.S.; MONAHAN-EARLEY, R.A.; ANTONIOLI, D.A.; CULLEN, J.; BLAIR, J.E.; CISNEROS, R.; LETOURNEAU, L.; MORGAN, E.; BLAIR, J.E.; ESTRELLA, P.; CISNEROS, R.L.; SILEN, W.; COHEN, Z. Ultrastructural identification of exocytosis of granules from human gut eosinophils in vivo. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 102, p. 35-45, 1993.

DVORAK, A.M.; ISHIZAKA, T. Human eosinophils in vitro. An ultrastructural morphology primer. **Histology and Histopathology**, v. 9, p. 339-374, 1994.

DVORAK, A.M. Piecemeal degranulation of basophils and mast cells is effected by vesicular transport of stored secretory granule contents. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 85, p. 135-184, 2005b.

EGAN, T.J.; CHEN, J.Y.; DE VILLIERS, K.A.; MABOTHA, T.E.; NAIDOO, K.J.; NCOKAZI, K.K.; LANGFORD, S.J.; MCNAUGHTON, D.; PANDIANCHERRI, S.; WOOD, B.R. Haemozoin (beta haematin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface. **FEBS Letters**, v. 580, n. 21, p. 5105-5110, 2006.

EGESTEN, A.; CALAFAT, J.; JANSSEN, H.; KNOL, E.F.; MALM, J.; PERSSON, T. Granules of human eosinophilic leucocytes and their mobilization. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 31, p. 1173-1188, 2001.

EI RIDI, R.A.F.; TALLIMA, H.A.M. Novel Therapeutic and Prevention Approaches for Schistosomiasis: Review. **Journal of Advanced Research**, v. 4, p. 467-478, 2013.

ELISHMERENI, M.; ALENIUS, H.T.; BRADDING, P.; MIZRAHI, S.; SHIKOTRA, A.; MINAJ-FLEMINGER, Y.; MANKUTA, D.; ELIASHAR, R.; ZABUCCHI, G.; LEVI-SCHAFFER, F. Physical interactions between mast cells and eosinophils: a novel mechanism enhancing eosinophil survival in vitro. **Allergy**, v. 66, p. 376-385, 2011.

ENK, M.J.; AMARAL, G.L.; COSTA E SILVA, M.F.; SILVEIRA-LEMONS, D.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GAZZINELLI, G.; COELHO, P.M.Z.; MASSARA, C.L. Rural tourism: a risk factor for schistosomiasis transmission in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 537-540, 2010.

ERJEFÄLT, J.S.; ANDERSSON, M.; GREIFF, L.; KORSGREN, M.; GIZYCKI, M.; JEFFERY, P.K.; PERSSON, C.G.A. Cytolysis and piecemeal degranulation as distinct modes of activation of airway mucosal eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, p. 286-294, 1998.

ERJEFÄLT, J.S.; GREIFF, L.; ANDERSSON, M. Degranulation patterns of eosinophil granulocytes as determinants of eosinophil driven disease. **Thorax**, v. 56, p. 341-344, 2001.

ERNEST, K.A.; MARES, M.A. Ecology of *Nectomys squamipes*, the neotropical water rat, in central Brazil: home range, habitat selection, reproduction and behavior. **Journal of Zoology**, v. 210, p. 599-612, 1986.

FARAH, I.O.; KARIUKI, T.M.; KING, C.L.; HAU, J. An overview of animal models in experimental schistosomiasis and refinements in the use of non-human primates. **Laboratory Animals**, v. 35, p. 205-212, 2001.

FARESE JR, R.V.; WALTHER, T.C. The life of lipid droplets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 6, p. 459-466, 2009.

FOONG, A.; SCHOLE, J.V.; GLEICH, G.J.; KEPHART, G.M.; HOLT, P.R. Eosinophil-induced chronic active hepatitis in the idiopathic hypereosinophilic syndrome. **Hepatology**, v. 13, p. 1090-1094, 1991.

FUJIMOTO, T.; PARTON, R.G. Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet, **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 3, p. a004838, 2011.

FUJIMOTO, Y.; ITABE, H.; SAKAI, J.; MAKITA, M.; NODA, J.; MORI, M.; HIGASHI, Y.; KOJIMA, S.; TAKANO, T. Identification of major proteins in the lipid droplet-enriched fraction isolated from the human hepatocyte cell line HuH7. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1644, p. 47-59, 2004.

FUKUDA, T.; ACKERMAN, S.J.; REED, C.E.; PETERS, M.S.; DUNNETTE, S.L.; GLEICH, G.J. Calcium ionophore A23187 calcium-dependent cytolytic degranulation in human eosinophils. **The Journal of Immunology**, v. 135, p. 1349-1356, 1985.

FURLONG, S.T.; THIBAUT, K.S.; MORBELLI, L.M.; QUINN, J.J.; ROGERS, R.A. Uptake and compartmentalization of fluorescent lipid analogs in larval *Schistosoma mansoni*. **Journal of Lipid Research**, v. 36, n. 1, p. 1-12, 1995.

FURUTA, G.T.; NIEUWENHUIS, E.E.; KARHAUSEN, J. Eosinophils alter colonic epithelial barrier function: role for major basic protein. **American Journal of Physiology**, v. 289, p. 890-897, 2005.

GAO, B.; JEONG, W.I.; TIAN, Z. Liver: an organ with predominant innate immunity. **Hepatology**, v. 47, n. 2, p. 729-736, 2008.

GAUSE, W.C.; URBAN JR, J.F.; STADECKER, M.J. The immune response to parasitic helminths: insights from murine models. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 5, p. 269-277, 2003.

GAZZINELLI, A.; CORREA-OLIVEIRA, R.; YANG, G.J.; BOATIN, B.A.; KLOOS, H. A Research Agenda for Helminth Diseases of Humans: Social Ecology, Environmental Determinants, and Health Systems. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, e1603, 2012.

GENTILE, R.; D'ANDREA, P.S.; CERQUEIRA, R.; MAROJA, L.S. Population dynamics and reproduction of marsupials and rodents in a Brazilian rural area: a five-year study. **Study Neotropical Fauna & Environment**, v. 35, p. 1-9, 2000.

GENTILE, R.; COSTA-NETO, S.F.; GONÇALVES, M.M.L.; BONECKER, S.T.; FERNANDES, F.A.; GARCIA, J.S.; BARRETO, M.G.M.; SOARES, M.S.; D'ANDREA, P.S.; PERALTA, J.M.; REY, L. An ecological field study of the water-rat *Nectomys squamipes* as a wild reservoir indicator of *Schistosoma mansoni* transmission in an endemic area. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 111-117, 2006.

GENTILE, R.; COSTA-NETO, S.F.; D'ANDREA, P.S. 2010. Uma revisão sobre a participação do rato d'água *Nectomys squamipes* na dinâmica de transmissão da esquistossomose mansônica: um estudo multidisciplinar de longo prazo em uma área endêmica. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 3, p. 711-725, 2010.

GENTILE, R.; SOARES, M.S.; BARRETO, M.G.M.; GONÇALVES, M.M.L.; D'ANDREA, P.S. (2012). The Role of Wild Rodents in the Transmission of *Schistosoma mansoni* in Brazil. In: **Schistosomiasis**, Prof. Mohammad Bagher Rokni (Ed.), ISBN: 978-953-307-852-6, InTech, DOI: 10.5772/25909. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/schistosomiasis/the-role-of-wild-rodents-in-the-transmission-of-schistosoma-mansoni-in-brazil>. Acesso em: 16 out. 2015.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367-379, 2005.

GIOVANELLI, A.; SOARES, M.S.; D'ANDREA, P.S.; GONÇALVES, M.M.L.; REY, L. Abundância e infecção do molusco *Biomphalaria glabrata* pelo *Schistosoma mansoni* no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 35, p. 523-530, 2001.

GLEICH, G.J.; ADOLPHSON, C.R. The eosinophilic leukocyte: structure and function. **Advances in Immunology**, v. 39, p. 177-253, 1986.

GLEICH, G.J.; LOEGERING, D.A.; BELL, M.P.; CHECKEL, J.L.; ACKERMAN, S.J.; MCKEAN, D.J. Biochemical and functional similarities between human eosinophil derived neurotoxin and eosinophil cationic protein: homology with ribonuclease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 83, p. 3146–3150, 1986.

