

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MATHEUS PEREIRA DE ARAÚJO**

ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO  
DO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO NA COINFECÇÃO POR *Schistosoma*  
*mansoni* E *Paracoccidioides brasiliensis* em modelo murino.

Alfenas/MG  
2016

MATHEUS PEREIRA DE ARAÚJO

ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DO DESENVOLVIMENTO  
DO GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO NA COINFECÇÃO POR *Schistosoma*  
*mansoni* E *Paracoccidioides brasiliensis* em modelo murino.

Dissertação apresentada ao Programa de Biociências  
Aplicadas à Saúde como requisito para obtenção do  
título de Mestre pela Universidade Federal de Alfenas.  
Área de concentração: Doenças infecciosas e  
parasitárias.  
Orientador (a): Prof<sup>a</sup> Dra. Raquel Lopes Martins Souza  
Coorientador (a): Prof<sup>a</sup> Dra. Eva Burger

Alfenas/MG  
2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Araújo, Matheus Pereira de

Aspectos histopatológicos e imunológicos do desenvolvimento do granuloma esquistossomótico na coinfeção por *Schistosoma mansoni* e *Paracoccidoides brasiliensis* em modelo murino/ Matheus Pereira de Araújo. -- Alfenas/MG, 2016.

70 f.

Orientadora: Raquel Lopes Martins Souza.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) -  
Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Esquistossomose. 2. Paracoccidiodomicose. 3. Granuloma. I. Raquel Lopes Martins Souza. II. Título.

CDD-616.96

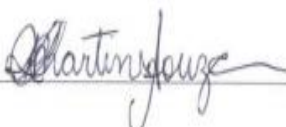
MATHEUS PEREIRA DE ARAÚJO

“ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS E IMUNOLÓGICOS DA COINFECÇÃO POR  
*Schistosoma mansoni* E *Paracoccidioides brasiliensis* EM MODELO MURINO”.

A Banca Examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde pela Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Aprovado em: 16/09/2016


Profª. Dra. Raquel Lopes Martins Souza  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Rômulo Dias Novaes  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas  
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profª. Dra. Usha Vashist  
Instituição: Instituto federal de Educação,  
Ciências e Tecnologia do Sul de Minas.

Assinatura: 

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por tantas oportunidades, por indicar o caminho, e ser a luz que me guia para fazer o bem;

Aos meu pais, Maria e André, meus irmãos, André Jr. e Rangelly, minha madrinha, Maria Amélia e Tio Nicola (In Memoriam) que sempre me apoiaram para continuar meus estudos, e não mediram esforços para que eu concluísse mais esta etapa;

À Universidade Federal de Alfenas, e ao programa de pós-graduação em Biociências Aplicadas à Saúde, por tantas portas abertas desde minha chegada em Alfenas;

À orientadora Raquel Lopes Martins Souza, pela amizade, apoio, e por me ensinar os caminhos para ser um pesquisador;

À coorientadora Eva Burger, pela orientação, apoio e por tantos conhecimentos compartilhados;

À TAE Maria Ângela Rodrigues, pela orientação, paciência e amizade;

À TAE Marilene Lopes Ângelo, por tantas conversas, desabafos de ombro amigo e vitórias;

Aos professores Rômulo Dias Novaes, Ivo Santana Caldas, Felipe Fornias Sperandio e Livia de Figueiredo Diniz Castro por toda ajuda no crescimento deste trabalho;

Às amigas e mestres Ana Carolina Silvério Cerqueira Mendes e Giulia Maria Alencar de Castro Bani, por ensinarem os primeiros passos, e me mostrarem que somente o trabalho em equipe nos faz seguir em frente;

À companheira de bancada Amanda Ami Akatuti, pela amizade, exemplo de dedicação e seriedade no trabalho que desenvolve;

Às acadêmicas de iniciação científica dos cursos de biomedicina e farmácia que contribuíram para o término deste trabalho;

A todos dos Laboratórios de Parasitologia e de Patologia da Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade de trabalharmos juntos, e por me aceitarem como parte da equipe;

Aos meus amigos (são tantos!) que tanto contribuíram para que eu chegasse até aqui;

A todos aqueles que compartilharam um pouco do seu conhecimento, agradeço, e sou eternamente grato.

## RESUMO

A esquistossomose, doença causada pelo parasito *Schistosoma mansoni*, é um problema de saúde mundial. A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica humana, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, e pode coinfetar o hospedeiro portador de *S. mansoni*. Na infecção por *S. mansoni*, o sistema imune do hospedeiro pode estar suprimido, o que acarreta uma defesa insuficiente para eliminação de outros microrganismos. Até o momento, existem poucos trabalhos que descrevem a evolução da esquistossomose e da paracoccidioidomicose em casos de coinfeção. Além disto, devido a correntes migratórias, indivíduos de áreas endêmicas para esquistossomose podem se instalar em áreas endêmicas para PCM e vice versa. Considerando estes antecedentes, este trabalho teve como objetivo analisar aspectos histopatológicos e imunológicos do desenvolvimento do granuloma esquistossomótico durante a coinfeção. Para isto, camundongos Swiss fêmeas foram separados em 4 grupos para fase aguda e 4 grupos para fase crônica, com 10 animais em cada: controle não infectado - CNI, infectado com *S. mansoni* - Sm, infectado com *P. brasiliensis* - Pb, coinfetado - Sm+Pb, ambos em fase crônica, e coinfetados sendo Sm fase crônica e Pb fase aguda - Sm(c)+Pb(a). Os camundongos foram necropsiados após 50 (fase aguda) e 120 dias (fase crônica) para análise quanto ao peso, sobrevivência, desenvolvimento do granuloma e produção de citocinas. Em relação ao peso, observou-se que não houve alterações no peso dos camundongos após 50 dias. Já para a fase crônica, foi observado ganho significativo de peso no grupo Pb. Para a sobrevivência, em fase aguda, observou-se 10% de óbitos no grupo Sm. Já para fase crônica, 50% de óbitos para o grupo Sm, 60% do grupo Sm+Pb e 50% do grupo Sm(c)+Pb(a) foram observados ao final do experimento. A ocorrência da coinfeção foi evidenciada a partir da visualização de granulomas no fígado e no pulmão, e a presença de fungo no epiplon. A contagem de granulomas no fígado (fase aguda e crônica) e pulmão (fase crônica), não apresentou diferenças significativas. Em relação ao diâmetro dos granulomas no fígado em fase aguda, estes foram significativamente maiores no grupo Sm ( $0,08 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ ) quando comparado ao grupo Sm+Pb ( $0,06 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ ). Na fase crônica, o diâmetro foi significativamente maior quando comparados os grupos Sm+Pb ( $0,03 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ ) ao Sm(c)+Pb(a) ( $0,02 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ ). Em relação ao pulmão, houve diferenças significativas elevadas quando comparados os

grupos Sm ( $0,01\pm 0,009\text{mm}^2$ ) com Sm+Pb ( $0,03\pm 0,01\text{mm}^2$ ) e Sm(C)+Pb(A) ( $0,03\pm 0,02\text{mm}^2$ ). Foram evidenciadas células mononucleares e polimorfonucleares nos granulomas de fígado e pulmão em todos os grupos estudados, tanto em fase aguda e crônica. Em fase aguda, a contagem de eosinófilos e neutrófilos não obteve diferenças significativas em relação aos tipos celulares, apesar de um número maior de neutrófilos serem observados no grupo Sm+Pb ( $7,82\pm 5,95$ ). Na fase crônica, verificamos que no grupo Sm houve um predomínio significativo de eosinófilos ( $17,34\pm 6,71$ ), enquanto nos grupos Sm+Pb e Sm(c)+Pb(a) o predomínio foi de neutrófilos ( $18,82\pm 8,18$  e  $12,72\pm 4,44$ , respectivamente). No pulmão, não houve diferença em relação ao número de eosinófilos presentes nos granulomas, já o número de neutrófilos no grupo Sm(c)+Pb(a) ( $2,66\pm 2,71$ ) que foi significativamente menor em comparação aos grupos Sm ( $9,62\pm 7,76$ ) e Sm+Pb ( $8,06\pm 5,40$ ). Os resultados da análise de citocinas nos diferentes grupos mostram um aumento significativo de IFN- $\gamma$  nos grupos Sm ( $8,05\pm 3,52\text{ng/ml}$ ) e Pb ( $10,40\pm 3,549\text{ng/ml}$ ) em relação ao CNI ( $1,14\pm 0,48\text{ ng/ml}$ ). A citocina IL-2 apresentou níveis significativamente mais elevados nos grupos Sm ( $6,71\pm 1,50\text{ng/ml}$ ), Pb ( $10,40\pm 3,54\text{ng/ml}$ ) e Sm+Pb ( $7,32\pm 2,93\text{ng/ml}$ ), quando comparados ao grupo CNI ( $2,01\pm 0,39\text{ng/ml}$ ). Para IL-4, houve diferenças significativas elevadas entre os grupo Sm ( $10,45\pm 3,67\text{ng/ml}$ ) quando comparados ao grupo CNI ( $0,85\pm 0,15\text{ng/ml}$ ). Para IL-5, diferenças significativas foram encontradas nos grupos Sm ( $3,91\pm 0,61\text{ng/ml}$ ), Pb ( $3,98\pm 1,76\text{ ng/ml}$ ) e Sm+Pb ( $4,28\pm 2,22\text{ng/ml}$ ), quando comparados ao CNI ( $0,67\pm 0,21\text{ng/ml}$ ). Em fase crônica, foram observados níveis significativamente elevados de IFN- $\gamma$  no grupo Sm ( $10,45\pm 3,67\text{ng/ml}$ ) comparado ao CNI ( $1,14\pm 0,48\text{ng/ml}$ ). Para IL-2, houve diferenças significativas elevadas nos grupos Sm ( $7,90\pm 3,16\text{ng/ml}$ ) e Pb ( $7,54\pm 1,41\text{ng/ml}$ ), quando comparados ao CNI ( $2,01\pm 0,39\text{ng/ml}$ ). Para IL-4 e IL-5, diferenças significativas elevadas foram observadas para o grupo Sm ( $8,46\pm 3,71\text{ng/ml}$  e  $4,47\pm 1,88\text{ng/ml}$ , respectivamente) quando comparados ao CNI ( $0,85\pm 0,15\text{ng/ml}$  e  $0,67\pm 0,21\text{ ng/ml}$ , respectivamente). Em relação a MIP-2, não foram observados diferenças significativas entre os grupos, tanto para fase aguda e crônica. Sendo assim, os dados sugerem que a coinfeção por *P. brasiliensis* pode influenciar na composição celular dos granulomas esquistossomóticos e nos níveis de citocinas.

Palavras-chave: Esquistossomose. Paracoccidiodomicose. Granuloma.

## ABSTRACT

Schistosomiasis, also known as snail fever, a disease caused by the parasite *Schistosoma mansoni*, is a worldwide health issue. Paracoccidioidomycosis (PCM) is a human systemic mycosis caused by the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and it may coinfect the bearing host of *S. mansoni*. In the coinfection by *S. mansoni*, the host immune system may be suppressed which results in an insufficient defense in order to obliterate other microorganisms. There are few studies so far describing the evolution of schistosomiasis and paracoccidioidomycosis in the case of coinfection. Furthermore, due to migration, people from schistosomiasis endemic areas may settle down in PCM endemic areas and vice versa. Considering the given background, this study had as main goal the analysis of histopathological and immunological aspects of the development of schistosomotic granuloma under the coinfection. Thereunto, Swiss female mice were separated in four groups for acute phase and five groups for chronic phase containing ten animals each: control not infected - CNI, infected with *S. mansoni* - Sm, infected with *P. brasiliensis* - Pb, coinfecting - Sm+Pb, both in chronic phase, and coinfecting Sm in chronic phase and Pb in acute phase - Sm(c)+Pb(a). The mice were necropsied after 50 days (acute phase) and 120 days (chronic phase) for analysis concerning their weight, survival rate, granuloma development and cytokine production. Regarding the weight, it was observed the Pb group had gained significantly weight ( $26,23 \pm 5,36g$ ). Concerning the survival rate, in acute phase, it was observed 10% of deaths in the Sm group; as for the chronic phase, 50% of deceased for Sm group, 60% for Sm+Pb group and 50% for Sm(c)+Pb(a) by the end of the experiment. The coinfection occurrence was demonstrated by granuloma visualization in the liver and lung, and presence of the fungus in the omentum. The granuloma count in the liver (acute and chronic phases) and lung (chronic phase) did not display any meaningful differences. Regarding the diameter of the granulomas in the liver in acute phase, it was meaningfully bigger than Sm group ( $0,08 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ ) when compared to Sm+Pb group ( $0,06 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ ). In the chronic phase, the diameter was quite bigger when compared to Sm+Pb ( $0,03 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ ) and Sm(c)+Pb(a) ( $0,02 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ ) groups. Toward the lung, there were high significant differences when compared Sm groups ( $0,01 \pm 0,009 \text{ mm}^2$ ) with Sm+Pb ( $0,03 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ ) and Sm(C)+Pb(A) ( $0,03 \pm 0,02 \text{ mm}^2$ ). Mononuclear and polymorphnuclear cells of liver and lung granulomas were evidenced in all groups both in acute and chronic phases. In acute phase, the eosinophil



and neutrophils counts did not have meaningful distinctions regarding the cell types, although a bigger number of neutrophils were observed in Sm+Pb group ( $7,82\pm 5,95$ ). In chronic phase, it was verified a distinguished prevalence of eosinophils ( $17,34\pm 6,71$ ) in Sm group, whilst Sm+Pb and Sm(c)+Pb(a) groups neutrophils prevailed ( $18,82\pm 8,18$  e  $12,72\pm 4,44$ , respectively). In the lung, there were not any differences in regard of eosinophil number in granulomas, while the number of neutrophils in Sm(c)+Pb(a) group ( $2,66\pm 2,71$ ) was really smaller than Sm ( $9,62\pm 7,76$ ) and Sm+Pb ( $8,06\pm 5,40$ ) groups. The results of cytokine analysis from those different groups display a distinguished augmentation of IFN- $\gamma$  in Sm ( $8,05\pm 3,52$ ng/ml) and Pb ( $10,40\pm 3,54$ ng/ml) groups regarding the CNI ( $1,14\pm 0,48$  ng/ml), however this increase observed in Sm+Pb group ( $4,96\pm 1,73$ ng/ml) wasn't meaningful at all. The cytokine IL-2 displayed notably higher levels in Sm ( $6,71\pm 1,50$ ng/ml), Pb ( $10,40 \pm 3,54$ ng/ml) and Sm+Pb groups ( $7,32\pm 2,93$ ng/ml) when compared to CNI ( $2,01\pm 0,39$ ng/ml). As for IL-4, there were expressive high differences between Sm ( $10,45\pm 3,67$ ng/ml), Pb ( $3,98\pm 1,76$  ng/ml) and Sm+Pb groups ( $4,28\pm 2,22$ ng/ml) regarding CNI ( $0,67\pm 0,21$ ng/ml). For IL-5, significant differences were found in groups Sm ( $3,91 \pm 0,61$ ng / ml), Pb ( $3,98 \pm 1,76$  ng / ml) and Sm + Pb ( $4,28 \pm 2,22$ ng / ml) compared to the CNI ( $0,67 \pm 0,21$ ng / ml). In chronic phase, it was observed denoting high levels of IFN- $\gamma$  in Sm group ( $10,45\pm 3,67$ ng/ml) when compared to CNI ( $1,14\pm 0,48$ ng/ml). Concerning IL-2, there were compelling differences from Sm ( $7,90\pm 3,16$ ng/ml) and Pb groups ( $7,54\pm 1,41$ ng/ml), in regard of CNI ( $2,01\pm 0,39$ ng/ml). As for IL-4 and IL-5, expressively high distinctions were observed in Sm ( $8,46\pm 3,71$ ng/ml and  $4,47\pm 1,88$ ng/ml, respectively) concerning CNI ( $0,85\pm 0,15$ ng/ml and  $0,67\pm 0,21$  ng/ml, respectively). Regarding MIP-2, it was not observed any important differences among the groups as for the acute or chronic phases, nevertheless these display higher levels in acute phase rather than in chronic phase. Thus, the data suggest the coinfection by *P. brasiliensis* may affect the cellular composition from schistosomotic granulomas and cytokine levels.