GOMES, L.I.; ENK, M.J.; RABELLO, A. Diagnosing schistosomiasis: Where are we? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 1, p. 3-11, 2014.

GOUNNI, A.S.; LAMKHIOUED, B.; OCHIAI, K.; TANAKA, Y.; DELAPORTE, E.; CAPRON, A.; KINET, J.P.; CAPRON, M. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defense against parasites. **Nature**, v. 367, p. 183-186, 1994.

GREENBERG, A.S.; COLEMAN, R.A.; KRAEMER, F.B.; MCMANAMAN, J.L.; OBIN, M.S.; PURI, V.; YAN, Q.; MIYOSHI, H.; MASHEK, D.G. The role of lipid droplets in metabolic disease in rodents and humans. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 121, n. 6, p. 2102-2110, 2011.

GREIFF, L.; ERJEFÄLT, J.S.; ANDERSSON, M.; SVENSSON, C.; PERSSON, C.G. Generation of clusters of free eosinophil granules (Cfegs) in seasonal allergic rhinitis. **Allergy**, v. 53, p. 200-203, 1998.

GRIMAUD, J.A. Cell-matrix interactions in schistosomal portal fibrosis: a dynamic event. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 82, n. 4, p. 55-65, 1987.

GRUNET, M.L. Gomori's trichrome stain. Its use with myelin sheaths. **Archives of Neurology**, v. 35, n. 10, p. 692, 1978.

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

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p. 383-397, 2012.

GUO, Y.; CORDES, K.R.; FARESE JR, R.V.; WALTHER, T.C. Lipid Droplets at a Glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. 6, p. 749-752, 2009.

GURARIE, D.; SETO, E.Y.W. Connectivity sustains disease transmission in environments with low potential for endemicity: modelling schistosomiasis with hydrologic and social connectivities. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 6, p. 495-508, 2009.

HAGAN, P.; WILKINS, H.A.; BLUMENTHAL, U.J.; HAYES, R.J.; GREENWOOD, B.M. Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. **Parasite Immunology**, v. 7, p. 625-632, 1985b.

HALLFRISCH, J. Metabolic effects of dietary fructose. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 9, p. 2652-2660, 1990.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P.G. The schistosoma granuloma: friend or foe? **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1-8, 2013.

HANNA, S.; GHARIB, B.; LEPIDI, H.; MONTET, J.C.; DUMON, H.; REGGI, M. Experimental schistosomiasis, protective aspects of granulomatous reaction in the mouse liver. **Parasitology Research**, v. 96, p. 6-11, 2005.

HEMPELMANN, E. Hemozoin Biocrystallization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4, p. 671-676, 2007.

HERKER, E.; OTT, M. Unique ties between hepatitis C virus replication and intracellular lipids. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 22, n. 6, p. 241-248, 2011.

HERKER, E.; OTT, M. Emerging Role of Lipid Droplets in Host / Pathogen Interactions. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 4, p. 2280-2287, 2012.

HIDE, I.; BENNETT, J.P.; PIZZEY, A.; BOONEN, G.; BAR-SAGI, D.; GOMPERTS, B.D. Degranulation of individual mast cells in response to Ca²⁺ and guanine nucleotides: an all-or-none event. **The Journal of Cell Biology**, v. 123, p. 585-593, 1993.

HOANG, A.N.; NCOKAZIB, K.K.; VILLIERS, K.A.; WRIGHT, D.W.; EGAN, T.J. Crystallization of synthetic haemozoin (β -haematin) nucleated at the surface of lipid particles. **Dalton Transactions**, v. 39, n. 5, p. 1235-1244, 2010.

HOFFMAN, W.A.; PONS, J.A., JANER, J.L. Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. **Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**, v. 9, p. 283-289, 1934.

HOGAN, S.P.; MISHRA, A.; BRANDT, E.B.; ROYALTY, M.P.; POPE, S.M.; ZIMMERMANN, N. A pathological function for eotaxin and eosinophils in eosinophilic gastrointestinal inflammation. **Nature Immunology**, v. 2, p. 353-360, 2001.

HOGAN, S.P.; ROSENBERG, H.F.; MOQBEL, R.; PHIPPS, S.; FOSTER, P.S.; LACY, P.; KAY, A.B.; ROTHENBERG, M.E. Eosinophils: Biological Properties and Role in Health and Disease. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 38, p. 709-750, 2008.

HORTON, M.A.; LARSON, K.A.; LEE, J.J.; LEE, N.A. Cloning of the murine eosinophil peroxidase gene (mEPO): characterization of a conserved subgroup of mammalian hematopoietic peroxidases. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 60, p. 285-294, 1996.

HUANG, S.C.; FREITAS, T.C.; AMIEL, E.; EVERTS, B.; PEARCE, E.L.; LOK, J.B.; PEARCE, E.J. Fatty Acid Oxidation is Essential for Egg Production by the Parasitic Flatworm *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 10, e1002996, 2012.

IBGE, 2015. <http://www.cidades.ibge.gov.br>. Acesso em junho 2015.

IMAMURA, M.; INOBUCHI, I.; IKUYAMA, S.; TANIGUCHI, S.; KOBAYASHI, K.; NAKASHIMA, N.; NAWATA, H. ADRP stimulates lipid accumulation and lipid droplet formation in murine fibroblasts. **American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism**, v. 283, p. 775-783, 2002.

INCANI, R.N.; MORALES, G.; CESARI, I.M. Parasite and vertebrate host genetic heterogeneity determines the outcome of infection by *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v. 87, p. 131-137, 2001.

JACOBSEN, E.A.; TARANOVA, A.G.; LEE, N.A.; LEE, J.J. Eosinophils: Singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, n. 6, p. 1313-1320, 2007.

JAESCHKE, H.; GUJRAL, J.S.; BAJT, M.L. Apoptosis and necrosis in liver disease. **Liver International**, v. 24, n. 2, p. 85-89, 2004.

JOHNSON, E.H.; LUSTIGMAN, S.; BROTMAN, B.; BROWNE, J.; PRINCE, A.M. *Onchocerca volvulus*: in vitro killing of microfilaria by neutrophils and eosinophils from experimentally infected chimpanzees. **Tropical Medicine and Parasitology**, v. 42, p. 351-355, 1991.

JOU, J.; CHOI, S.S.; DIEHL, A.M. Mechanisms of disease progression in nonalcoholic fatty liver disease. **Seminars in Liver Disease**, v. 28, n. 4, p. 370-379, 2008.

KEESING, F.; BELDEN, L.K.; DASZAK, P.; DOBSON, A.; HARVELL, C.D. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, v. 468, p. 647-652, 2010.

KEPHART, G.M.; ANDRADE, Z.A.; GLEICH, G.J. Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of *Schistosoma mansoni* in human pathologic tissue. **American Journal of Pathology**, v. 133, n. 2, p. 389-396, 1988.

KIM, M.J.; WAINWRIGHT, H.C.; LOCKETZ, M.; BEKKER, L.G.; WALTHER, G.B.; DITTRICH, C.; VISSER, A.; WANG, W.; HSU, F.F.; WIEHART, U.; TSENOVA, L.; KAPLAN, G.; RUSSELL, D.G. Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. **EMBO Molecular Medicine**, v. 2, n. 7, p. 258-274, 2010.

KIMMEL, A.R.; BRASAEMLE, D.L.; MCANDREWS-HILL, M.; SZTALRYD, C.; LONDOS, C. Adoption of PERILIPIN as a unifying nomenclature for the mammalian PAT-family of intracellular lipid storage droplet proteins. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 3, p. 468-471, 2010.

KING, C.H. Parasites and Poverty: The Case of Schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 113, n. 2, p. 95-104, 2010.

KITA, H. The eosinophil: a cytokine-producing cell? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, p. 889-892, 1996.

KITA, H. Eosinophils: Multifaceted biologic properties and roles in health and disease. **Immunology Reviews**, v. 241, n. 1, p. 161-177, 2011.

KLEINER, D.E.; BRUNT, E.M.; VAN NATTA, M.; BEHLING, C.; CONTOS, M.J.; CUMMINGS, O.W.; FERRELL, L.D.; LIU, Y.C.; TORBENSON, M.S.; UNALP-ARIDA, A.; YEH, M.; McCULLOUGH, A.J.; SANYAL, A.J. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. **Hepatology**, v. 41, p. 1313-1321, 2005.

KLOOS, H. Water resources development and schistosomiasis ecology in the Awash Valley, Ethiopia. **Social Science and Medicine**, v. 20, p. 609-625, 1985.

KLOOS, H.; GAZZINELLI, A.; VAN ZUYLE, P. Microgeographical Patterns of Schistosomiasis and Water Contact Behavior: Examples from Africa and Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 37-50, 1998.

KLOOS, H.; CORREA-OLIVEIRA, R.; REIS, D.C.; RODRIGUES, E.W.; MONTEIRO, L.A.S.; GAZZINELLI, A. The role of population movement in the epidemiology and control of schistosomiasis in Brazil: a preliminary typology of population movement. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 578-586, 2010.

KOOPMAN, R.; SCHAART, G.; HESSELINK, M.K. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 116, n. 1, p. 63-68, 2001.

KUCERA, O.; CERVINKOVA, Z. Experimental models of non-alcoholic fatty liver disease in rats. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 26, p. 8364-8376, 2014.

KUSEL, J. R.; AL-ADHAMI, B. H.; DOENHOFF; M. J. The schistosome in the mammalian host: understanding the mechanisms of adaptation. **Parasitology**, v. 134, p. 1477-1526, 2007.

LACY, P.; STOW, J.L. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. **Blood**, v. 118, p. 9-18, 2011.

LAMBERTUCCI, J.R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422-435, 2010.

LANGE, A.M.; YUTANAWIBOONCHAI, W.; SCOTT, P.; ABRAHAM, D. IL-4- and IL-5-dependent protective immunity to *Onchocerca volvulus* infective larvae in BALB/cBYJ mice. **The Journal of Immunology**, v. 153, p. 205-211, 1994.

LE, T.H., BLAIR, D., MCMANUS, D.P. Mitochondrial DNA sequences of human schistosomes: the current status. **International Journal of Parasitology**, v. 30, p. 283-290, 2000.

LEE, J.J.; LEE, N.A. Eosinophil degranulation: an evolutionary vestige or a universally destructive effector function? **Clinical and Experimental Allergy**, v. 35, p. 986-994, 2005.

LEE, J.J.; JACOBSEN, E.A.; OCHKUR, S.I.; MCGARRY, M.P.; CONDJELLA, R.M.; DOYLE, A.D.; LUO, H.; ZELLNER, K.R.; PROTHEROE, C.A.; WILLETTS, L.; LESUER, W.E.; COLBERT, D.C.; HELMERS, R.A.; LACY, P.; MOQBEL, R.; LEE, N.A. Human vs. Mouse Eosinophils: "That which we call an eosinophil, by any other name would stain as red". **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 130, n. 3, p. 572-584, 2012.

LEFKOWITCH, J.H.; HAYTHE, J.H.; REGENT, N. Kupffer Cell Aggregation and Perivenular Distribution in Steatohepatitis. **Modern Pathology**, v. 15, n. 7, p. 699-704, 2002.

LENZI, H.L.; LENZI, J.A.; SOBRAL, A.C. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, n. 3-4, p. 433-435, 1987.

LENZI, J.A.; MOTA, E.M.; PELAJO-MACHADO, M.; PAIVA, R.; LENZI, H.L. Calomys callosus: an alternative model to study fibrosis in schistosomiasis mansoni. The pathology of the acute phase. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, n. 2, p. 311-318, 1995.

LENZI, H.L.; PACHECO, R.G.; PELAJO-MACHADO, M.; PANASCO, M.S.; ROMANHA, W.S.; LENZI, J.A. Immunological System and Schistosoma mansoni: Co-evolutionary Immunobiology. What is the Eosinophil Role in Parasite-host Relationship? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 19-32, 1997.

LENZI, H.L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M.; ROMANHA, W.S.; PACHECO, R.G.; MARIANO, M.; LENZI, J.A. Histoarchitecture of Schistosomal Granuloma Development and Involution: Morphogenetic and Biomechanical Approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 141-151, 1998.

LENZI, H.L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M.; VALE, B.S.; PANASCO, M.S.; LENZI, J.A. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. **Brazilian Journal on Medical and Biological Research**, v. 32, p. 639-643, 1999.

LIMA, D.O. **Padrões espaciais e demográficos do rato d'água *Nectomys squamipes* em rios e mata ciliar na bacia do rio Águas Claras, Rio de Janeiro.** 2009. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 88 p., Rio de Janeiro, Brasil.

LINS, R.A.B.; CAVALCANTI, C.B.L.; ARAÚJO-FILHO, MELO-JÚNIOR, M.R.; CHAVES, M.E.C. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 2, p. 73-178, 2008.

LISTENBERGER, L.L.; HAN, X.; LEWIS, S.E.; CASES, S.; FARESE JR, R.V.; ORY, D.S.; SCHAFFER, J.E. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 100, n. 6, p. 3077-3082, 2003.

LOGAN, M.R.; ODEMUYIWA, S.O.; MOQBEL, R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: The molecular basis of mediator secretion. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 11, n. 5, p. 923-932, 2003.

LOLLIKE, K.; LINDAU, M.; CALAFAT, J.; BORREGAARD, N. Compound exocytosis of granules in human neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 71, p. 973-980, 2002.

LOTFI, R.; LOTZE, M.T. Eosinophils induce DC maturation, regulating immunity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 456-460, 2008.

LOUKAS, A.; JONES, M.K.; KING, L.T.; BRINDLEY, P.J.; MCMANUS, D.P. Receptor for Fc on the surfaces of schistosomes. **Infection and Immunity**, v. 69, p. 3646-3651, 2001.

LUNDY, S.K.; LUKACS, N.W. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immune suppression. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1-18, 2013.

MACHADO-SILVA, J.R.; GALVÃO, C.; PRESGRAVE, O.A.F.; REY, L.; GOMES, D.C. Host-induced morphological changes of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 male worms. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 89, p. 411-416, 1994.

MACHADO-SILVA, J.R.; RODRIGUES-SILVA, R.; NEVES, R.H.; COSTA-SILVA, M.; OLIVEIRA, R.M.F.; MALDONADO JÚNIOR, A. Histopathological features of *schistosoma mansoni* infection in *Akodon cursor* (Rodentia: Sigmodontinae). **Neotropical Helminthology**, v. 5, n. 1, p. 41-49, 2011.

MACKENZIE, J.; MATTES, J.; DENT, L; FOSTER, P. Eosinophils promote allergic disease of the lung by regulating CD4+ Th2 lymphocyte function. **The Journal of Immunology**, v. 167, p. 3146-3155, 2001.

MAGALHÃES, K.G.; ALMEIDA, P.E.; ATELLA, G.C.; MAYA-MONTEIRO, C.M.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; PELAJO-MACHADO, M.; LENZI, H.L.; BOZZA, M.T.; BOZZA, P.T. Schistosomal-Derived Lysophosphatidylcholine Are Involved in Eosinophil Activation and Recruitment through Toll-Like Receptor–2–Dependent Mechanisms. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 202, n. 9, p. 1369-1379, 2010.

MAHMOUD, A.A.F. The Ecology of Eosinophils. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 145, n. 5, p. 613-621, 1982.

MALDONADO JR, A.; MACHADO-SILVA, J.R.; RODRIGUES-SILVA, R.; LENZI, H.L.; REY, L. Evaluation of the resistance to *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes* (Rodentia: Cricetidae), a natural host of infection in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 3, p. 193-198, 1994.

MALDONADO JR, A.; GENTILE, R.; FERNANDES-MORAES, C.C.; D'ANDREA, P.S.; LANFREDI, R.M.; REY, L. Helminth communities of *Nectomys squamipes* naturally infected by the exotic trematode *Schistosoma mansoni* in southeastern Brazil. **Journal of Helminthology**, v. 80, p. 369-375, 2006.