Keywords: Schistosomiasis. Paracoccidioidomycosis. Granuloma.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Peso médio dos camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> , inoculados com <i>P. brasiliensis</i> , e coinfectados <i>S. mansoni</i> e <i>P. brasiliensis</i> em fase aguda à partir dia 0 (início do experimento) ao dia 120 (final do experimento).....	32
Figura 2 -	Granulomas esquistossomóticos hepáticos em camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> e coinfectados com <i>P. brasiliensis</i> corados com Hematoxilina e Eosina.....	34
Figura 3 -	Morfologia do epiplon em camundongos coinfectados por <i>S. mansoni</i> e <i>P. brasiliensis</i> , corados com Grocott.....	35
Figura 4 -	Número de granulomas no fígado em fase aguda.....	36
Figura 5 -	Área dos granulomas esquistossomóticos no fígado em fase aguda.....	37
Figura 6 -	Granulomas esquistossomóticos hepáticos em camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> e coinfectados com <i>P. brasiliensis</i> corados com Hematoxilina e Eosina.....	38
Figura 7 -	Contagem do número de eosinófilos no fígado.....	39
Figura 8 -	Perfil da dosagem de citocina IFN- $\gamma$ , IL-2, MIP-2, IL-4 e IL-5 em soro de camundongo infectado e analisado em fase aguda.....	40
Figura 9 -	Granulomas esquistossomóticos hepáticos em camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> e coinfectados com <i>P. brasiliensis</i> corados com Hematoxilina e Eosina.....	41
Figura 10 -	Análise de granulomas esquistossomóticos em tecido pulmonar corados com Hematoxilina e Eosina (HE).....	42
Figura 11 -	Número de granulomas no fígado em fase crônica.....	43
Figura 12 -	Número de granulomas no pulmão em fase crônica.....	44
Figura 13	Área dos granulomas esquistossomóticos no fígado em fase crônica.....	45
Figura 14 -	Área dos granulomas esquistossomóticos no pulmão em fase crônica.....	46
Figura 15 -	Granulomas esquistossomóticos hepáticos em camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> e coinfectados com <i>P. brasiliensis</i>	

	corados com Hematoxilina e Eosina.....	47
Figura 16 -	Granulomas esquistossomóticos pulmonar em camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> e coinfectados com <i>P. brasiliensis</i> corados com Hematoxilina e Eosina.....	48
Figura 17 -	Contagem do número de eosinófilos no fígado.....	49
Figura 18 -	Contagem do número de eosinófilos no pulmão.....	50
Figura 19 -	Perfil da dosagem de citocina IFN- $\gamma$ , IL-2, MIP-2, IL-4 e IL-5 em soro de camundongo infectado e analisado em fase crônica.....	51

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Data de infecção, inoculação e necropsia dos camundongos.....	27
Tabela 2 -	Análise da sobrevivência dos camundongos em fase aguda e crônica para camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> , <i>P. brasiliensis</i> , e coinfectados com <i>S. mansoni</i> e <i>P. brasiliensis</i> .....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS

CNI	-Controle não infectado
IL-1	-Interleucina 1
IL-2	-Interleucina 2
IL-4	-Interleucina 4
IL-5	-Interleucina 5
IL-6	-Interleucina 6
IL-10	-Interleucina 10
IL-12	-Interleucina 12
IL-23	-Interleucina 23
IFN- $\gamma$	-Interferon gama
LPS	-Lipopolissacarídeo
Nk	-Natural killer
PMN	-Células polimorfonucleares
MN	-Células mononucleares
Pb18	-Cepa 18 de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
PCM	-Paracoccidioidomicose
SEA	-Antígeno solúvel do ovo
TCD4	-Linfócitos TCD4- Linfócitos TCD4
TCD8	-Linfócitos TCD8
Th1	-Linfócitos T helper 1
Th2	-Linfócitos T helper 2
Th17	-Linfócitos T helper 17
TNF- $\alpha$	-Tumoral Alfa

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
1.1	Esquistossomose	15
1.2	Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	16
1.3	Granuloma	17
1.4	Resposta imunológica	18
1.5	Coinfecção experimental e humana com microrganismos	20
1.6	Coinfecções com <i>Schistosoma mansoni</i>	21
1.7	Paracoccidiodomicose	22
1.8	Resposta imune ao <i>P. brasiliensis</i>	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	26
2.1	Objetivos gerais	26
2.2	Objetivos específicos	26
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	27
3.1	Delineamento experimental	27
3.2	Animais	28
3.3	Infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	28
3.4	Inoculação com <i>Paracoccidiodides brasiliensis</i>	28
3.6	Captura de fotos, contagem e medição do diâmetro de granulomas	29
3.7	Contagem diferencial de células que compõem o granuloma	30
3.8	Sorologia - Dosagem das citocinas e quimiocina	30
3.9	Análise estatística	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	32
4.1	Análise do peso médio e sobrevida dos camundongos em fase aguda e crônica	32
<b>4.1.1</b>	<b>Ganho de peso</b>	32
<b>4.2.1</b>	<b>Número de granulomas</b>	35
<b>4.2.2</b>	<b>Área do granuloma</b>	36
<b>4.2.3</b>	<b>Células Polimorfonucleares e mononucleares</b>	37
<b>4.2.4</b>	<b>Análise da Celularidade</b>	38
<b>4.2.5</b>	<b>Citocinas em fase aguda</b>	39
4.3	Análise do desenvolvimento do granuloma esquistossomótico e dosagem de citocinas em fase crônica	40
<b>4.3.1</b>	<b>Número de granulomas</b>	42

<b>4.3.2</b>	<b>Área do granuloma.....</b>	<b>44</b>
<b>4.3.4</b>	<b>Análise da Celularidade.....</b>	<b>48</b>
<b>4.3.5</b>	<b>Citocinas em fase crônica.....</b>	<b>50</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>59</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>70</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença que afeta milhões de pessoas em várias regiões do mundo, regiões estas que muitas das vezes são endêmicas para outras doenças, o que torna o estudo da associação da esquistossomose com outras doenças de extrema importância. É sabido que a infecção pelo *S. mansoni* leva a modulação da resposta imune, em sua fase crônica, que pode agravar outras doenças. Desta forma, este trabalho irá confrontar dois agentes infecciosos com respostas imunológicas antagônicas, objetivando esclarecer a interferência da coinfeção no desenvolvimento do granuloma esquistossomótico, no que diz respeito a suas fases evolutivas e composição celular e no perfil de citocinas clássicas das respostas Th1 e Th2, o que caracteriza uma abordagem inédita.

### 1.1 Esquistossomose

A esquistossomose, doença infecciosa parasitária causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, apresenta o homem como principal reservatório, e um caramujo sendo o hospedeiro intermediário. A doença afeta mais de 200 milhões de pessoas em mais de 74 países, sendo de extrema importância seus estudos (RICHTER et al., 2015). No Brasil, a doença é relatada em 18 estados e no Distrito Federal, sendo que a presença de moluscos transmissores é o fator determinante para a transmissão da doença. Aproximadamente 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco para contrair a doença, principalmente as de zona rural, pois estão próximas a coleções de águas que podem conter o caramujo (BRASIL, 2009). Os estados das regiões Nordeste, Sudeste e Centro-oeste são os mais afetados, e sua prevalência, em certas regiões do Brasil, vai de 8 a 27% (PALMEIRA et al., 2010). Nestes estados, ocorrem fluxos migratórios de pessoas infectadas para áreas não endêmicas do país, o que justifica a implementação de um sistema de vigilância epidemiológica para o controle e prevenção (BRASIL, 2009).

A doença inicialmente pode ser assintomática, podendo atingir condições clínicas muito graves (BRASIL, 2009). Cinco espécies de esquistossomose podem infectar o homem: *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi*,



*Schistosoma intercalatum*, e *Schistosoma haematobium*. A ocorrência da doença está ligada às regiões tropicais e subtropicais, afetando principalmente faixas mais pobres da população devido às condições ineficientes de saneamento básico, somada à falta de informação por parte das autoridades em educar a população, e o próprio descaso da saúde pública, muitas vezes negligenciando o acesso à população ao saneamento básico, que pode levar milhões de pessoas a se contaminarem, e resultando até mesmo em morte, caso não tratada (HOTEZ; FENWICK, 2009; LENGELER et al., 2002).

A infecção pelo *S. mansoni* pode se desenvolver como uma forma aguda ou como uma doença crônica, quando não tratada. Na fase aguda, os sintomas mais frequentes são febre, tosse, diarreia e anorexia, que são considerados inespecíficos (COLLEY et al., 2014). Essa forma também é caracterizada pela presença de numerosos granulomas que ocorrem principalmente no fígado, mas podem ocorrer em outros órgãos, como pulmão e baço (LAMBERTUCCI, 2010). Já em fase crônica, muita das vezes, o indivíduo é assintomático, e as formas graves ou avançadas estão geralmente relacionadas à áreas endêmicas específicas (ANDRADE, 2008; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

A esquistossomose tem o segundo lugar, entre as doenças tropicais, sendo de grande importância e atenção da saúde pública, pois é uma enteroparasitose de elevada prevalência, e morbidade nos centros urbanos e rurais (WHO, 2006).

## 1.2 Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni* apresenta um complexo ciclo de vida, passando de um molusco como hospedeiro intermediário, ao ser humano, como hospedeiro definitivo. O hospedeiro infectado (homem) elimina os ovos do *S. mansoni* por meio das fezes, e ao entrar em contato com a água, o miracídio eclode do ovo, e esta larva ciliada, infecta o hospedeiro intermediário (caramujo). No Brasil existem três espécies de caramujo que participam da transmissão da doença: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*. Em um período de quatro a seis semanas, a larva miracídio se desenvolve passando pelo estágio de esporocisto, e ao final do desenvolvimento, é liberada pelo caramujo, como cercaria (COLLEY et al., 2014). Esta fica livre pelas águas

superficiais e infectam o hospedeiro definitivo por meio da penetração na pele ou na mucosa, onde perdem suas caudas e se modificam em esquistossômulos.

Os esquistossômulos caem na corrente sanguínea, e seguem em direção ao coração e pulmão. Após um período, são lançados por meio da circulação sanguínea para diversos órgãos, porém o fígado é o local preferido para a maturação do parasita, que atinge sua forma adulta no intestino. E neste local, macho e fêmea se acasalam, e esta inicia a postura de ovos (as fêmeas chegam a produzir cerca de 300 ovos por dia, os quais são levados para a circulação mesentérica). Parte dos ovos fica retido nos tecidos, e outros alcançam a luz do intestino, e são lançados no ambiente juntamente com as fezes, recomeçando seu ciclo (ANDRADE, 2008; BRASIL, 2009,).

### 1.3 Granuloma

Os ovos do *S. mansoni* dentro do organismo do hospedeiro são altamente viáveis e metabolicamente ativos. Os ovos que ficam aderidos aos vasos sanguíneos e em tecidos, comumente do fígado e intestino, induzem uma inflamação resultando em uma resposta granulomatosa, podendo causar morbidade e mortalidade associada à doença (DEF FRANCO et al., 2007).

No decorrer da esquistossomose, surge a doença granulomatosa. Após o acasalamento, os vermes adultos alojam-se em vasos mesentéricos, local em que a fêmea deposita seus ovos. Parte destes é eliminada no lúmen intestinal, porém, uma parte fica retida em outros órgãos, o que leva a uma reação inflamatória do tipo granulomatosa (MELO; ZECH, 2005). O granuloma esquistossomótico é uma estrutura dinâmica que tem início, meio e fim, caracterizando morfologicamente fases de amadurecimento e de involução. Lenzi e col. (2008) demonstraram que o granuloma esquistossomótico satisfaz as seguintes características de sistemas complexos: dinamismo; reconstrução e irreversibilidade; homeostasia e auto-organização. A composição celular em granulomas esquistossomóticos hepáticos se dá pela migração de células mononucleares, tais como, monócitos e macrófagos, células epitelióides, células gigantes e linfócitos (T, B, Nk); células polimorfonucleares, tais como, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos; além de fibroblastos e miofibroblastos. A partir de uma fase inicial desordenada, as células começam a arranjar-se em agregados selecionados, formando agregados hierárquicos, a

partir de uma desordem inicial (fase pré-granulomatosa), que envolve a participação de moléculas de adesão celular, como integrinas, selectinas, imunoglobulinas, caderina, ocludinas, conexinas, entre outras moléculas. Na fase madura do granuloma, chamada fase exsudativa-produtiva, caracterizada por um grande número de células migrantes (componente exsudativo) e locais (fibroblastos e miofibroblastos), que produzem vários componentes da matriz extracelular, o granuloma mostra um arranjo em três zonas distintas: central, para-central e periférica (LENZI; ROMANHA, 2008).

A larva presente no ovo do *S. mansoni* e o verme adulto liberam antígenos que estimulam o sistema imune do hospedeiro definitivo (PESSOA; MARTINS, 1988) resultando em uma imunopatologia associada à exacerbação da resposta imune ao redor dos ovos (ABBAS et al., 1996). Estudos realizados em animais demonstraram que a resposta ao redor dos granulomas esquistossomótico desenvolve-se em cinco estágios patológicos, que se inicia com reatividade fraca no recrutamento celular, passando para fase exsudativa (intenso recrutamento de células), exsudativo-produtiva (há um acúmulo de células polimorfonucleares - neutrófilos e eosinófilos - e células mononucleares – linfócitos e monócitos - circundando o ovo), estágio produtivo e finalizando em estágio de involução (com produção de fibrócitos ao redor do granuloma), com histiócitos e células epitelióides na periferia que substituem a zona leucocitária (HURST; WILLINGHAM; LINDBERG, 2000).

O ovo de *S. mansoni* começa a se degenerar e desintegrar no estágio produtivo, e fibrócitos e fibras de colágeno são observados em maior concentração. Células mononucleares como linfócitos, histiócitos, e algumas células polimorfonucleares como eosinófilos formam uma camada adicional na periferia da lesão. Há uma queda geral do número de células, e fibrócitos e fibras colágenas se tornam predominantes no local. Quando atinge o estágio involutivo, os granulomas possuem tamanho muito reduzido e exibem fibras colágenas, levando a calcificação dos ovos, com sua destruição. (STEINBERG, 1996).

#### 1.4 Resposta imunológica

Ao longo da infecção, ocorre uma resposta imune inicial Th1, sendo substituída por uma resposta Th2 após a oviposição (PEARCE, 1991). As células Th1 são produtoras

das citocinas IL-1, IL-2 e IFN- $\gamma$ , que estimulam um processo inflamatório e ativam principalmente macrófagos. Com os parasitas chegando à fase adulta, com fêmea albergada ao macho com acasalamento, e início da postura dos ovos (entre 5 e 6 semanas), há atenuação da resposta Th1 e aumento de uma resposta do tipo Th2, com produção das citocinas IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, ativando principalmente as células B, estimulando a produção de anticorpos (CHUAH et al., 2014; MOSMANN; COFFMAN, 1989).