MALHOTRA, I.; OUMA, J.; WAMACHI, A.; KIOKO, J.; MUNGAI, P.; OMOLLO, A.; ELSON, L.; KOECH, D.; KAZURA, J.W.; KING, C.L. *In utero* exposure to helminth and mycobacterial antigens generates cytokine responses similar to that observed in adults. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, p. 1759-1766, 1997.

MALM-ERJEFÄLT, M.; PERSSON, C.G.; ERJEFÄLT, J.S. Degranulation status of airway tissue eosinophils in mouse models of allergic airway inflammation. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 24, p. 352-359, 2001.

- MARTINEZ, E.M. **Suscetibilidade experimental de *Nectomys squamipes* (Brants, 1827), possível reservatório silvestre de esquistossomose, a cepas de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907): Avaliação parasitológica.** 1998. Dissertação de Mestrado. Fundação Oswaldo Cruz, 67 p., Rio de Janeiro, Brasil.
- MARTINEZ, E.M.; COSTA-SILVA, M.; NEVES, R.H.; OLIVEIRA, R.M.F.; MACHADO-SILVA, J.R. Biological implications of the phenotypic plasticity in the *Schistosoma mansoni-Nectomys squamipes* model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 4, p. 229-232, 2008.
- MARTINS JR, D.F.; BARRETO, M.L. Aspectos macroepidemiológicos da esquistossomose mansônica: análise da relação da irrigação no perfil espacial da endemia no Estado da Bahia, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 2, p. 383-393, 2003.
- MASABA, S.C.; OCHIENG, S.; AWINO, M.O. Man-made dams as sources of bilharziasis in Onganga Village, Ka Kanyaluo location South Nyanza. **East African Medical Journal**, v. 60, p. 860-862, 1983.
- MASSARA, C.L.; AMARAL, G.L.; CALDEIRA, R.L.; DRUMMOND, S.C.; ENK, M.J.; CARVALHO, O.S. Esquistossomose em área de ecoturismo do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 7, p. 1709-1712, 2008.
- MAYER, A. Membrane fusion in eukaryotic cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 18, p. 289-314, 2002.
- McCULLOUGH, A.J. Pathophysiology of nonalcoholic steatohepatitis. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. 1, p. 17-29, 2006.
- McLAREN, D.J.; MACKENZIE, C.D.; RAMALHO-PINTO, F.J. Ultrastructural observations on the in vitro interaction between rat eosinophils and some parasitic helminths (*Schistosoma mansoni*, *Trichinella spiralis* and *Nippostrongylus brasiliensis*). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 30, p. 105-118, 1977.
- McLAREN, D.J.; TERRY, R.J. The protective role of acquired host antigens during schistosome maturation. **Parasite Immunology**, v. 4, p. 129-148, 1982.
- MEESTER, I.; ROSAS-TARACO, A.G.; SOLÍS-SOTO, J.M.; SALINAS-CARMONA, M.C. The roles of lipid droplets in human infectious disease. **Medicina Universitaria**, v. 13, n. 53, p. 207-216, 2011.
- MEI, Q.; KORSGREN, M.; ERJEFÄLT, J.S.; SUNDLER, F. Eosinophil infiltration and activation at the gastric ulcer margin in rats. **European Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, p. 503-511, 2002.
- MELO, R.C.N.; WELLER, P.F.; DVORAK, A.M. Activated human eosinophils. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 138, p. 347-349, 2005a.
- MELO, R.C.N.; PEREZ, S.A.C.; SPENCER, L.A.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Intragranular Vesiculotubular Compartments are Involved in Piecemeal

Degranulation by Activated Human Eosinophils. **Traffic**, v. 6, n. 10, p. 866-879, 2005b.

MELO, R.C. N.; SPENCER, L.A.; PEREZ, S.A.C.; GHIRAN, I.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Human Eosinophils Secrete Preformed, Granule-Stored Interleukin-4 Through Distinct Vesicular Compartments. **Traffic**, v. 6, p. 1047-1057, 2005c.

MELO, R.C.N.; FABRINO, D.L.; DIAS, F.F.; PARREIRA, G.G. Lipid bodies: Structural markers of inflammatory macrophages in innate immunity. **Inflammation Research**, v. 55, n. 8, p. 342-348, 2006.

MELO, R.C.N.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Electron tomography and immunogold electron microscopy for investigating intracellular trafficking and secretion in human eosinophils. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 12, n. 4, p. 1416-1419, 2008.

MELO, R.C.N.; SPENCER, L.A.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Mechanisms of eosinophil secretion: Large vesiculotubular carriers mediate transport and release of granule-derived cytokines and other proteins. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 229-236, 2008b.

MELO, R.C.N.; SPENCER, L.A.; PEREZ, S.A.; NEVES, J.S.; BAFFORD, S.P.; MORGAN, E.S.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Vesicle-mediated secretion of human eosinophil granule-derived major basic protein. **Laboratory Investigation**, v. 89, p. 769-781, 2009.

MELO, R.C.N.; WELLER, P.F. Piecemeal degranulation in human eosinophils: a distinct secretion mechanism underlying inflammatory responses. **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 10, p. 1341-1354, 2010.

MELO, R.C.N.; D'AVILA, H.; WAN, H.C.; BOZZA, P.T.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Lipid bodies in inflammatory cells: structure, function, and current imaging techniques. **Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 59, n. 5, p. 540-556, 2011.

MELO, R.C.N., DÁVILA, H.; BOZZA, P.T.; WELLER, P.F. Imaging lipid bodies within leukocytes with different light microscopy techniques. **Methods in Molecular Biology**, v. 689, p.149-61, 2011.

MELO, R.C.N.; DVORAK, A.M. Lipid Body-Phagosome Interaction in Macrophages during Infectious Diseases: Host Defense or Pathogen Survival Strategy? **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 7, e1002729, 2012.

MELO, R.C.N.; PAGANOTI, G.F.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. The Internal Architecture of Leukocyte Lipid Body Organelles Captured by Three-Dimensional Electron Microscopy Tomography. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, e59578, 2013.

MELO, R.C.N.; LIU, L.; XENAKIS, J.J.; SPENCER, L.A. Eosinophil-derived cytokines in health and disease: unraveling novel mechanisms of selective secretion. **Allergy**, v. 68, p. 274-284, 2013a.

MELO, R.C.N.; WELLER, P.F. Unraveling the complexity of lipid body organelles in human eosinophils. **Journal of Leucocyte Biology**, v. 96, n. 5, p. 703-712, 2014.

MELO, R.C.N.; WELLER, P.F. Lipid droplets in leukocytes: Organelles linked to inflammatory responses. **Experimental Cell Research**, v. 339, p. XX-XXX, 2015.

MELO-DINIZ, M.F.F.; MEDEIROS, I.A.; SANTOS, H.B.; OLIVEIRA, K.M.; VASCONCELOS, T.H.C.; AGUIAR, F.B.; TOSCANO, M.G.; RIBEIRO, E.A.N. Padronização dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de Camundongos Swiss e Ratos Wistar. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 10, n. 2, p. 171-176, 2006.

MESQUITA-SANTOS, F.P.; VIEIRA-DE-ABREU, A.; CALHEIROS, A.S.; FIGUEIREDO, I.H.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; WELLER, P.F.; BOZZA, P.T.; DIAZ, B.L.; BANDEIRA-MELO, C. Cutting Edge: Prostaglandin D2 Enhances Leukotriene C4 Synthesis by Eosinophils during Allergic Inflammation: Synergistic In Vivo Role of Endogenous Eotaxin. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 1326-1330, 2006.

MICHALOPOULOS, G.K. Liver Regeneration. **Journal of Cellular Physiology**, v. 213, n. 2, p. 286-300, 2007.

MICHELSON, E.H.; MOTA, E. Malacological observations bearing on the epidemiology of schistosomiasis in a rural Bahia community. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 24, p. 75-82, 1982.

MOHAMED-ALI, Q.; ELWALI, N.E.M.A.; ABDELHAMEED, A.A.; MERGANI, A.; RAHOUD, S.; ELAGIB, K.E.; SAEED, O.K.; ABEL, L.; MAGZOUB, M.M.A.; DESSEIN, A.J. Susceptibility to periportal (Symmers) fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infections: Evidence that intensity and duration of infection, gender, and inherited factors are critical in disease progression. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 180, p. 1298-306, 1999.

MOQBEL R, LACY P. Exocytotic events in eosinophils and mast cells. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 99, p. 1017-1022, 1999.

MORGAN, J.A.; DEJONG, R.J.; ADEOYE, G.O.; ANSA, E.D.; BARBOSA, C.S.; BREMOND, P.; CESARI, I.M.; CHARBONNEL, N.; CORREA, L.R.; COULIBALY, G.; D'ANDREA, P.S.; DE SOUZA, C.P.; DOENHOFF, M.J.; FILE, S.; IDRIS, M.A.; INCANI, R.N.; JARNE, P.; KARANJA, D.M.; KAZIBWE, F.; KPIKPI, J.; LWAMBO, N.J.; MABAYE, A.; MAGALHAES, L.A.; MAKUNDI, A.; MONE, H.; MOUAHID, G.; MUCHEMI, G.M.; MUNGAI, B.N.; SENE, M.; SOUTHGATE, V.; TCHUENTE, L.A.; THERON, A.; YOUSIF, F.; ZANOTTI-MAGALHAES, E.M.; MKOJI, G.M.; LOKER, E.S. Origin and diversification of the human parasite *Schistosoma mansoni*. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 3889-3902, 2005.

MORGENSTERN, E. The formation of compound granules from different types of secretory organelles in human platelets (dense granules and alpha-granules). A cryofixation/-substitution study using serial section. **European Journal of Cell Biology**, v. 68, p. 183-190, 1995.

MUNIZ, V.S.; WELLER, P.F.; NEVES, J.S. Eosinophil crystalloid granules: structure, function and beyond. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 92, p. 1-8, 2012.

MURPHY, D.J. The biogenesis and functions of lipid bodies in animals, plants and microorganisms. **Progress in Lipid Research**, v. 40, n. 5, p. 325-438, 2001.

MURPHY, S.; MARTIN, S.; PARTON, R.G. Lipid droplet-organelle interactions: sharing the fats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, n. 6, p. 441-447, 2009.

NERLOV, C.; GRAF, T. PU.1 induces myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. **Genes and Development**, v. 12, n. 15, p. 2403-2412, 1998.

NERLOV, C.; MCNAGNY, K.M.; DÖDERLEIN, G.; KOWENZ-LEUTZ, E.; GRAF, T. Distinct C/EBP functions are required for eosinophil lineage commitment and maturation. **Genes and Development**, v. 12, n. 15, p. 2413-2423, 1998.

NEUSCHWANDER-TETRI, B.A. Hepatic lipotoxicity and the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis: The central role of nontriglyceride fatty acid metabolites. **Hepatology**, v. 52, n. 2, p. 774-788, 2010.

NEVES, J.S.; PEREZA, S.A.C.; SPENCER, L.A.; MELO, R.C.N.; REYNOLDS, L.; GHIRAN, I.; MAHMUDI-AZER, S.; ODEMUYIWA, S.O.; DVORAK, A.M.; MOQBEL, R.; WELLER, P.F. Eosinophil granules function extracellularly as receptor-mediated secretory organelles. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 105, n. 47, p. 18478-18483, 2008.

NEVES, J.S.; WELLER, P.F. Functional extracellular eosinophil granules: novel implications in eosinophil immunobiology. **Current Opinion in Immunology**, v. 21, n. 6, p. 694-699, 2009.

NEVES, R.H.; ALENCAR, A.C.M.B.; ÁGUILA, M.B.; MANDARIM-DE-LACERDA, C.A.; MACHADO-SILVA, J.R.; GOMES, D.C. Hepatic stereology of schistosomiasis mansoni infected-mice fed a high-fat diet. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 253-260, 2006.

NIMER, E. 1989. Climatologia do Brasil. **SUPREN**, Rio de Janeiro, Brasil.

NOVERR, M.C.; PHARE, S.M.; TOEWS, G.B.; COFFEY, M.J.; HUFFNAGLE, G.B. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 5, p. 2957-2963, 2001.

NYBLOM, H.; BERGGREN, U.; BALLDIN, J.; OLSSON, R. High AST/ALT ratio may indicate advanced alcoholic liver disease rather than heavy drinking. **Alcohol & Alcoholism**, v. 39, n. 4, p. 336-339, 2004.

OCHKUR, S.I.; JACOBSEN, E.A.; PROTHEROE, C.A.; BIECHELE, T.L.; PERO, R.S.; MCGARRY, M.P. Co-Expression of IL-5 and Eotaxin-2 in Mice Creates an Eosinophil-Dependent Model of Respiratory Inflammation with Characteristics of Severe Asthma. **The Journal of Immunology**, v. 178, p. 7879-7889, 2007.

OLDS, G.R.; DASARATHY, S. Recent Advances in Schistosomiasis. **Current Infectious Disease Reports**, v. 3, p. 59-67, 2001.

OLIVEIRA, T.F.; SOARES, M.S.; CUNHA, R.A.; MONTEIRO, S. Educação e controle da esquistossomose em Sumidouro (RJ, Brasil): avaliação de um jogo no contexto escolar. **Revista Brasileira de Pesquisa em Educação em Ciências**, v. 8, n.3, 2008.

OVINGTON, K.S.; BEHM, C.A. The Enigmatic Eosinophil: Investigation of the Biological Role of Eosinophils in Parasitic Helminthic Infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 93-104, 1997.

PACHECO, P.; BOZZA, F.A.; GOMES, R.N.; BOZZA, M.; WELLER, P.F.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T. Lipopolysaccharide-induced leukocyte lipid body formation in vivo: innate immunity elicited intracellular loci involved in eicosanoid metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 11, p. 6498-6506, 2002.

PACHECO, R.G.; LENZI, H.L. Systemic Modulation of Peripheral Eosinophilia (Air Pouch Model) in *Schistosoma mansoni* Infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 2, p. 165-172, 1997.

PADIGEL, U.M.; LEE, J.J.; NOLAN, T.J.; SCHAD, G.A.; ABRAHAM, D. Eosinophils can function as antigen presenting cells to induce primary and secondary immune responses to *Strongyloides stercoralis*. **Infection and Immunity**, v. 74, p. 3232-3238, 2006.

PAGOLA, S.; STEPHENS, P.W.; BOHLE, D.S.; KOSAR, A.D.; MADSEN, S.K. The structure of malaria pigment betahaematin. **Nature**, v. 404, p. 307-310, 2000.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The Immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews – Immunology**, v. 2, p. 499-511, 2002.

PEARCE, E.J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite Immunology**, v. 27, p. 265-270, 2005.

PERALTA, R.H.S.; MELO, D.G.S.; GONÇALVES, M.M.L.; D'ANDREA, P.S.; REY, L.; MACHADO-SILVA, J.R.; PERALTA, J.M. Serological Studies in *Nectomys Squamipes* demonstrate the low sensitivity of coprological exams for the diagnosis of schistosomiasis. **The Journal of Parasitology**, v. 95, p. 764-766, 2009.

PERRIN, P.J.; PHILLIPS, S.M. The molecular basis of granuloma formation in schistosomiasis. III. In vivo effects of a T cell-derived suppressor effector factor and IL-2 on granuloma formation. **The Journal of Immunology**, v. 143, n. 2, p. 649-654, 1989.

PERSSON, C.G.; ERJEFÄLT, J.S. "Ultimate activation" of eosinophils in vivo: lysis and release of clusters of free eosinophil granules (Cfegs). **Thorax**, v. 52, p. 569-574, 1997.

PEYRON, P.; VAUBOURGEIX, J.; POQUET, Y.; LEVILLAIN, F.; BOTANCH, C.; BARDOU, F.; DAFFÉ, M.; EMILE, J.F.; MARCHOU, B.; CARDONA, P.J.; CHASTELLIER, C.; ALTARE, F. Foamy Macrophages from Tuberculous Patients' Granulomas Constitute a Nutrient-Rich Reservoir for *M. tuberculosis* Persistence. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 11, e1000204, 2008.

PICOT, H. *Holochilus brasiliensis* and *Nectomys squamipes* (Rodentia: Cricetidae) natural hosts of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 4, p. 255-260, 1992.