Na fase aguda da esquistossomose são reconhecidos dois períodos evolutivos com manifestações clínicas bem distintas: o pré-patente (fase evolutiva pré-postural) e o pós-patente (fase evolutiva pós-postural). O período pré-patente ocorre, em média de trinta a sessenta dias após a infecção, quando ainda não há a postura de ovos pelas fêmeas (SILVA et al., 2008), já o pós-patente, que ocorre quando há detecção de ovos nas fezes, e se inicia em torno de 45 a 90 dias de infecção. Durante o período pré-patente a resposta imune é primeiramente do tipo Th1 estimulada por produtos excretados e secretados provenientes de esquistossômulos e de vermes adultos presentes no fígado e nas veias mesentéricas (PEARCE et al., 2004). A resposta imune adaptativa durante a fase pré-patente, tem como característica uma alta produção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, e de quimiocinas como a MIP-2, e uma menor produção de IL-4 e IL-5, ao contrário do que é observado durante a fase crônica da esquistossomose, a qual é caracterizada por uma baixa produção de IFN- $\gamma$  e um aumento da produção das citocinas da resposta imune Th2, como a IL-4 e IL-5 (JESUS et al., 2002).

Nas fases iniciais a resposta Th1 contribui para a formação do granuloma agudo, que continua seu desenvolvimento durante a resposta Th2 (STADECKER, 1999). Os granulomas então se formam com a evolução da doença da fase aguda para a fase crônica, na qual diminuem o seu tamanho em função do processo de imunomodulação (WYNN et al., 1998). Nessa fase as células TCD4<sup>+</sup> secretam citocinas que promovem a regulação do granuloma.

A resposta granulomatosa dos ovos é essencialmente comandada por células T CD4<sup>+</sup>. Porém, as células T CD8<sup>+</sup>, células B e macrófagos também desempenham uma função reguladora durante a formação do granuloma (FALLON et al., 1998; HERBERT et al., 2004; JANKOVIC et al., 1998;). Além disso, existem células T reguladores que atuam na redução da formação de granulomas impedindo ou reduzindo a proliferação celular (STAVITSKY, 2004).

Após a infecção, durante a migração de parasitas imaturos, a resposta imunológica é a Th2, com eosinofilia e hiperimunoglobulinemia, com estímulo a liberação de mediadores como a histamina e leucotrienos. Ao longo da infecção, após aproximadamente 120 dias, a resposta imunológica inicialmente Th1, é substituída pela Th2 após a ovoposição, indicando a importância que a IL 10 possui no controle do processo inflamatório (PEARCE, 1991). Nos seres humanos a fase aguda é caracterizada por uma doença febril, que ocorre antes do aparecimento de ovos nas fezes. Na fase crônica, os ovos que estão presos nos tecidos induzem a inflamação granulomatosa que, juntamente com a fibrose resultam na patologia da doença que levam a lesões vasculares obstrutivas (HAMS et al., 2013).

### 1.5 Coinfecção experimental e humana com microrganismos

A palavra coinfecção está relacionado ao organismo que sofre com duas ou mais doenças ao mesmo tempo, e pode ser devido a helmintos, protozoários, fungos, bactérias e vírus (BALMER; TANNER, 2011). As coinfeções irão manifestar de forma distinta ou somática, debilitando ainda mais o hospedeiro. Os hospedeiros estarão sujeitos à carga parasitária que os contaminarão, de forma que serão dependentes de fatores extrínsecos, tais como efeitos sazonais e temporais, assim como efeitos intrínsecos, como idade, sexo e o próprio sistema imune do hospedeiro (BEHNKE et al., 2005).

Quando um segundo parasita coabita junto a outro invasor, e induz uma resposta do sistema imune, pode levar a uma resistência reduzida do hospedeiro, com um aumento de suscetibilidade a ambos parasitas, e desta forma, pode acarretar em prejuízos ainda maiores àquele que alberga estes microrganismos (GRAHAN et al., 2007). As infecções por helmintos não tratadas, promovem um processo crônico, estimulando uma resposta humoral e celular, como é visto na esquistossomose (RICHTER et al., 2015).

Vários são os estudos que relatam a coinfecção experimental (KNAPP, RICE, 2015, BLANK et al., 2016). Muitos são os microrganismos que podem coabitar um hospedeiro, como bactérias, e em especial, enterobactérias. Os fatores de coinfecção com estes microrganismos dependerão da quantidade de bactérias, cepas, capacidade invasiva, e determinante da interação entre o patógeno-hospedeiro, a qual sofre influência do sistema imunológico (MUNIZ-JUNQUEIRA et al., 2009).

Em países em desenvolvimento, como os países africanos, são comuns coinfeções entre malária e outras helmintíases, como o *Schistosoma mansoni* (WHO, 2006). Parasitas intestinais, como os helmintos, podem afetar o desenvolvimento cognitivo (MAZIGO, 2010), e junto a isto, em ocasiões em que regiões endêmicas propiciam coinfeções, pode haver a interação entre parasitas e fungos, havendo a necessidade de estudá-los.

Há trabalhos que relatam coinfeção por fungos e outros microrganismos (RIGHETTO, 2014; TORRES-DAMA et al., 2015). A resposta para fungos é dada por um perfil imunológico Th1, em que há a produção de IFN- $\gamma$ , fundamental para o recrutamento de macrófagos (GARCIA et al. 1997). Para helmintos, a resposta costuma ser Th2 no decorrer da infecção, e há relatos que a infecção com parasitas pode prejudicar a resposta imune contra fungos (GEORGE et al., 2014).

O sistema imune dos hospedeiros é fundamental para eliminação dos invasores, e é através do processo fagocitário que o hospedeiro consegue se defender dos patógenos (DALE; BOXER; LILES, 2008). Em fases crônicas para coinfeções, sugere-se que cerca de 40% dos macrófagos tem dificuldades em fagocitar, e assim, há déficit acentuado da capacidade de destruição de microrganismos, que resulta em ativação contínua do sistema imune (MUNIZ-JUNQUEIRA et. al, 1996). As funções fagocitárias e microbidas dos macrófagos são fundamentais para a defesa do organismo. Os patógenos que conseguem escapar a esses mecanismos microbidas tem certa vantagem, podendo sobreviver, multiplicar-se e levar a alterações patológicas crônicas, e desta forma, alterações são observadas no hospedeiro, e estas devem ser analisadas.

### 1.6 Coinfeções com *Schistosoma mansoni*

Centros urbanos com áreas que são endêmicas para esquistossomose podem fazer com que a população sofra com infecções por mais de um parasita. As populações mais pobres e desfavorecidas, com precário acesso ao saneamento básico, tem mais chances de que doenças se espalhem rapidamente, o que torna importante a atenção à saúde destes locais (WHO, 2006).

Diversas são as doenças que podem se instalar em uma pessoa já infectada com *S. mansoni*. No caso de platelmintos e nematelmintos, estes parasitas podem habitar seus

hospedeiros por muitos anos. Assim, o sistema imune do hospedeiro pode estar suprimido, que acarreta em uma defesa insuficiente para eliminação, ou o invasor pode desenvolver mecanismos para escapar do sistema imune, e sobreviver às defesas do hospedeiro (GRAHAN et al., 2007).

A resposta de modulação da resposta imune é o principal foco de estudo para o entendimento das coinfeções com outros microrganismos devido à supressão da resposta contra antígenos das doenças associadas (PEARCE et al. 2004). A modulação da resposta imune em portadores de *S. mansoni* é devido a moléculas existentes no ovo (SEA, ou antígeno solúvel do ovo) que tem capacidade de induzir IL-10 (molécula supressora), e levar à expansão de células T regulatórias (PEARCE et al. 2004).

Com a atenuação da resposta imunológica devido ao *S. mansoni*, pode haver alteração de mecanismos de defesa contra outros patógenos. Pode-se esperar que a esquistossomose tenha um potencial de reduzir as defesas do organismo, piorando processos patológicos, sendo, importante o estudo das coinfeções (LENZI et al., 2008).

A região do sul de Minas Gerais recebe anualmente um grande fluxo de migrantes que se retiram de regiões endêmicas para a esquistossomose, para trabalhar nas lavouras. No estado de Minas Gerais, Silva-Vergara e Martinez (1998) observaram elevada prevalência de infecção por PCM em área agrícola. Desta forma, uma coinfeção pode se estabelecer, o que torna relevante o entendimento de ambas doenças quando atuam concomitantemente.

### 1.7 Paracoccidioidomicose

A paracoccidioidomicose (PCM) é uma micose sistêmica humana, causada pelo fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, que leva a uma doença inflamatória crônica granulomatosa de ocorrência em regiões tropicais e subtropicais, sendo endêmica na América Latina (RAMOS, 2008). Sua principal ocorrência é no Brasil, considerado o centro endêmico dessa doença, com maior incidência nas regiões sudeste, centro-oeste e sul (MALUF et al., 2003).

A PCM é endêmica na América Latina, sendo o Brasil um dos países com maiores incidências, e tem a região sudeste como estado com o maior número de diagnósticos. Em estudos, acredita-se que a incidência é de 3 casos por 100 mil habitantes (BARROZO

et al., 2009), sendo que de Carli e colaboradores (2015) citam que a paracoccidiodomicose é frequentemente relacionada às Américas do Sul e Central, e Bellissimo-Rodrigues et al. (2011) relatam que há alta proporção de casos da micose no Brasil.

A infecção geralmente ocorre durante a infância ou na adolescência, sendo o homem o hospedeiro acidental do fungo. As mulheres possuem uma proteção hormonal, pois os fungos têm receptores para estrógenos que são capazes de bloquear a transformação de micélios para a forma de leveduras. Adultos de 30 a 50 anos de idade são os mais acometidos, sendo do sexo masculino em aproximadamente 90% dos casos. Junto a isto, o uso de bebidas alcoólicas e cigarro são fatores agravantes que contribuem para disseminação (FORTES et al., 2011). Inicialmente a infecção afeta os pulmões devido à inalação do *P. brasiliensis*, podendo disseminar-se por diversos órgãos e sistemas promovendo lesões nas mucosas, linfonodos, pele e glândulas adrenais. A evolução da doença irá depender da virulência do fungo, da quantidade de esporos inalados e da integridade do hospedeiro. As manifestações clínicas da doença geralmente só são vistas durante a fase adulta, mesmo que o contato inicial com o fungo tenha sido na infância (BISINELLI, FERREIRA, 2002).

Caso não seja detectada rapidamente, ela pode ser disseminada para diversas regiões como baço, fígado, linfonodos, ossos e medula óssea, sendo essa forma clínica responsável pelos altos índices de letalidade associados à PCM (FRANCO et al., 1987). A forma crônica desenvolve-se nos pulmões e progride lentamente, ocorrendo o comprometimento pulmonar e tegumentar (cutâneo e/ou mucoso) (MARQUES; CORTEZ; LASTORIA, 2007).

### 1.8 Resposta imune ao *P. brasiliensis*

No primeiro contato do homem com o fungo, a proteção é devido à resposta imune inata e adquirida, que são essenciais na resistência ao *P. brasiliensis*, mediadas por células Th1 que induzem a formação de granulomas. Porém, caso a resposta imune for mediada por células Th2, ocorrerá uma incapacidade de redução do processo infeccioso causado pelo fungo (PAGLIARI et al. 2003).



Indivíduos saudáveis, quando entram em contato com *P. brasiliensis* podem resolver a infecção no local do inóculo a partir de resposta imune inata e do desenvolvimento de resposta Th1, com formação de granulomas densos. Quando há uma incapacidade no desenvolvimento dessa resposta, há um desvio para outros padrões de resposta imune, como a Th2, que resulta em ineficiente contenção da propagação da infecção (PAGLIARI; SOTTO, 2003). Pacientes com a doença em atividade apresentam diminuição da resposta imune celular, o que caracteriza uma depressão da síntese de citocinas de padrão Th1, como IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-12, e aumento dos níveis de IL-4, IL-5 e IL-10, características do padrão Th2 não protetor ao hospedeiro (BENARD et al., 2001). Dentre os mecanismos utilizados na resposta imune os macrófagos e linfócitos T são muito importantes no processo inflamatório durante a formação e modulação do granuloma, através da produção de citocinas e outros mediadores, sendo uma resposta imune eficaz para limitar o fungo, impedindo sua multiplicação e proliferação pelos tecidos (MARQUES *et al.*, 2007).

A imunorregulação experimental na PCM está associada a padrões de resposta regulados por células T helper do tipo Th1, Th2, Th17 e células T regulatórias CD4+ CD25+ (T<sub>reg</sub>). A defesa efetiva contra *P. brasiliensis* depende principalmente das células Th1, e a resistência adquirida é governada por citocinas que ativam células T e macrófagos. Nesse contexto, o TNF- $\alpha$  e o IFN- $\gamma$  possuem um papel particularmente relevante (CALICH et al., 1998). Em camundongos resistentes inoculados com *P. brasiliensis* verificou-se uma infecção caracterizada por ativação de macrófagos e neutrófilos, e baixos níveis de anticorpos anti-*P. brasiliensis*. Esses animais inicialmente apresentaram altos níveis de IFN- $\gamma$  e pequenas quantidades de citocinas do tipo 2 (IL-4, IL-5 e IL-10). Nos camundongos susceptíveis foram encontrados níveis baixos de IFN- $\gamma$  e produção relativamente alta de IL-5 e IL-10. (KASHINO et al., 2000). Linfócitos de camundongos resistentes produzem IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-4 e IL-5. Linfócitos de camundongos susceptíveis secretam baixos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-2. Animais resistentes produzem IL-5 tardiamente, enquanto camundongos susceptíveis produzem picos de IL-5 (CALICH; KASHINO, 1998).

As células Th17 também tem papel fundamental na remoção de patógenos que não são eliminados por respostas Th1 e Th2. Com produção de quimiocina e citocinas inflamatórias, como IL-23 e IL-6, com indução de PMN, que são importantes no controle de infecções por fungos. Desta forma, a resposta humoral não é efetiva contra PCM. Com elevada produção de imunoglobulinas e citocinas (como IL-4 e IL-5), e este padrão de

resposta é visto em hospedeiros com a forma mais grave do fungo, o que mostra que a resposta Th2 não é efetiva contra o fungo (MAMONI et al., 2002; OLIVEIRA, et., 2002).

## 2 OBJETIVOS

Aqui serão listados o objetivo geral e os objetivos específicos.

### 2.1 Objetivos gerais

Analisar aspectos histopatológicos e imunológicos durante a coinfeção por *Schistosoma mansoni* e *Paracoccidioides brasiliensis* em modelo murino.

### 2.2 Objetivos específicos

Avaliar o efeito da coinfeção de *P. brasiliensis* e *S. mansoni* no peso e sobrevida dos camundongos.

Confirmar o estabelecimento das coinfeções de *S. mansoni* e *P. brasiliensis* a partir da visualização destes agentes no fígado, pulmão e epiplon.

Quantificar o número de granulomas presentes no fígado e pulmão em camundongos coinfectados por *P. brasiliensis* e *S. mansoni*.

Analisar o desenvolvimento do granuloma esquistossomótico, a partir do tamanho, na coinfeção de *P. brasiliensis* e *S. mansoni*.

Analisar a composição celular dos granulomas em camundongos na coinfeção de *P. brasiliensis* e *S. mansoni*.