PILIPONSKY, A.; GLEICH, G.; BAR, I.; LEVI-SCHAFFER, F. Effects of eosinophils on mast cells: a new pathway for the perpetuation of allergic inflammation. **Molecular Immunology**, v. 38, p. 1369, 2002.

PINTO-SILVA, R.A.; QUEIROZ, L.C.; AZEREDO, L.M.; SANTOS-SILVA, L.C.; LAMBERTUCCI, J.R. Ultrasound in schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 479-484, 2010.

PISCIOTTA, J.M.; PONDER, E.L.; FRIED, B.; SULLIVAN, D. Hemozoin formation in *Echinostoma trivolvis* rediva. **International Journal of Parasitology**, v. 35, n. 10, p. 1037-1042, 2005.

PLAGER, D.A.; LOEGERING, D.A.; CHECKEL, J.L. Major basic protein homolog (MBP2): a specific human eosinophil marker. **The Journal of Immunology**, v. 177, p. 7340-7345, 2006.

PLORIN, G.G.; GILBERTSON, D.E. Equation for describing growth of the schistosome host snail *Biomphalaria glabrata*. **Journal of Parasitology**, v. 70, p. 43-47, 1984.

POL, A.; GROSS, S.P.; PARTON, R.G. Biogenesis of the multifunctional lipid droplet: Lipids, proteins and sites. **The Journal of Cell Biology**, v. 204, n. 5, p. 635-646, 2014.

POPKEN-HARRIS, P.; CHECKEL, J.; LOEGERING, D.; MADDEN, B.; SPRINGETT, M.; KEPHART, G.; GLEICH, G.J. Regulation and Processing of a Precursor Form of Eosinophil Granule Major Basic Protein (ProMBP) in Differentiating Eosinophils. **Blood**, v. 92, p. 623-631, 1998.

RABELLO, A. Diagnosing Schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 5, p. 669-676, 1997.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology**, v. 43, n. 2, p. 54-62, 2006.

RAMASWAMY, K.; KUMAR, P.; HE, Y. A role for parasite-induced PGE2 in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Immunology**, v. 165, p. 4567-4574, 2000.

RASO, P.; BOGLIOLO, L. Patologia da esquistossomose mansoni. In: Cunha, A. S. **Esquistossomose mansoni**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1970, p. 77-130.

RASO, P.; RASO, L.A.M.; MELO, F.A.; TAFURI, W.L. *Schistosoma mansoni* granuloma in late evolutive phase, in a case of tumoral form in man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 627-632, 2012.

REY, L. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis transmission in Brazil. **Research and Reviews in Parasitology**, v. 53, n. 1-2, p. 13-25, 1993.

RIBEIRO, A.C.; MALDONADO JR., A.; D'ANDREA, P.S.; VIEIRA, G.O.; REY, L. Susceptibility of *Nectomys rattus* (Pelzen, 1883) to Experimental Infection with *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907): a Potential Reservoir in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n.1, p. 295-299, 1998.

RICCHI, M.; ODOARDI, M.R.; CARULLI, L.; ANZIVINO, C.; BALLESTRI, S.; PINETTI, A.; FANTONI, L.I.; MARRA, F.; BERTOLOTTI, M.; BANNI, S.; LONARDO, A.; CARULLI, N.; LORIA, P. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 24, n. 5, p. 830-840, 2009.

ROBENEK, H.; HOFNAGEL, O.; BUERS, I.; ROBENEK, M.J.; TROYER, D.; SEVERS, N.J. Adipophilin-enriched domains in the ER membrane are sites of lipid droplet biogenesis. **Journal of Cell Science**, v. 119, p. 4215-4224, 2006.

RODENHUIS-ZYBERT, I.A.; WILSCHUT, J.; SMIT, J.M. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, p. 2773-2786, 2010.

RODRIGUES-SILVA, R. ***Nectomys squamipes* e *Akodon arviculoides* (Rodentia: Cricetidae) como hospedeiros naturais do *Schistosoma mansoni* em Sumidouro (RJ – Brasil). Emprego do *Nectomys* como modelo alternativo no estudo da esquistossomose mansoni**. 1988. Dissertação de Mestrado, Fundação Oswaldo Cruz, 147 p., Rio de Janeiro, Brasil.

RODRIGUES-SILVA, R.; MACHADO-SILVA, J.R.; FAERSTEIN, N.F.; LENZI, H.L.; REY, L. Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni*: Parasitological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 271-276, 1992.

RODRIGUES-SILVA, R.; MACHADO E SILVA, J.R.; FAERSTEIN, N.F.; LENZI, H.L.; REY, L. Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni*. Parasitological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 271-276, 1992.

ROSENBERG, H.F.; DYER, K.D.; TIFFANY, H.L.; GONZALEZ, M. Rapid evolution of a unique family of primate ribonuclease genes. **Nature Genetics**, v. 10, p. 219-223, 1995.

ROSENBERG, H.F. The eosinophil ribonucleases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 54, p. 795-803, 1998.

ROSENBERG, H.F.; DOMACHOWSKE, J.B. Eosinophils, eosinophil ribonucleases, and their role in host defense against respiratory virus pathogens. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 70, p. 691-698, 2001.

ROSENBERG, H.F.; DYER, K.D.; FOSTER, P.S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. **Nature Reviews in Immunology**, v. 13, n. 1, p. 9-22, 2013.

ROTHENBERG, M.E. Gastrointestinal eosinophils. **Allergy**, v. 56, n. 67, p. 21-21, 2001.

ROTHENBERG, M.E.; HOGAN, S.P. The eosinophil. **Annual Reviews in Immunology**, v. 24, p. 147-174, 2006.

RUMBLEY, C.A.; ZEKAVAT, S.A.; SUGAYA, H.; PERRIN, P.J.; RAMADAN, M.A.; PHILLIPS, S.M. The schistosome granuloma: Characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production. **The Journal of Immunology**, v. 161, p. 4129-4137, 1998.

SAITO, H.; HATAKE, K.; DVORAK, A.M.; LEIFERMAN, K.M.; DONNENBERG, A.D.; ARAI, N.; ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T. Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 85, p. 2288-2292, 1988.

SALLUH, J.I.; PINO, A.V.; SILVA, A.R.; GOMES, R.N.; SOUZA, H.S.; SILVA, J.R.; JANDRE, F.C.; GIANNELLA-NETO, A.; ZIMMERMAN, G.A.; STAFFORINI, D.M.; PRESCOTT, S.M.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C.; BOZZA, P.T.; BOZZA, F.A. Lung production of platelet-activating factor acetylhydrolase in oleic acid-induced acute lung injury. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 77, p. 1-8, 2007.

SAMUELSSON, B.; DAHLÉN, S.E.; LINDGREN, J.A.; ROUZER, C.A.; SERHAN, C.N. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis and biological effects. **Science**, v. 237, n. 4819, p. 1171-1176, 1987.

SANTORI, R.T.; VIEIRA, M.V.; ROCHA-BARBOSA; O.; MAGNAN-NETO, J.A.; GOBBI, N. Water absorption of the fur and swimming behavior of semiaquatic and terrestrial oryzomine rodents. **Journal of Mammalogy**, v. 89, n. 5, p. 1152-1161, 2008.

SANTOS, R.O.; BARBOSA JR, A.A.; ANDRADE, Z.A. Dynamics of fibrosis production and resorption in intestinal schistosomiasis of mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 1, p. 25-31, 1992.

SCEPEK, S.; MOQBEL, R.; LINDAU, M. Compound exocytosis and cumulative degranulation by eosinophils and its role in parasite killing. **Parasitology Today**, v. 10, p. 276-278, 1994.

- SCHAFFER, J.E. Lipotoxicity: When tissues overeat. **Current Opinion in Lipidology**, v. 14, n. 3, p. 281-287, 2003.
- SCHWINGSHACKL, A.; DUSZYK, M.; BROWN, N.; MOQBEL, R. Human eosinophils release matrix metalloproteinase-9 on stimulation with TNF-alpha. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 104, p. 983-989, 1999.
- SHAMRI, R.; MELO, R.C.N.; YOUNG, K.M.; BIVAS-BENITA, M.; XENAKIS, J.J.; SPENCER, L.A., WELLER, P.F. CCL11 elicits secretion of RNases from mouse eosinophils and their cell-free granules. **FASEB Journal**, v. 26, p. 2084-2093, 2012.
- SHER, A.; COFFMAN, R.L.; HIENY, S.; SCOTT, P.; CHEEVER, A.W. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 87, p. 61-65, 1990.
- SEMSARI, M.C.; ESHRATKHAH, B.; MAHERISIS, N.; SADAGHIAN, M.; HASSANPOUR, S. Evaluation of Total Protein, Albumin, Globulin and Blood Urea Nitrogen Concentrations in Gastrointestinal Nematodes Infected Sheep. **Global Veterinaria**, v. 6, n. 5, p. 433-437, 2011.
- SHEKHAR, K.C. Schistosomiasis drug therapy and treatment considerations. **Drugs**, v. 42, n. 3, p. 379-405, 1991.
- SHENOY, N.G.; GLEICH, G.J.; THOMAS, L.L. Eosinophil major basic protein stimulates neutrophil superoxide production by a class IA phosphoinositide 3-kinase and protein kinase C-zeta-dependent pathway. **The Journal of Immunology**, v. 171, p. 3734-3741, 2003.
- SHI, H.Z.; HUMBLE, A.; GERARD, C.; JIN, Z.; WELLER, P.F. Lymph node trafficking and antigen presentation by endobronchial eosinophils. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, p. 945-953, 2000.
- SHI, H.Z.; XIAO, C.Q.; LI, C.Q.; MO, X.Y.; YANQ, Q.L.; LENQ, J.; CHEN, Y.Q. Endobronchial eosinophils preferentially stimulate T helper cell type 2 responses. **Allergy**, v. 59, n. 4, p. 428-435, 2004.
- SHTEYER, E.; LIAO, Y.; MUGLIA, L.J.; HRUZ, P.W.; RUDNICK, D.A. Disruption of hepatic adipogenesis is associated with impaired liver regeneration in mice. **Hepatology**, v. 40, n. 6, p. 1322-1332, 2004.
- SILVA, L.F. **Avaliação de teste imunológico e molecular para o diagnóstico da infecção pelo *Schistosoma mansoni* em indivíduos com baixa carga parasitária residentes de área endêmica, antes e após tratamento.** 2013. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 105 p., Rio de Janeiro, Brasil.
- SILVA, L.M.; FERNANDES, A.L.M.; BARBOSA JR, A.; OLIVEIRA, I.R.; ANDRADE, Z.A. Significance of Schistosomal Granuloma Modulation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 353-361, 2000.

SILVA, T.M.; ANDRADE, Z.A. Infecção natural de roedores silvestres pelo *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 227-235, 1989.

SIMOONGA, C.; UTZINGER, J.; BROOKER, S.; VOUNATSOU, P.; APPLETON, C.C.; STENSGAARD, A.S.; OLSEN, A.; KRISTENSEN, T.K. Remote sensing, geographical information system and spatial analysis for schistosomiasis epidemiology and ecology in Africa. **Parasitology**, v. 136, n. 13, p. 1683-1693, 2009.

SMEDSROD, B.; DE BLESER, P.J.; BRAET, F.; LOVISETTI, P.; VANDERKERKEN, K.; WISSE, E.; GEERTS, A. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. **Gut**, v. 35, n. 11, p. 1509-1516, 1994.

SMITH, W.L.; DEWITT, D.L.; GARAVITO, R.M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular and Molecular Biology. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, p.145-182, 2000.

SMITHERS, S.R. & TERRY, P.J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *S. mansoni* and the recovery of adult worms. **Parasitology**, v. 55, p. 701-710, 1965.

SOLOMON, A.; ALOE, L.; PE'ER, J.; FRUCHT-PERY, J.; BONINI, S.; LEVI-SCHAFFER, F. Nerve growth factor is preformed in and activates human peripheral blood eosinophils. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 102, p. 454-60, 1998.

SORGI, C.A.; SECATTO, A.; FONTANARI, C.; TURATO, W.M.; BELANGÉR, C.; DE MEDEIROS, A.; KASHIMA, S.; MARLEAU, S.; COVAS, D.T.; BOZZA, P.T.; FACCIOLI, L.H. *Histoplasma capsulatum* cell wall {beta}-glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B4 generation and role in HIV-1 infection. **The Journal of Immunology**, v. 182, n. 7, p. 4025-4035, 2009.

SOUZA, F.P.C.; VITORINO, R.R.; COSTA, A.P.; FARIA JÚNIOR, F.C.; SANTANA, L.A.; GOMES, A.P. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Revista Brasileira de Clínica Médica de São Paulo**, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

SOUZA, V.A.M.; SILVA, R.R.; MALDONADO JR, A.; MACHADO-SILVA, J.R.; REY, L. *Nectomys squamipes* (Rodentia - Cricetidae) as an experimental model for schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 277-280, 1992.

SPENCER, L.A.; MELO, R.C.N.; PEREZ, S.A.; BAFFORD, S.P.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Cytokine receptor-mediated trafficking of preformed IL-4 in eosinophils identifies an innate immune mechanism of cytokine secretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 103, p. 3333-3338, 2006.

SPENCER, L.A.; WELLER, P.F. Eosinophils and Th2 immunity: contemporary insights. **Immunology and Cell Biology**, v. 88, p. 250-256, 2010.

SPENCER, L.A.; BONJOUR, K.; MELO, R.C.N.; WELLER, P.F. Eosinophil secretion of granule-derived cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. 496, p. 1-9, 2014.

STEINBERG, B.E.; GRINSTEIN, S. Pathogen destruction versus intracellular survival: the role of lipids as phagosomal fate determinants. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 6, p. 2002-2011, 2008.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 411-425, 2006.

STURLEY, S.L.; HUSSAIN, M.M. Lipid droplet formation on opposing sides of the endoplasmic reticulum. **Journal of Lipid Research**, v. 53, n. 9, p. 1800-1810, 2012.

STURMEY, R.G.; O'TOOLE, P.J.; LEESE, H.J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: Lipid association in the porcine oocyte. **Reproduction**, v. 132, n. 6, p. 829-837, 2006.

SUTHERST, R.W. Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 136-173, 2004.

SUZUKI, M.; SHINOHARA, Y.; OHSAKI, Y.; FUJIMOTO, T. Lipid droplets: size matters. **Journal of Electron Microscopy**, v. 60, n. 1, p. 101-116, 2011.

SWARTZ, J.M.; BYSTROM, J.; DYER, K.D.; NITTO, T.; WYNN, T.A.; ROSENBERG, H.F. Plasminogen activator inhibitor 2 (PAI-2) in eosinophilic leukocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 76, p. 812-819, 2004.

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

TACHIMOTO, H.; BOCHNER, B.S. The surface phenotype of human eosinophils. **Chemical Immunology**, v. 76, p. 45-62, 2000.

TAJIRIAN, A.; ROSS, R.; ZEIKUS, P.; ROBINSON-BOSTOM, L. Subcutaneous fat necrosis of the newborn with eosinophilic granules. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 34, p. 588-590, 2007.

TAUCHI-SATO, K.; OZEKI, S.; HOUJOU, T.; TAGUCHI, R.; FUJIMOTO, T. The Surface of Lipid Droplets is a Phospholipid Monolayer with a Unique Fatty Acid Composition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 46, p. 44507-44512, 2002.

TEMPONE, A.J.; BIANCONI, M.L.; RUMJANEK, F.D. The interaction of human LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. **Molecular Cell Biochemistry**, v. 177, p. 139-144, 1997.

TERNESS, P.; BAUER, T.M.; RÖSE, L.; DUFTER, C.; WATZLIK, A.; SIMON, H.; OPELZ, G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 196, p. 447-457, 2002.

THAPA, B.R.; WALIA, A. Liver Function Tests and their Interpretation. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 74, p. 663-671, 2007.

THORNE, K. J. I.; MAZZA, G. Eosinophilia, activated eosinophils and human schistosomiasis. **Journal of Cell Science**, v. 98, p. 265-270, 1991.