Analisar o perfil de citocinas no soro de camundongos coinfectados com *P. brasiliensis* e *S. mansoni*.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Delineamento experimental

**Tabela 1:** Data de infecção, inoculação e necropsia dos camundongos.

Dias	0	20	50	90	120
Controle não infectado (n=10)				Necropsia Fase aguda	Necropsia Fase crônica
Grupo Schisto (A) - somente <i>S. mansoni</i> em fase aguda (n=10)	Infecção com <i>S. mansoni</i>			Necropsia Fase aguda	
Grupo Pb (A) - somente <i>P. brasiliensis</i> em fase aguda (n=10)		Inoculação com <i>P. brasiliensis</i>		Necropsia Fase aguda	
Grupo Schisto (A) + Pb (A) - <i>S. mansoni</i> e <i>P. brasiliensis</i> em fase aguda (n=10)	Infecção com <i>S. mansoni</i>		Inoculação com <i>P. brasiliensis</i>	Necropsia Fase aguda	
Grupo Schisto (C) - somente <i>S. mansoni</i> em fase crônica (n=10)	Infecção com <i>S. mansoni</i>				Necropsia Fase crônica
Grupo Pb (C) - somente <i>P. brasiliensis</i> em fase crônica (n=10)			Inoculação com <i>P. brasiliensis</i>		Necropsia Fase crônica
Grupo Schisto (C) + Pb (C) - <i>S. mansoni</i> e <i>P. brasiliensis</i> em fase crônica (n=10)	Infecção com <i>S. mansoni</i>		Inoculação com <i>P. brasiliensis</i>		Necropsia Fase crônica
Grupo Schisto (C) + Pb (A) - <i>S. mansoni</i> em fase crônica e <i>P. brasiliensis</i> em fase aguda (n=10)	Infecção com <i>S. mansoni</i>			Inoculação com <i>P. brasiliensis</i>	Necropsia Fase crônica para <i>S. mansoni</i> e aguda para <i>P. brasiliensis</i>

**Fonte:** Do autor

**Legenda:** (A): fase aguda; (C): fase crônica.

### 3.2 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas Swiss do Biotério de animais do Centro de Pesquisa René Rachou - FIOCRUZ, e infectados no Laboratório de Esquistossomose da referida instituição. Os camundongos infectados foram enviados e mantidos no Biotério de experimentação do Departamento de Patologia e Parasitologia Básica da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), mantidos em salas com controle de temperatura, com alimentos (ração para roedores) e água “ad libitum”. Para cada grupo, 10 animais foram utilizados. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), e recebido o registro nº 543/2013.

### 3.3 Infecção por *Schistosoma mansoni*

A infecção dos camundongos foi realizada através da inoculação de 25 cercárias (cepa LE – isolada do paciente Luís Evangelista) por via subcutânea provenientes de infecções rotineiras realizadas pelo Moluscário do CPqRR/FIOCRUZ. Para o cálculo do nº de cercárias que foram inoculadas no camundongo: retirou-se 1 gota da solução de água desclorada contendo as cercárias (com pipeta de pasteur) e a colocou em uma pequena placa de Petri, para que as cercárias fossem contadas. Cerca de 25 cercárias foram inoculadas por camundongo, o qual foi exposto às cercárias para que houvesse penetração das mesmas.

### 3.4 Inoculação com *Paracoccidioides brasiliensis*

Foi utilizado o isolado de *P. brasiliensis* a cepa Pb18 (alta virulência) (SINGER-VERMES *et al.*, 1989) do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas. Os fungos foram cultivados em meio de cultura de Fava Netto

(FAVA NETTO, 1955) a 35° C por 7 dias. Após esse tempo, as células foram lavadas com solução salina estéril a 0,85% e uma suspensão fúngica foi obtida com concentração de  $5 \times 10^6$  células leveduriformes/ml, baseadas na contagem em hemocitrômetro. A viabilidade das células foi determinada pela coloração de *Janus Green B vital dye*, e apenas a visualização maior ou igual a 80% de células viáveis foram utilizados (BERLINER, RECA, 1966). A inoculação nos camundongos foi feita por via intraperitoneal.

### 3.5 Processamento histopatológico

Os animais de cada grupo foram anestesiados 50 e 120 dias após a infecção por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* com Ketamina associada a Xilazina na proporção de 1:1. Logo em seguida, os órgãos fígado, pulmão e epiplon - e este esticado ao ser retirado - foram fixados em solução de paraformaldeído pH = 7,4 a 0,1 mol.

Os fragmentos dos órgãos foram processados (desidratados, diafanizados, e incluídos em parafina). Os órgãos em parafina foram cortados em micrótomo rotativo a 5 micrometros de espessura, com 3 cortes semi-seriados. As lâminas foram coradas pela técnica de hematoxilina e eosina (para análise do granuloma esquistossomótico) e pela técnica de Grocott, para análise da infecção de *P. brasiliensis* (GROCOTT, 1955), e após, analisadas em microscopia de luz.

### 3.6 Captura de fotos, contagem e medição do diâmetro de granulomas

Para obter imagens dos tecidos infectados utilizou-se do microscópio AxioCam ICc3 da marca Zeiss acoplado ao programa AxioVision, com lentes de 20x, 40x e 100x, selecionando dez campos aleatórios para cada lâmina. Na contagem do número de granulomas, o tecido foi visualizado com a objetiva de 5x, e todos os granulomas presentes nos cortes foram contados. P

Os valores obtidos foram transferidos ao programa estatístico GraphPad-Prism 5 (Prism Software, Irvine, Califórnia, EUA).

### 3.7 Contagem diferencial de células que compõem o granuloma

A contagem de células foi realizada utilizando a objetiva de 100x, com o auxílio da lente conhecida como retículo de Weibel (WEIBEL; KISTLER; SCHERLE, 1966). Este retículo contém 50 linhas, e em cada extremidade da linha, um ponto, totalizando 100 pontos. Despreza-se a primeira linha e os primeiros pontos da primeira coluna. As células que coincidem de cair em um ponto são contadas, e desta forma, são contadas 85 células aleatoriamente. Na contagem foi realizada a diferenciação de células polimorfonucleares e mononucleares, além da diferenciação de eosinófilos e neutrófilos.

### 3.8 Sorologia - Dosagem das citocinas e quimiocina.

Os ensaios imunoenzimáticos de ELISA *sanduiचे* foram realizados utilizando-se o soro dos animais da experimentação. Para o procedimento do ensaio foram utilizados kits para detecção das citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 e da quimiocina MIP-2 (Peprotech®).

A quantificação das citocinas presentes nas amostras foi determinada baseada na densidade óptica obtida com a curva padrão de concentrações conhecidas das citocinas recombinantes, analisadas pelo *software SOFTmax PRO 4.0* (CALDAS, 2014).

### 3.9 Análise estatística

Os resultados foram expresso como média e erro padrão. A normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov. Para três ou mais grupos, os dados paramétricos foram submetidos ao teste One-way ANOVA

seguido pelo teste de Student- Newman-Keuls para comparações múltiplas. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar os dados não paramétricos. Para comparações entre dois grupos foram utilizados os testes t Student para dados paramétricos ou Wilcoxon-Mann-Whitney. O nível de significância dos testes foi estabelecido para 5%. Resultados com valor de  $p < 0,05$  foram diferentes estatisticamente.



## 4 RESULTADOS

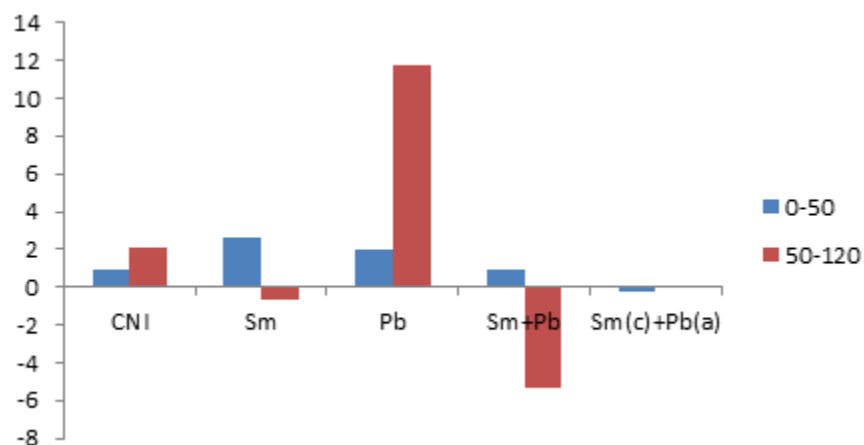
Aqui serão apresentados os resultados divididos por sua fase aguda e crônica.

### 4.1 Análise do peso médio e sobrevivência dos camundongos em fase aguda e crônica

Análise do peso de camundongos em fase aguda e crônica no período de 120 dias.

#### 4.1.1 Ganho de peso

O peso foi obtido no início e final do experimento. A partir do exposto na figura 1, pode-se observar que durante o período de experimentação de 120 dias, o grupo CNI ganhou peso (2,06g), houve perda para o grupo Sm (-0,72g), ganho de peso no grupo Pb (11,75g), perda de peso no grupo Sm+Pb (-5,34) e para o grupo Sm(c)+Pb(a) houve pequeno ganho de peso (0,07g).



**Figura 1** - Peso médio dos camundongos infectado com *S. mansoni*, inoculados com *P. brasiliensis*, e coinfectados *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase aguda à partir do dia 0 (início do experimento) ao dia 120 (final do experimento).

**Fonte:** Do autor

#### 4.1.2 Sobrevivência

De acordo com a tabela 2, observa-se que o grupo Sm, em fase aguda, apresentou 10% de óbitos ao final do experimento. Ao passo que nos outros grupos, não houve morte de camundongos.

Observa-se que em fase crônica, a infecção por *P. brasiliensis* causou menor morte dos camundongos durante o tempo de experimentação, sendo que foi observado morte de camundongos nos grupos SMc (50% de sobrevida ao final do experimento), SMc+PBc (50% de sobrevida ao final do experimento) e por último, no grupo SMc +PBa, foi observado 40% de sobrevida ao final do experimento.

**Tabela 2** - Análise da sobrevida dos camundongos em fase aguda e crônica para camundongos infectados com *S. mansoni*, *P. brasiliensis*, e coinfectados com *S. mansoni* e *P. brasiliensis*.

	CNI	SMa	PBa	SMa+PBa	SMc	PBc	SMc+PBc	SMc +PBa
<b>Início (dia 0)</b>	10	10	10	10	10	10	10	10
<b>Sobrevida (dia 50), n (%)</b>	10	9 (10%)	10	10	10	10	10	10
<b>Sobrevida (dia 120), n (%)</b>	-	-	-	-	5(50%)	10	5(50%)	4(60%)

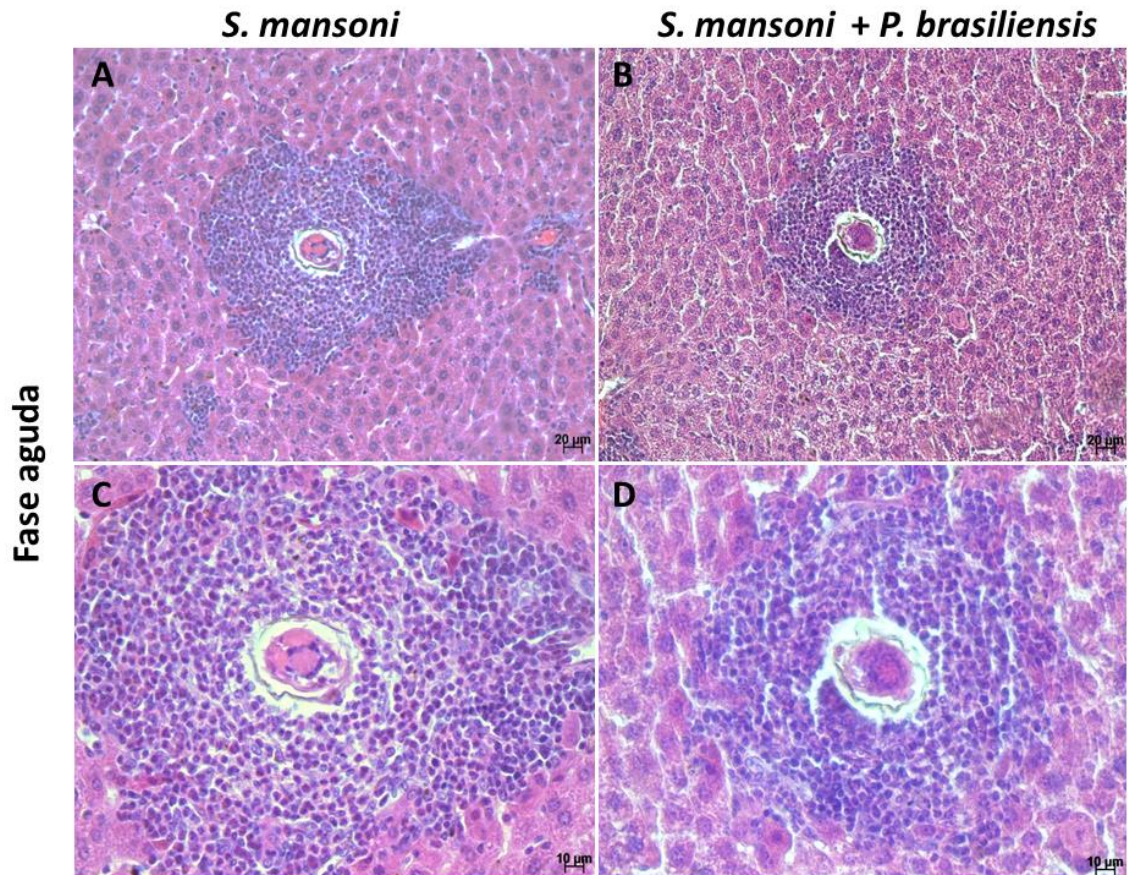
**Fonte:** Do autor

**Legenda:** CNI – Controle não infectado; Sm – *Schistosoma mansoni*; Pb - *Paracoccidoides brasiliensis*; a – agudo; c - crônico

#### 4.2 Análise do desenvolvimento do granuloma esquistossomótico e dosagem de citocinas em fase aguda

Na figura 2, observa-se no tecido hepático a presença de granulomas de camundongos infectados por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* durante a fase aguda. Estes se apresentam em estágio produtivo, típico de fase aguda.

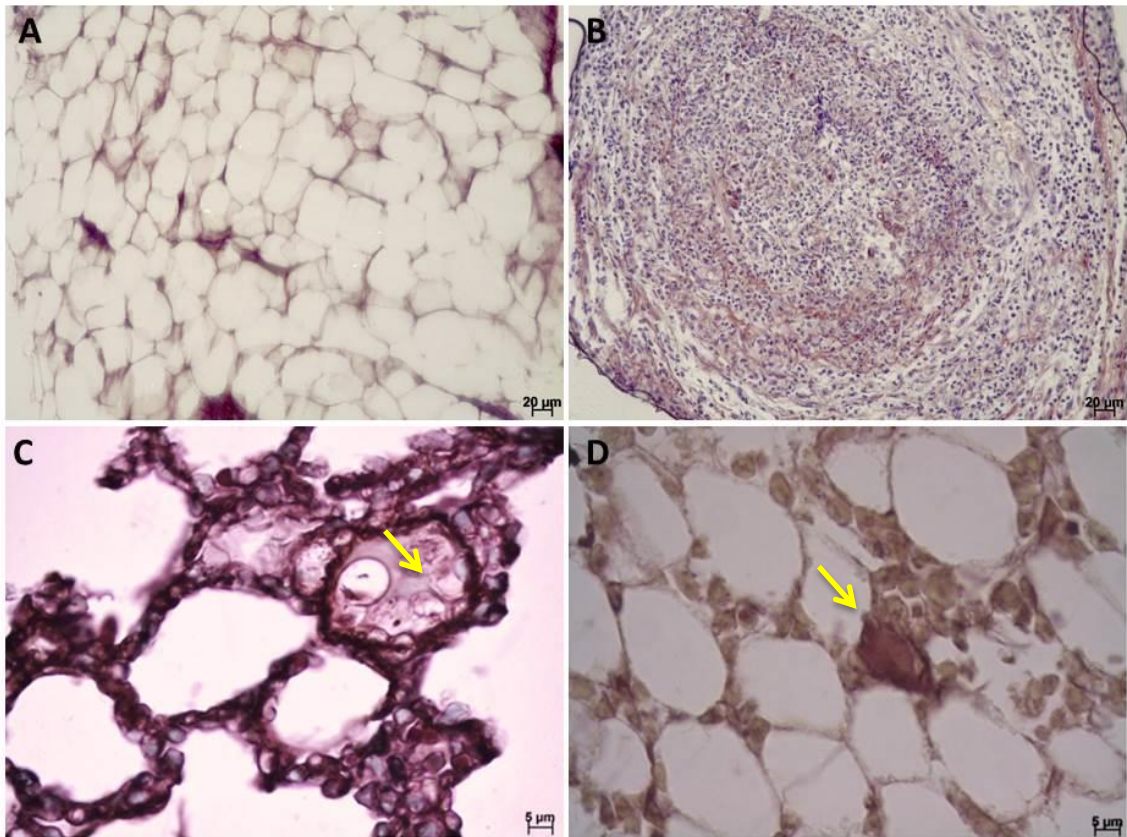
Não foi possível evidenciar a presença de fungos no tecido hepático, tanto no grupo Sm quanto Sm+Pb, assim como não foi possível ver granulomas de *P. brasiliensis*.