TOYODA, M.; MARUYAMA, T.; MOROHASHI, M.; BHAWAN, J. Free eosinophil granules in urticaria: a correlation with the duration of wheals. **American Journal of Dermatopathology**, v. 18, p. 49-57, 1996.

TRAUB, L.M.; KORNFELD, S. The trans-Golgi network: a late secretory sorting station. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 527-533, 1997.

TRUSCOTT, M.; EVANS, D.A.; GUNN, M.; HOFFMANN, K.F. *Schistosoma mansoni* Hemozoin Modulates Alternative Activation of Macrophages via Specific Suppression of Retnla Expression and Secretion. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p. 133-142, 2013.

UEKI, S.; MELO, R.C.N.; GHIRAN, I.; SPENCER, L.A.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Eosinophil extracellular DNA trap cell death mediates lytic release of free secretion-competent eosinophil granules in humans. **Blood**, v. 121, n. 11, p. 2074-2083, 2013.

ULLER, L.; ANDERSSON, M.; GREIFF, L.; PERSSON, C.G.; ERJEFÄLT, J.S. Occurrence of apoptosis, secondary necrosis, and cytolysis in eosinophilic nasal polyps. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 170, p. 742-747, 2004.

VAN HELLEMOND, J.J.; RETRA, K.; BROUWERS, J.F.H.M.; VAN BALKOM, B.W.M.; YAZDANBAKHSH, M.; SHOEMAKER, C.B.; TIELENS, A.G.M. Functions of the tegument of schistosomes: Clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology**, v. 36, p. 691-699, 2006.

VAN LIESHOUT, L.; POLDERMAN, A.M.; DEELDER, A.M. Immunodiagnosis of schistosomiasis by determination of the circulating antigens CAA and CCA, in particular in individuals with recent or light infections. **Acta Tropica**, v. 77, p. 69-80, 2000.

VASCONCELLOS, A.S. **O estímulo ao forrageamento com fator de enriquecimento ambiental para lobos-guarás: efeitos comportamentais e hormonais**. 2009. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 138 p., São Paulo, Brasil.

VASCONCELOS, C.H.; CARDOSO, P.C.M.; QUIRINO, W.C.; MASSARA, C.L.; AMARAL, G.L.; CORDEIRO, R.; CARVALHO, O.S. Evaluation of Schistosomiasis

mansonii control measures in Sabará, Minas Gerais State, Brazil, 1980-2007. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, n. 5, p. 997-1006, 2009.

VENGE, P.; BYSTROM, J.; CARLSON, M.; HAKANSSON, L.; KARAWACZYK, M. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 29, p. 1172-1186, 1999.

WALSH, G.M. Eosinophil granule proteins and their role in disease. **Current Opinion in Hematology**, v. 8, p. 28-33, 2001.

WALTHER, T.C.; FARESE JR, R.V. Lipid droplets and cellular lipid metabolism. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, p. 687-714, 2012.

WAN, H.C.; MELO, R.C.; JIN, Z.; DVORAK, A.M.; WELLER, P.F. Roles and origins of leukocyte lipid bodies: proteomic and ultrastructural studies. **Faseb Journal**, v. 21, n. 1, p. 167-178, 2007.

WANG, D.; WEI, Y.; PAGLIASSOTTI, M.J. Saturated Fatty Acids Promote Endoplasmic Reticulum Stress and Liver Injury in Rats with Hepatic Steatosis. **Endocrinology**, v. 147, n. 2, p. 943-951, 2006.

WANG, H.B.; GHIRAN, I.; MATTHAEI, K.; WELLER, P.F. Airway eosinophils: allergic inflammation recruited professional antigen-presenting cells. **The Journal of Immunology**, v. 179, p. 7585-7592, 2007.

WANG H.B.; WELLER P.F. Pivotal advance: eosinophils mediate early alum adjuvant-elicited B cell priming and IgM production. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 817-821, 2008.

WASMOEN, T.L.; BELL, M.P.; LOEGERING, D.A.; GLEICH, G.J.; PRENDERGAST, F.G.; MCKEAN, D.J. Biochemical and amino acid sequence analysis of human eosinophil granule major basic protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, p. 12559-12563, 1988.

WATANABE, K.; MISU, T.; INOUE, S.; EDAMATSU, H. Cytolysis of eosinophils in nasal secretions. **Annals of Otolaryngology and Rhinology**, v. 112, p. 169-173, 2003.

WATKINS, P.A.; MAIGUEL, D.; JIA, Z.; PEVSNER, J. Evidence for 26 distinct acyl-coenzyme A synthetase genes in the human genome. **Journal of Lipid Research**, v. 48, n. 12, p. 2736-2750, 2007.

WEBER, D.K.; DANIELSON, K.; WRIGHT, S.; FOLEY, J.E. Hematology and serum biochemistry values of dusky-footed wood rat (*Neotoma fuscipes*). **Journal of Wildlife Diseases**, v. 38, n. 3, p. 576-582, 2002.

WEINSTOCK, J.V.; BOROS, D.L. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansonii. **The Journal of Immunology**, v. 130, p. 418-422, 1983.

WEINSTOCK, J.V.; BLUM, A.; WALDER, J.; WALDER, R. Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis mansoni produce substance P. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 3, p. 961-966, 1988.

WELLER, P.F.; MONAHAN-EARLEY, R.A.; DVORAK, H.F.; DVORAK, A.M. Cytoplasmic Lipid Bodies of Human Eosinophils-Subcellular Isolation and Analysis of Arachidonate Incorporation. **American Journal of Pathology**, v. 138, n. 1, p. 141-148, 1991.

WELTE, M.A. Proteins under new management: Lipid droplets deliver. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 8, p. 363-369, 2007.

WELTE, M.A. Fat on the move: Intracellular motion of lipid droplets. **Biochemical Society Transactions**, v. 37, n. 5, p. 991-996, 2009.

WHO **Report of the WHO Informal Consultation on Schistosomiasis Control**. Geneva, Switzerland, 1998.

WHO **The Social Context of Schistosomiasis and Its Control**. Geneva, Switzerland, 2008.

WHO **Schistosomiasis Progress Report 2001-2011 and Strategic Plan 2012-2020**. Geneva, Switzerland, 2011.

WHO, 2015. <http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Acesso em: 02 mar. 2015.

WICK, G.; GRUNDTMAN, C.; MAYERL, C.; WIMPISSINGER, T.F.; FEICHTINGER, J.; ZELGER, B.; SGONC, R.; WOLFRAM, D. The immunology of fibrosis. **Annual Review of Immunology**, v. 31, p. 107-135, 2013.

WILSON, S.; VENNERVALD, B.J.; DUNNE, D.W. Chronic Hepatosplenomegaly in African School Children: A Common but Neglected Morbidity Associated with Schistosomiasis and Malaria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, e1149, 2011.

WU, D.; MOLOFSKY, A.B.; LIANG, H.E.; RICARDO-GONZALEZ, R.R.; JOUIHAN, H.A.; BANDO, J.K. Eosinophils sustain adipose alternatively activated macrophages associated with glucose homeostasis. **Science**, v. 332, p. 243-247, 2011.

WYMANN, M.P.; SCHNEITER, R. Lipid signalling in disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 2, p. 162-176, 2008.

WYNN, T.A.; THOMPSON, R.W.; CHEEVER, A.W.; MENTINK-KANE, M.M. Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunology Reviews**, v. 201, p. 156-167, 2004.

YANG, D.; ROSENBERG, H.F.; CHEN, Q.; DYER, K.D.; KUROSAKA, K.; OPPENHEIM, J.J. Eosinophil-derived neurotoxin (EDN), an antimicrobial protein with chemotactic activities for dendritic cells. **Blood**, v. 102, p. 3396-3403, 2003.

YOUNG, J.D.; PETERSON, C.G.; VENGE, P.; COHN, Z.A. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. **Nature**, v. 321, p. 613-616, 1986.

ZECHNER, R.; KIENESBERGER, P.C.; HAEMMERLE, G.; ZIMMERMANN, R.; LASS, A. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. 1, p. 3-21, 2009.

ZWEYTICK, D.; ATHENSTAEDT, K.; DAUM, G. Intracellular lipid particles of eukaryotic cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, n. 2, p. 101-120, 2000.