**Figura 2** - Granulomas esquistossomóticos hepáticos em camundongos infectados por *S. mansoni* e coinfectados com *P. brasiliensis* corados com Hematoxilina e Eosina. A - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase aguda. Objetiva de 20x. B - Granuloma do grupo coinfectado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase aguda. Objetiva de 20x. C Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase aguda. Objetiva de 40x. D - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase aguda. Objetiva de 40x.

**Fonte:** Do autor

Na figura 3, observa-se o epiplon (ou omento) em sua arquitetura normal (**3.A**), e em **3.B** observa-se a presença de infiltrado celular. Em **3.C** observa-se alteração da estrutura tecidual com presença de fungos de *P. brasiliensis* e **10.D**, observa-se a presença de ovo de *S. mansoni* sem infiltrado celular ao seu redor.

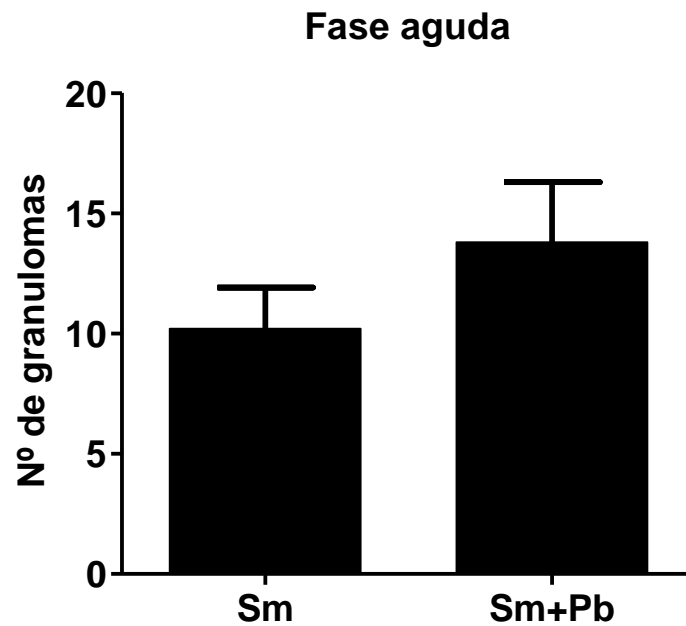


**Figura 3** - Morfologia do epiplon em camundongos coinfetados por *S. mansoni* e *P. brasiliensis*, corados com Grocott. A - Morfologia não alterada do epiplon com tecido preservado, sem presença de infiltrado celular ou outras alterações. Objetiva de 20x. B - Morfologia alterada do epiplon com presença de infiltrado celular. Objetiva de 20x. C - Presença de células de *P. brasiliensis* (indicado em seta amarela). Objetiva de 100x. D - Presença de ovo de *S. mansoni* (indicado em seta amarela). Objetiva de 100x.

Fonte: Do autor

#### 4.2.1 Número de granulomas

A figura 4 mostra o número de granulomas esquistossomóticos no tecido hepático de *S. mansoni* e coinfetados por *S. mansoni* e *P. brasiliensis*. Não houve diferença significativa no número de granulomas entre os grupos.

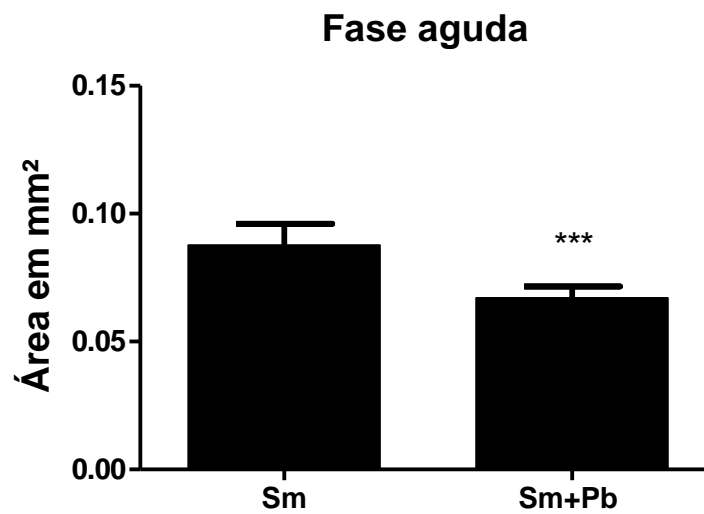


**Figura 4** - Número de granulomas no fígado em fase aguda. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase aguda. Sm+Pb: camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectados por *P. brasiliensis* em fase aguda. Não houve diferenças significativas entre os grupos.

**Fonte:** Do autor

#### 4.2.2 Área do granuloma

No grupo de camundongos infectados por *S. mansoni*, os granulomas, em relação à área, apresentaram diferenças significativas mais baixas quando comparados os grupos Sm ( $0,08 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ ) e Sm+Pb ( $0,06 \pm 0,05 \text{ mm}^2$ ).



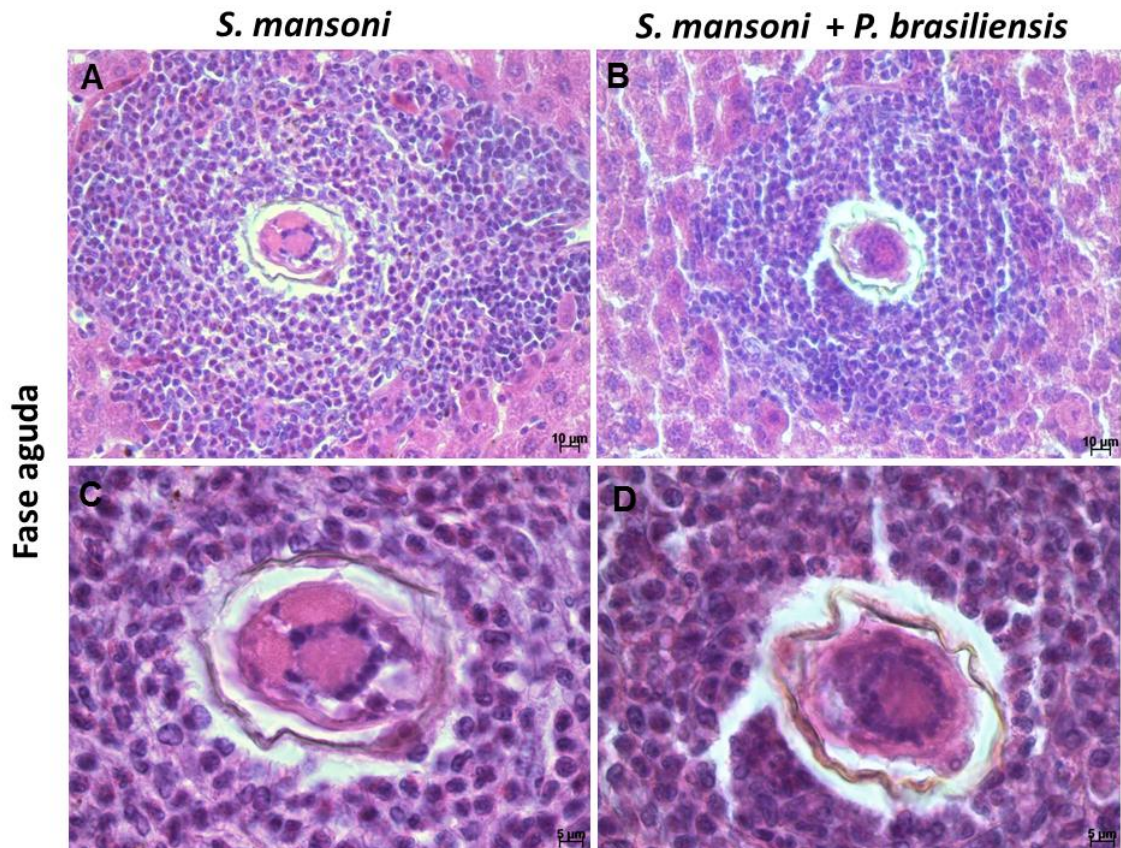
**Figura 5** - Área dos granulomas esquistossomóticos no fígado em fase aguda. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase aguda. Sm+Pb: camundongos infectados por *S. mansoni* coinfetados por *P. brasiliensis* em fase aguda. \*\*\* representa diferenças com  $p < 0,001$ .

**Fonte:** Do autor

#### 4.2.3 Células Polimorfonucleares e mononucleares

A figura 6 mostra o granuloma esquistossomótico hepático no qual pode ser observada a presença de células polimorfonucleares e mononucleares. Estes tipos celulares estão presentes tanto no grupo Sm quanto no grupo Sm+Pb.



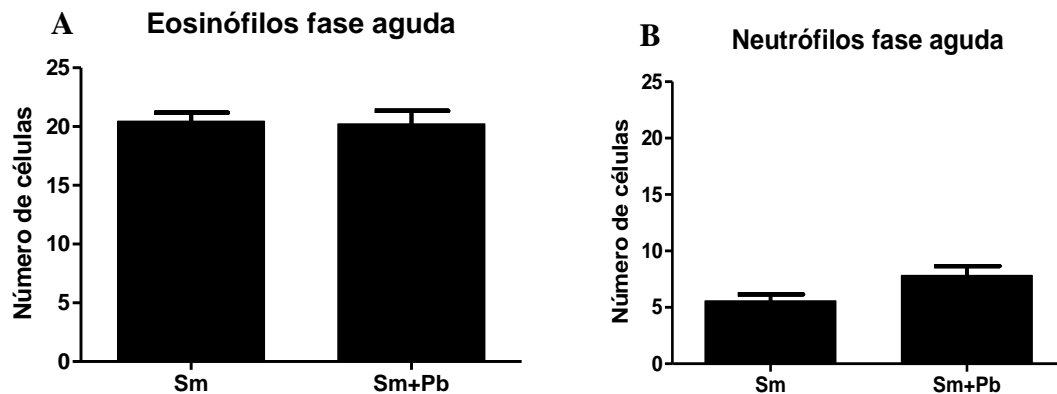


**Figura 6** - Granulomas esquistossomóticos hepáticos em camundongos infectados por *S. mansoni* e coinfetados com *P. brasiliensis* corados com Hematoxilina e Eosina. A - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase aguda. Abaixo, à esquerda, destaque às células polimormonucleares e mononucleares circundando o ovo de *S. mansoni*. Objetiva de 40x. B - Granuloma do grupo coinfetado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase aguda. Abaixo, à esquerda, destaque às células polimormonucleares e mononucleares circundando o ovo de *S. mansoni*. Objetiva de 40x C Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase aguda. Objetiva de 100x. D - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase aguda. Objetiva de 100x.

Fonte: Do autor

#### 4.2.4 Análise da Celularidade

Quanto aos tipos celulares polimorfonucleares que compõem o granuloma no fígado (Figura 7A), observou-se na fase aguda que o número de eosinófilos não se diferenciou. Para o número de neutrófilos no fígado (Figura 7B), observou-se na fase aguda que os grupos infectados por *S. brasiliensis* e coinfetados com *S. mansoni* + *P. brasiliensis* não apresentaram diferenças significativas.



**Figura 7** - A - Contagem do número de eosinófilos no fígado. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase aguda. Sm+Pb: camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectados por *P. brasiliensis* em fase aguda. B - Contagem do número de neutrófilos no fígado. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase aguda. Sm+Pb: camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectados por *P. brasiliensis* em fase aguda. Não houve diferença significativa entre os grupos.

**Fonte:** Do autor

#### 4.2.5 Citocinas em fase aguda

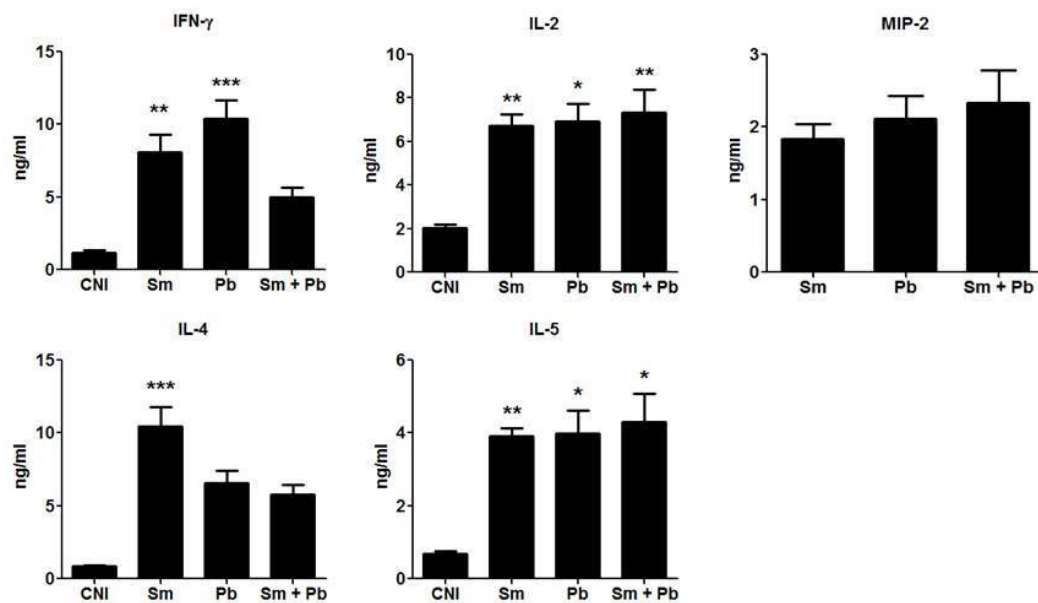
Para  $\text{INF-}\gamma$ , durante a fase aguda, foi observado diferenças significativas elevadas no grupo CNI ( $1,14 \pm 0,48$  ng/ml), quando comparado ao grupo Sm ( $8,05 \pm 3,52$  ng/ml) e Pb ( $10,40 \pm 3,549$  ng/ml).

Em relação a IL-2, foram observadas diferenças significativas elevadas nos níveis desta citocina entre os grupos Sm ( $6,71 \pm 1,50$  ng/ml), Pb ( $10,40 \pm 3,54$  ng/ml) e Sm+Pb ( $7,32 \pm 2,93$  ng/ml) quando comparados ao grupo CNI ( $2,01 \pm 0,39$  ng/ml).

Para a quimiocina MIP-2, não foram observadas diferenças significativas nos níveis desta citocina durante a fase aguda entre os grupos *S. mansoni*, *P. brasiliensis* e *S. mansoni* + *P. brasiliensis*.

Os níveis de IL-4 apresentaram diferenças significativas elevadas entre o grupo Sm ( $10,45 \pm 3,67$  ng/ml) quando comparados ao grupo CNI ( $0,85 \pm 0,15$  ng/ml). Para IL-5, diferenças significativas elevadas para os grupos Sm ( $3,91 \pm 0,61$  ng/ml) Pb ( $3,98 \pm 1,76$  ng/ml) e Sm+Pb ( $4,28 \pm 2,22$  ng/ml) quando comparado ao grupo CNI ( $0,67 \pm 0,21$  ng/ml).





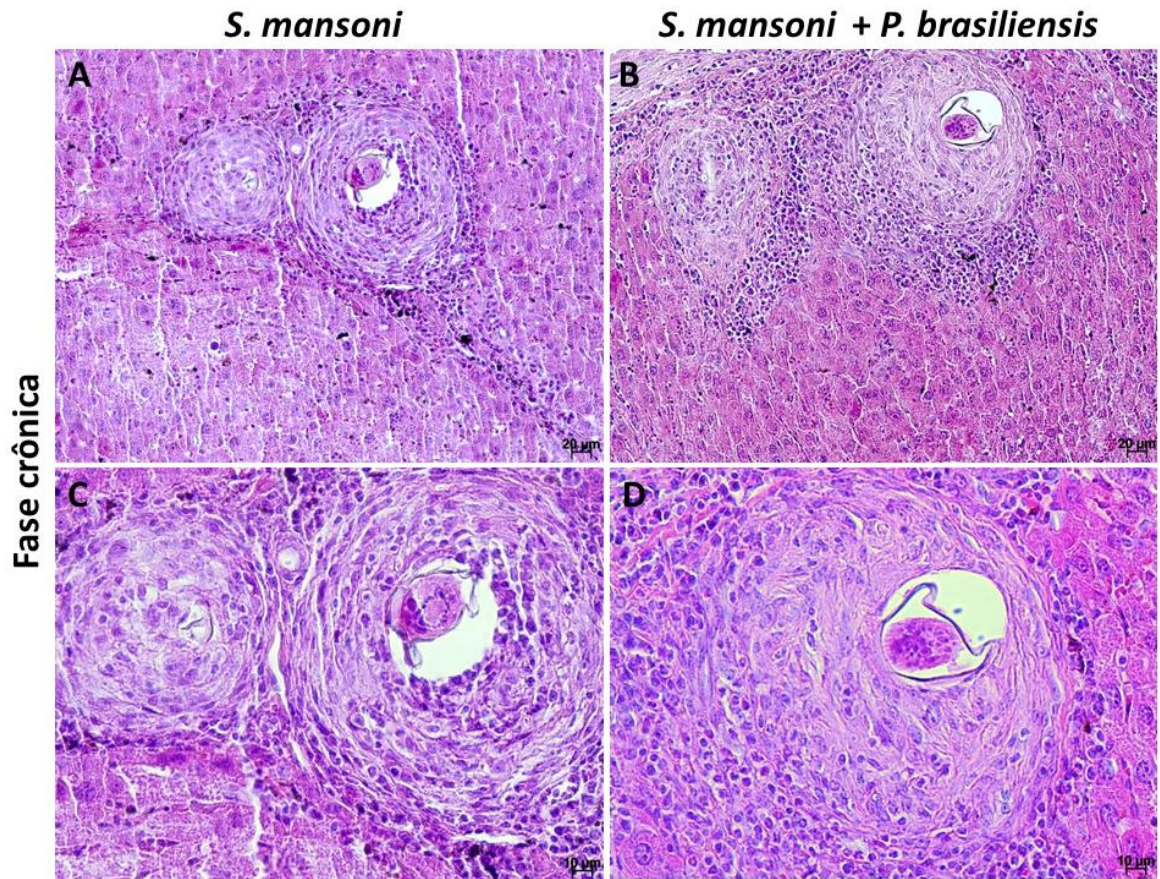
**Figura 8** - Perfil da dosagem de citocina IFN- $\gamma$ , IL-2, MIP-2, IL-4 e IL-5 em soro de camundongo infectado e analisado em fase aguda. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase aguda. Pb: camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Sm+Pb: camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectedados por *P. brasiliensis* em fase aguda. \*representa diferenças significativas com  $p < 0,05$ ; \*\*representa diferenças significativas com  $p < 0,01$  e \*\*\* representa diferenças com  $p < 0,001$ .

**Fonte:** Do autor

#### 4.3 Análise do desenvolvimento do granuloma esquistossomótico e dosagem de citocinas em fase crônica

Na figura 9, observa-se no tecido hepático a presença de granulomas de camundongos infectados por *S. mansoni* e coinfectedados por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* durante a fase aguda que se caracteriza pelo estágio produtivo, e durante fase crônica que se caracteriza pelo estágio de modulação ou involutivo.

Não foi possível evidenciar a presença de fungos no tecido hepático, tanto na coinfeção quanto isolado

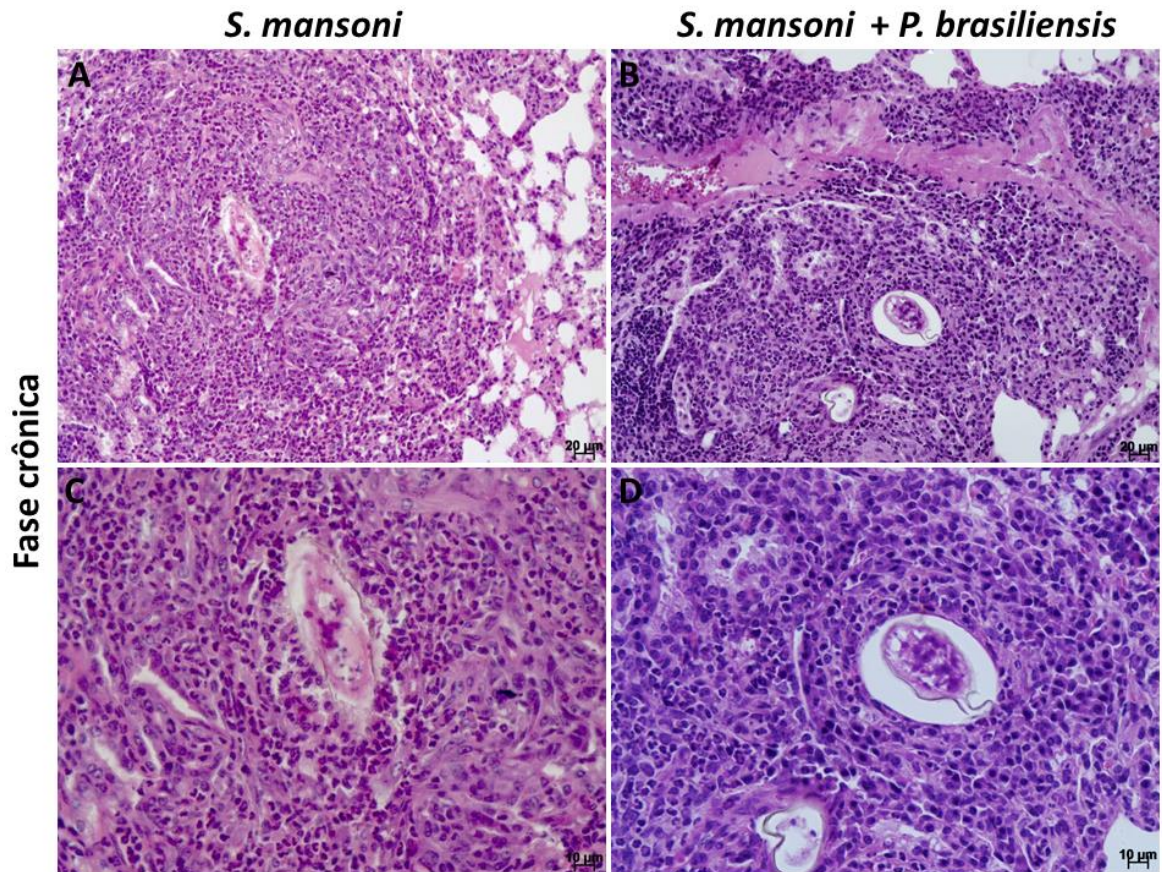


**Figura 9** - Granulomas esquistossomóticos hepáticos em camundongos infectados por *S. mansoni* e coinfectados com *P. brasiliensis* corados com Hematoxilina e Eosina. **A** - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase crônica. Objetiva de 20x. **B** - Granuloma do grupo coinfectado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase crônica. Objetiva de 20x. **C** - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase crônica. Objetiva de 40x. **D** - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase crônica. Objetiva de 40x

**Fonte:** Do autor.

A figura 10 ilustra granulomas esquistossomóticos em tecido pulmonar na fase crônica da esquistossomose. Os granulomas se apresentam na fase exsudativa produtiva com a presença do ovo ao centro



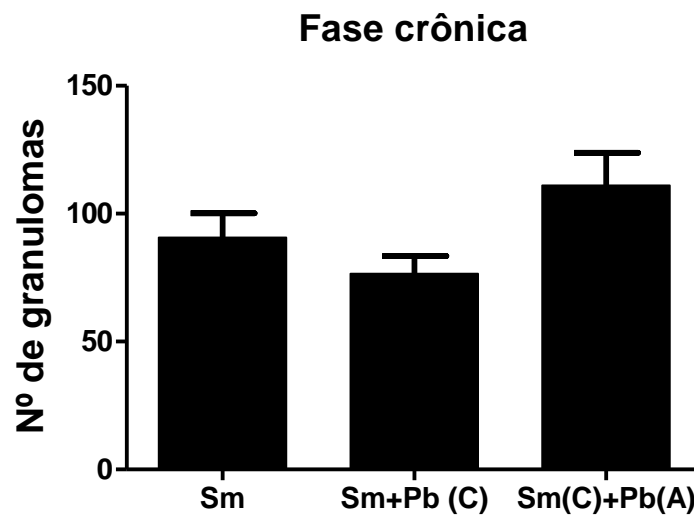


**Figura 10** - Análise de granulomas esquistossomóticos em tecido pulmonar corados com Hematoxilina e Eosina (HE). A - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase crônica. Objetiva de 20x. B - Granuloma do grupo coinfestado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase crônica. Objetiva de 20x. C - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase crônica. Objetiva de 40x. D - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase crônica. Objetiva de 40x

**Fonte:** Do autor

#### 4.3.1 Número de granulomas

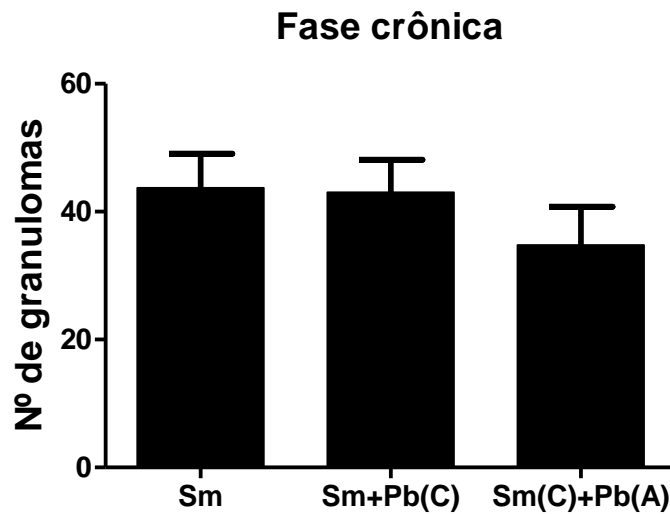
A figura 11 mostra o número de granulomas esquistossomóticos no tecido hepático nos grupos infectados por *S. mansoni* e coinfestados por *S. mansoni* e *P. brasiliensis*, onde foi observado que não houve diferença significativa no número de granulomas nestes tecidos.



**Figura 11** - Número de granulomas no fígado em fase crônica. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase crônica. Sm+Pb: camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectados por *P. brasiliensis* em fase crônica. Sm (C) + Pb(A): camundongos infectados por *S. mansoni* em fase crônica coinfectados por *P. brasiliensis* em fase aguda. Não houve diferenças significativas entre os grupos..

**Fonte:** Do autor

Já a figura 12 mostra o número de granulomas esquistossomóticos no tecido pulmonar nos grupos infectados por *S. mansoni* e coinfectados por *S. mansoni* e *P. brasiliensis*, assim como o grupo *S. mansoni* em fase crônica e *P. brasiliensis* em fase aguda, onde foi observado que não há diferença significativa no número de granulomas nestes tecidos.



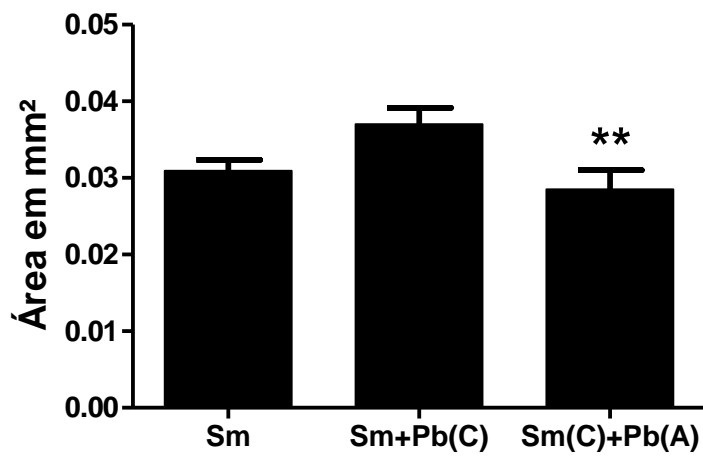
**Figura 12** - Número de granulomas no pulmão em fase crônica. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase crônica. Sm+Pb(C): camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectados por *P. brasiliensis* em fase crônica. Sm(C)+Pb(A): camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectados por *P. brasiliensis* em fase aguda. Não houve diferença significativa entre os grupos.

**Fonte:** Do autor

#### 4.3.2 Área do granuloma

Em relação à área em fase crônica, houve diferença significativa elevada entre os grupos Sm+Pb ( $0,03 \pm 0,01 \text{mm}^2$ ) e Sm(C)+Pb(A) ( $0,02 \pm 0,001 \text{mm}^2$ ), como pode ser observado na figura 13:

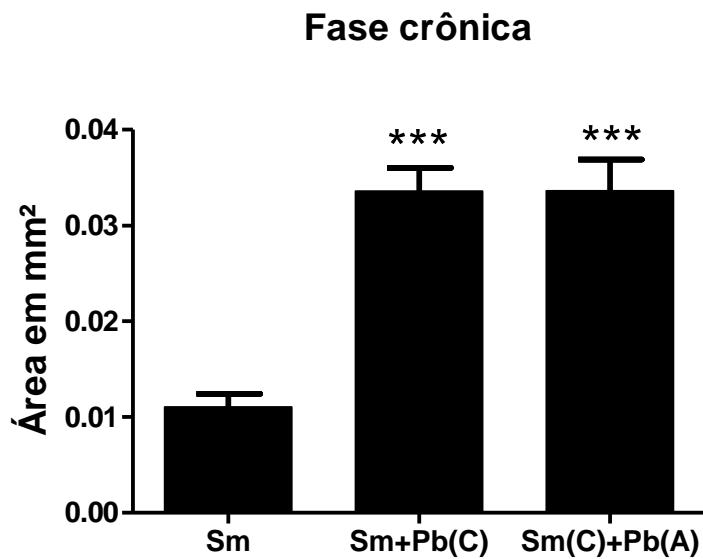
### Fase crônica



**Figura 13** - Área dos granulomas esquistossomóticos no fígado em fase crônica. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase crônica. Sm+Pb: camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectedados por *P. brasiliensis* em fase crônica. Sm (C) + Pb(A): camundongos infectados por *S. mansoni* em fase crônica coinfectedados por *P. brasiliensis* em fase aguda. \*\*representa diferenças significativas com  $p < 0,01$

**Fonte:** Do autor

Em relação ao pulmão, houve diferenças significativas elevadas quando comparados os grupos Sm ( $0,01 \pm 0,009 \text{mm}^2$ ) com Sm+Pb ( $0,03 \pm 0,01 \text{mm}^2$ ) e Sm(C)+Pb(A) ( $0,03 \pm 0,02 \text{mm}^2$ ).



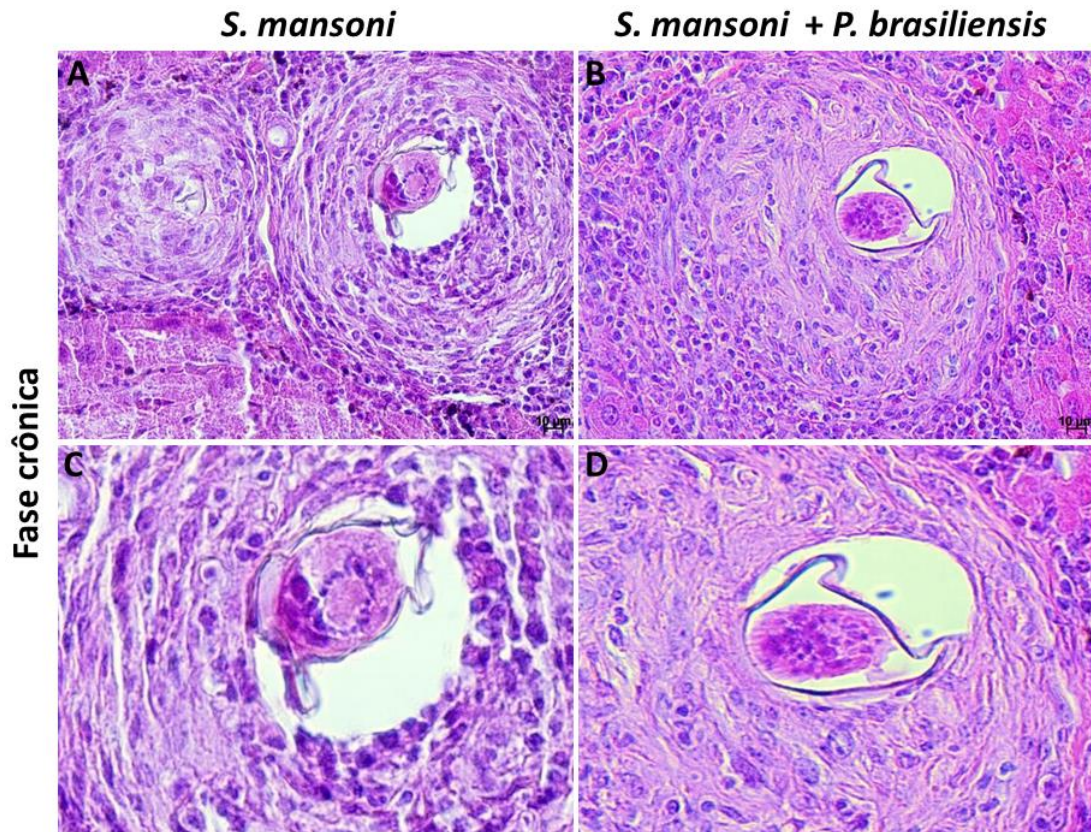
**Figura 14** - Área dos granulomas esquistossomóticos no pulmão em fase crônica. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase crônica. Sm+Pb: camundongos infectados por *S. mansoni* coinfetados por *P. brasiliensis* em fase aguda. Sm (C) + Pb(A): camundongos infectados por *S. mansoni* em fase crônica coinfetados por *P. brasiliensis* em fase aguda. \*\*\* representa diferenças com  $p < 0,001$ .

**Fonte:** Do autor

#### 4.3.3 Células Polimorfonucleares e mononucleares

A figura 15 mostra o granuloma esquistossomótico hepático, no qual pode ser observado a presença de células polimorfonucleares e mononucleares. Não foram observadas diferenças na composição celular dos granulomas tanto entre os grupos de camundongos infectados com *S. mansoni* e coinfetados com *S. mansoni* + *P. brasiliensis* quanto nas fases aguda e crônica.



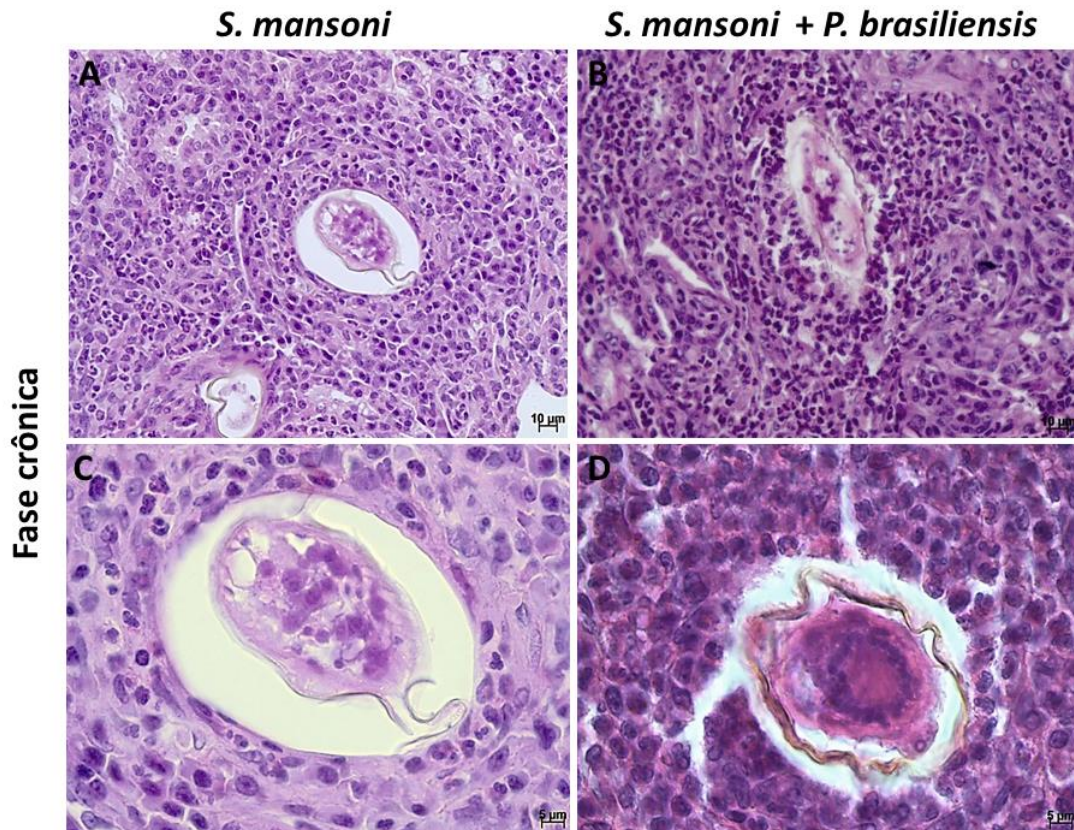


**Figura 15** - Granulomas esquistossomóticos hepáticos em camundongos infectados por *S. mansoni* e coinfetados com *P. brasiliensis* corados com Hematoxilina e Eosina. **A** - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase crônica. Abaixo, à esquerda, destaque às células polimormonucleares e mononucleares circundando o ovo de *S. mansoni*. Objetiva de 40x. **B** - Granuloma do grupo coinfetado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase crônica. Abaixo, à esquerda, destaque às células polimormonucleares e mononucleares circundando o ovo de *S. mansoni*. Objetiva de 40x. **C** - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase crônica. Objetiva de 100x. **D** - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase crônica. Objetiva de 100x.

**Fonte:** Do autor

Através da figura 16, observa-se que, como no fígado, os granulomas esquistossomóticos no pulmão são compostos por células polimorfonucleares e mononucleares, não sendo observadas diferenças na composição celular entre os grupos.





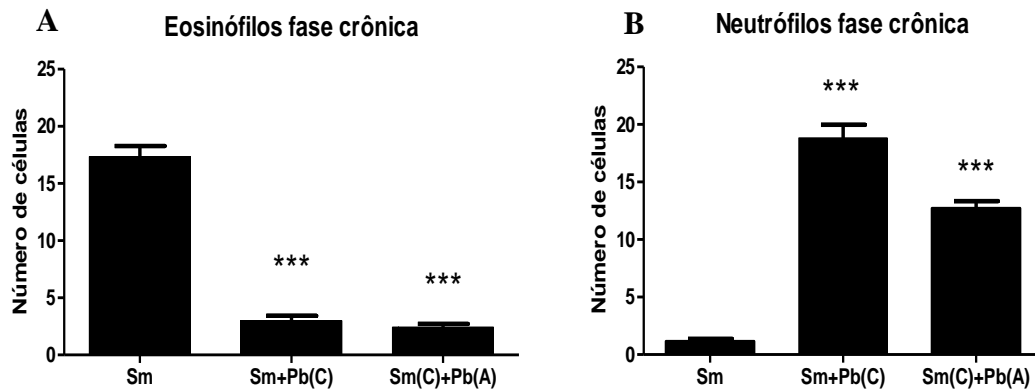
**Figura 16** - Granulomas esquistossomóticos pulmonar em camundongos infectados por *S. mansoni* e coinfectados com *P. brasiliensis* corados com Hematoxilina e Eosina. **A** - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase crônica. Abaixo, à esquerda, destaque às células polimormonucleares e mononucleares circundando o ovo de *S. mansoni*. Objetiva de 40x. **B** - Granuloma do grupo coinfectado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase crônica. Abaixo, à esquerda, destaque às células polimormonucleares e mononucleares circundando o ovo de *S. mansoni*. Objetiva de 40x. **C** - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* em fase crônica. Objetiva de 100x. **D** - Granuloma do grupo infectado por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* em fase crônica. Objetiva de 100x.

**Fonte:** Do autor.

#### 4.3.4 Análise da Celularidade

Em relação ao número de eosinófilos no fígado em fase crônica, diferenças significativas elevadas foram observadas quando comparados os grupos Sm ao grupo Sm+Pb(C) e Sm(C)+Pb(A).

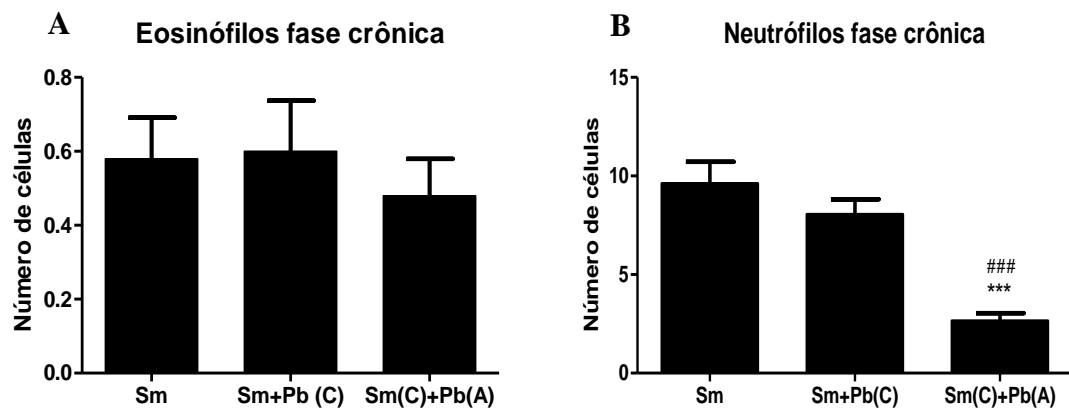
Já para o número de neutrófilos, diferenças significativas elevadas foram observadas quando comparados os grupos Sm ao Sm+Pb(C) ( $p < 0,001$ ) e Sm(C)+Pb(A) ( $p < 0,001$ ).



**Figura 17** - Contagem do número de eosinófilos no fígado. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase crônica. Pb: camundongos infectados por *P. brasiliensis* em fase crônica. Sm+Pb(C): camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectados por *P. brasiliensis* em fase crônica. Sm(C) + Pb(A): camundongos infectados por *S. mansoni* em fase crônica e coinfectados por *P. brasiliensis* em fase aguda. **B** - Contagem do número de neutrófilos no fígado. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase crônica. Pb: camundongos infectados por *P. brasiliensis* em fase crônica. Sm+Pb(C): camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectados por *P. brasiliensis* em fase crônica. Sm(C) + Pb(A): camundongos infectados por *S. mansoni* em fase crônica e coinfectados por *P. brasiliensis* em fase aguda. \*\*\* representa diferenças com  $p < 0,001$

**Fonte:** Do autor.

Quanto a análise da celularidade no pulmão (Figura 18), não se observou diferenças significativas em relação aos eosinófilos. Já para os neutrófilos, diferenças significativas elevadas foram observadas quando comparados os grupos Sm e Sm(C)+Pb(A) (\*  $p < 0,001$ ) e Sm+Pb(C) e Sm(C)+Pb(A) (#  $p < 0,001$ ).



**Figura 18** - Contagem do número de eosinófilos no pulmão. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase crônica. Sm+Pb(C): camundongos infectados por *S. mansoni* coinfetados por *P. brasiliensis* em fase crônica. Sm(C) + Pb(A): camundongos infectados por *S. mansoni* em fase crônica e coinfetados por *P. brasiliensis* em fase aguda. **B** - Contagem do número de neutrófilos no pulmão. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase crônica. Sm+Pb(C): camundongos infectados por *S. mansoni* coinfetados por *P. brasiliensis* em fase crônica. Sm(C) + Pb(A): camundongos infectados por *S. mansoni* em fase crônica e coinfetados por *P. brasiliensis* em fase aguda. \*\*\* representa diferenças com  $p < 0,001$ . ###representa diferenças com  $p < 0,001$ .

Fonte: Do autor.

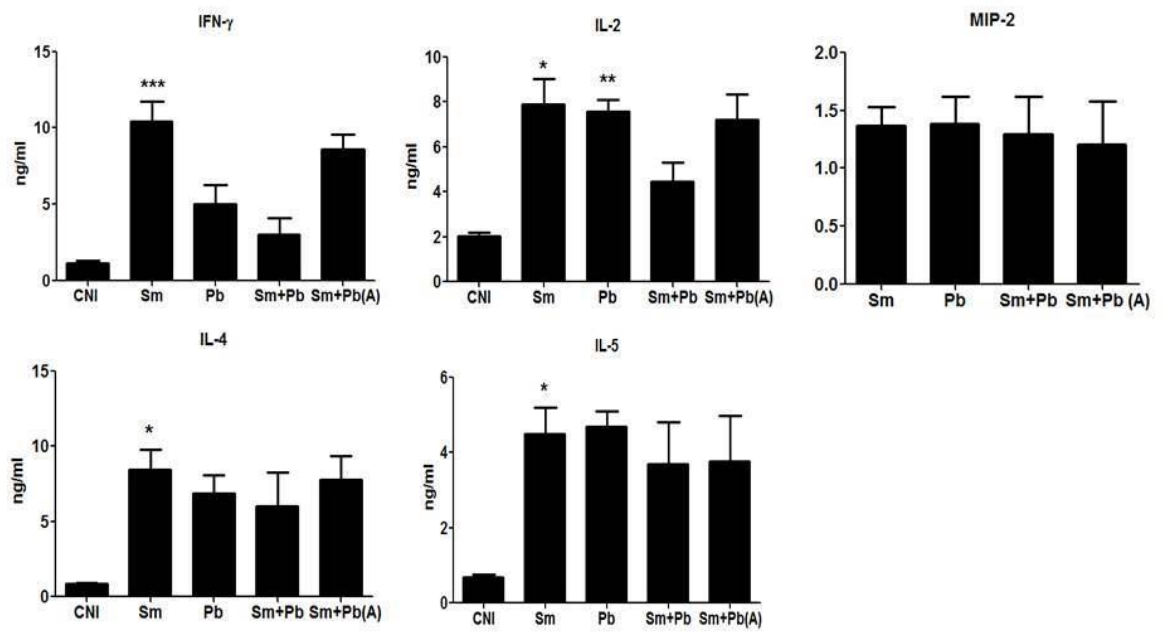
#### 4.3.5 Citocinas em fase crônica

Para  $\text{INF-}\gamma$ , durante a fase crônica, foi observado que no grupo Sm ( $10,45 \pm 3,67 \text{ ng/ml}$ ) teve níveis mais elevados desta citocina quando comparado ao grupo CNI ( $1,14 \pm 0,48 \text{ ng/ml}$ ), com diferenças significativas elevadas.

Em relação a IL-2, foram observadas diferenças significativas nos níveis desta citocina entre os grupos Sm ( $7,90 \pm 3,16 \text{ ng/ml}$ ) e Pb ( $7,54 \pm 1,41 \text{ ng/ml}$ ) quando comparados ao grupo CNI ( $2,01 \pm 0,39 \text{ ng/ml}$ ).

Para a quimiocina MIP-2, não foram observadas diferenças significativas nos níveis desta citocina durante a fase crônica entre os grupos *S. mansoni*, *P. brasiliensis* e *S. mansoni + P. brasiliensis*.

Os níveis de IL-4 apresentaram diferenças significativas elevadas entre o grupo Sm ( $8,46 \pm 3,71 \text{ ng/ml}$ ) quando comparado ao grupo CNI ( $0,85 \pm 0,15 \text{ ng/ml}$ ). E para IL-5, diferenças significativas foram observadas nos grupos Sm ( $4,47 \pm 1,88 \text{ ng/ml}$ ) quando comparados ao grupo CNI ( $0,67 \pm 0,21 \text{ ng/ml}$ ).



**Figura 19** - Perfil da dosagem de citocina IFN- $\gamma$ , IL-2, MIP-2, IL-4 e IL-5 em soro de camundongo infectado e analisado em fase crônica. Sm: camundongos infectados por *S. mansoni* analisados em fase crônica. Pb: camundongos infectados por *P. brasiliensis*. Sm+Pb(C): camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectedos por *P. brasiliensis* em fase crônica. Sm(C) + Pb(A): camundongos infectados por *S. mansoni* coinfectedos por *P. brasiliensis* em fase aguda.

**Fonte:** Do autor.

## 5 DISCUSSÃO

De acordo com Lello (2012), a mistura das espécies de parasita varia de acordo com a região geográfica e a idade dos indivíduos. Nos indivíduos, a interação pode variar desde mecanismo mecânico (como, por exemplo, bactérias oportunistas que exploram as úlceras causadas por *Leishmania* spp.), competição (como a coinfeção de ancilostomídeos e plasmídeos, ambos utilizam células vermelhas do sangue) e interações indiretas complexas mediadas pela resposta imune do hospedeiro.

Estudos que utilizam helmintos e microrganismos representam importante modelo experimental no que se refere a polarização da resposta Th1 e Th2. Na literatura, são descritos trabalhos realizados com o intuito avaliar o efeito da infecção por *S. mansoni* na suscetibilidade da coinfeção por bactérias, protozoários e helmintos (CARVALHO; SANTOS; JESUS 2008), porém pouco se conhece a respeito da patologia desencadeada nestes casos de coinfeção. Ou seja, pouco se conhece a respeito do desenvolvimento do granuloma esquistossomótico sob influência de outro agente infeccioso, o que justifica a realização deste trabalho, e até o momento há poucos relatos de estudos que utilizam o modelo experimental *S. mansoni* e *P. brasiliensis*, levando em consideração a possibilidade da coexistência destes dois agentes patogênicos em diferentes regiões onde há a sobreposição de endemicidade e fluxo migratório de pessoas.

A infecção por *S. mansoni*, tende a direcionar a resposta imunológica do hospedeiro para perfil Th2, com isso pode alterar os mecanismos de defesa contra outros tipos de agentes infecciosos. Portanto, é esperado que, em uma associação da esquistossomose com outras infecções, o hospedeiro obrigatoriamente sofra algum dano. Mas, como a patogênese das lesões teciduais podem estar relacionadas com uma resposta imune exagerada, é possível que esta associação e a modulação da resposta imune beneficiem o hospedeiro dependendo da situação. Desta forma, espera-se que a infecção por *S. mansoni* possa tanto de diminuir as defesas contra outros invasores, como também possa diminuir os processos patológicos (CARVALHO; SANTOS; JESUS, et al., 2008).

No modelo experimental *S. mansoni* e *Plasmodium chabaudi* foi observado que células esplênicas de camundongos coinfectados estimuladas por SEA, produzem níveis menores de IL-4 e IL-5, quando comparadas aos níveis produzidos por células de camundongos infectados somente com *S. mansoni* (WILSON; KHALIFE, 2012). Em contrapartida, o trabalho de FERREIRA (2014), demonstrou que em camundongos

infectados com *S. mansoni* estimulados com LPS, houve uma supressão do processo inflamatório, comprovado com a diminuição dos danos teciduais.

O presente trabalho mostrou que a coinfeção *S. mansoni* e *P. brasiliensis* se estabeleceu e se desenvolveu em modelo murino, o que foi confirmado pela presença de ovos de *S. mansoni* nos tecidos observados e a presença do fungo no epiplon (omento). A partir da análise histopatológica pode se observar um predomínio da formação do granuloma esquistossomótico no fígado e pulmão onde praticamente não se observa a presença de fungos e quando presentes, estes se apresentam com sua forma alterada. Na literatura não existem trabalhos utilizando o camundongo suíço como modelo experimental da coinfeção de *S. mansoni* e *P. brasiliensis*. Oliveira (2014) mostrou em seu trabalho o estabelecimento da coinfeção destes dois agentes em camundongos Balb C.

Ao longo do desenvolvimento da coinfeção, esta parece não interferir no ganho de peso dos camundongos, o mesmo sendo observado no grupo infectados com *S. mansoni*. Já no grupo *P. brasiliensis* observou se um ganho de peso ao longo do experimento. Tal fato sugere que na coinfeção, a ausência de ganho de peso seja devido a infecção por *S. mansoni*, e corrobora com Ferreira (1993), que demonstrou que ao longo da infecção pelo *S. mansoni*, os camundongos perdem peso.

Em relação à sobrevivência, ao longo dos 120 dias de experimento, foi observado que houve mortalidade nos grupos de camundongos infectados com *S. mansoni* e nos camundongos infectados com *S. mansoni* e *P. brasiliensis*, o que sugere que a mortalidade seja devido à infecção com *S. mansoni*. Quando se observa a sobrevivência dos camundongos infectados com *P. brasiliensis* durante os 120 dias de experimento, nenhum camundongo morreu. Os camundongos Swiss comportaram-se como resistentes ao *P. brasiliensis* de acordo tempo de sobrevida observado por nosso grupo (com sobrevida de 100%). Este dado está de acordo com o relato de Mendes e col., em que se observou que camundongos Swiss podem sobreviver por aproximadamente 250 dias infectados por *P. brasiliensis* (dado ainda não publicado).

O presente trabalho analisou a influência da coinfeção no número, evolução e celularidade dos granulomas esquistossomóticos.

Os granulomas foram contados nos tecidos hepático e pulmonar dos diferentes grupos estudados, tanto em fase aguda quanto crônica. Não foram observadas diferenças significativas em relação ao número de granulomas entre os grupos analisados. No trabalho de Oliveira (2014), foi observado uma diminuição do número de granulomas

presentes no fígado, porém além neste trabalho, o modelo experimental utilizado foi camundongos Balb C e a infecção por *S. mansoni* foi realizada após a infecção por *P. brasiliensis* já estar estabelecida. Em relação a contagem em fase aguda e crônica, foram contados mais granulomas em fase crônica do que em fase aguda. A presença de um número maior de granulomas na fase crônica é facilmente justificada pela dinâmica da ovoposição da fêmea de *S. mansoni*. Diariamente cada fêmea ovipõe cerca de 150 a 300 ovos/dia (Lenzi et al., 2008), e destes cerca de 50% são depositados nos tecidos, portanto é de se esperar que ao longo da infecção o número de ovos presentes no fígado vá aumentando, sendo maior em fase crônica.

Durante a coinfeção *S. mansoni* e *P. brasiliensis* observou-se no fígado granulomas com áreas reduzidas durante fase aguda quando comparados ao grupo infectado por *S. mansoni* nesta mesma fase. O mesmo foi observado por Oliveira (2014), utilizando camundongos Balb C. No momento do sacrifício dos camundongos (50 dias após a infecção) as infecções por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* estão em fase aguda, o que sugere que haja recrutamento de células e acredita-se que a diminuição do tamanho do granuloma esquistossomótico seja devida a influência da presença de *P. brasiliensis* no tecido hepático. Esta influência no desenvolvimento do granuloma esquistossomótico pode ser vista em maior destaque quando coinfeção por *S. mansoni* e *P. brasiliensis* se encontram na fase crônica. Nesta fase foi observada que em camundongos com a coinfeção não houve uma diminuição da área dos granulomas como era esperado. Acredita-se que, durante a fase crônica da infecção por *P. brasiliensis*, o granuloma ainda pode apresentar-se em fase produtiva, ou seja, ainda ocorrerá o recrutamento de células.

Porém, quando a inoculação de *P. brasiliensis* ocorre durante a fase crônica de *S. mansoni*, o diâmetro dos granulomas tem seu tamanho reduzido, como no grupo *S. mansoni*. Acredita-se que a inoculação de *P. brasiliensis* na fase crônica de *S. mansoni* já estabelecido não foi capaz de interferir na involução do granuloma.

Tais hipóteses podem ser fundamentadas a partir do que foi observado nos granulomas de camundongos infectados por *S. mansoni*.

No grupo de camundongos infectados por *S. mansoni* os granulomas apresentaram tamanhos elevados durante fase aguda em relação à fase crônica. Na fase aguda, o granuloma encontra-se em estágio produtivo em que as células migram ao redor do ovo de *S. mansoni* para formar um agregado selecionado (LENZI, 2008). Durante a fase crônica, o granuloma encontra-se no estágio de modulação e involução, em que o número de células diminui para iniciar o processo de deposição de colágeno e então formar um

granuloma fibrosado. Além disto, observou-se que os granulomas de ovos recém-estabelecidos apresentavam ao seu redor um número maior de células quando comparados aos granulomas fibrosados, porém com tamanho reduzido, justificando ação da resposta moduladora do tipo Th2.

Como descrito na literatura (LENZI, 2006) o granuloma esquistossomótico pode ser caracterizado pela presença de polimormonucleares (PMN) e mononucleares (MN). Estes tipos celulares foram observados nos granulomas dos grupos infectados por *S. mansoni* e coinfectados com *S. mansoni* e *P. brasiliensis*, tanto no tecido hepático quanto pulmonar. A composição celular do granuloma esquistossomótico inclui eosinófilos, macrófagos, linfócito, neutrófilos, mastócitos e fibroblastos. Porém, em fase crônica, as células mononucleares são predominantes, isto pode ser compreendido pelo fato deste tipo celular atuar na promoção da síntese de colágeno (METWALI, 1996).

No que diz respeito aos eosinófilos e neutrófilos, o tipo predominante no granuloma esquistossomótico, tanto em fase aguda quanto em fase crônica é o eosinófilo. Segundo a literatura, o eosinófilo é um dos tipos celulares predominante no granuloma causado pelo ovo de *S. mansoni*. A eosinofilia é característica na esquistossomose aguda e pode ocorrer antes que a deposição do ovo se inicie (WYNN et al. 2004). O granuloma induzido pelos ovos de *S. mansoni* contem uma alta taxa de eosinófilos em relação aos neutrófilos. Von lichtenberg e col. (1973) notificaram a frequência de neutrofilia nos granulomas de *S. japonicum*, enquanto que na lesões causadas por e *S. haematobium* foram encontradas raras contagens de neutrófilos. Dentre as várias funções dos eosinófilos (LENZI et al., 1997; ROTHENBERG; HOGAN, 2006), cada vez mais é destacada a participação na remodelação tecidual e limpeza de detritos. Os eosinófilos, além de terem a capacidade de destruir parasitos do *S. mansoni* na presença de anticorpos específicos, pelo mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), também são incriminados na destruição dos ovos depositados pelos vermes (JAMES; COLLEY, 1976), indicando funções dirigidas a diferentes estágios do ciclo do parasito (CAPRON; CAPRON, 1992). Rumbley e col. (1999) afirmam que os eosinófilos constituem aproximadamente 90% das células dos granulomas de fase aguda. Estes dados colaboram com os números de eosinófilos encontrados neste estudo.

Na coinfeção, o tipo celular predominante no granuloma em fase aguda foi o eosinófilo. Entretanto, durante a fase crônica (tanto quando ambos estão em fase crônica quanto *P. brasiliensis* em fase aguda), notou-se o predomínio de neutrófilos. Dados da literatura mostram que o contato do *P. brasiliensis* com o tecido do hospedeiro



desencadeia inicialmente reação inflamatória congestivo-exsudativa com afluxo predominante de neutrófilos (DE CAMARGO, 2000; IABUKI, 1979). A participação destas células na reação inflamatória e na atividade fungicida é induzida pelo fungo e por citocinas produzidas pelas células durante sua interação com fagócitos (CALVI, 2003; PAGLIARI, 2010). Sendo assim a presença de neutrófilos no granuloma pode ser devido a presença do *P. brasiliensis*.

No pulmão, em todos os grupos analisados, foi observada a presença de neutrófilos. Na coinfeção a presença de neutrófilos não pode ser associada à presença do *P. brasiliensis*, uma vez que no grupo de camundongos infectados por *S. mansoni* o neutrófilo também pode ser observado. A chegada de ovos no pulmão acontece durante a fase crônica da infecção, ou seja, após a resposta Th2 estar estabelecida e tal fato pode influenciar no tipo celular presente e no estágio de evolução do granuloma. O diferente estágio de evolução em comparação ao fígado pode ser observado pela sua morfologia e tamanho. Segundo CHUAH e col. (2014) o granuloma esquistossomótico em estágio de reatividade fraca é caracterizado pela acumulação de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos ao redor do ovo recém-depositado que leva a formação de um microabscesso neutrofílico caracterizado pelo estágio produtivo-exsudativo.

O presente trabalho avaliou como a infecção de *Paracoccidoides brasiliensis* pode interferir na resposta imunológica de camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*.

Durante a coinfeção, inicialmente foi observado que o grupo *S. mansoni* + *P. brasiliensis* em fase aguda, apresentou a uma redução de IFN- $\gamma$  mesmo esta citocina estando em níveis elevados nas infecções isoladas, sugerindo que a presença de *P. brasiliensis* inibiu a produção de IFN- $\gamma$ , porém, parece não ter interferido nos níveis de IL-2. O mesmo pode ser observado por Oliveira (2014), onde os níveis de IFN- $\gamma$  no tecido hepático se apresentaram reduzidos em comparação as infecções de *S. mansoni* e *P. brasiliensis*, isoladamente. Os níveis de IL-4 também foram reduzidos e os níveis de IL-5 permaneceram inalterados.

Quando comparamos os dados deste grupo com os dos grupos das infecções isoladas, observamos que no grupo de camundongos infectados por *S. mansoni* em fase aguda, mais especificamente, após 50 dias de infecção, os níveis de citocinas típicas da resposta Th1 (IFN-  $\gamma$  e IL-2) apresentaram se menores do que na fase crônica. O mesmo pode ser observado em relação a IL-4 e IL-5, porém, neste caso era de se esperar, uma vez que estas citocinas são típicas da resposta Th2 estabelecida na fase crônica.

Contradizendo o que é observado na maioria dos relatos da literatura, no presente trabalho não foi observada diminuição dos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-2 na fase crônica no grupo infectado por *S. mansoni*. Apesar disso, alguns trabalhos relatam a possibilidade de níveis elevados de IFN- $\gamma$  durante a fase crônica da esquistossomose. Dentre eles, TEIXEIRA-CARVALHO (2005) mostrou alta produção de IFN- $\gamma$  por linfócitos do sangue periférico de pacientes infectados por *S. mansoni* em fase crônica.

Em uma infecção normal, quando os primeiros ovos são produzidos por vermes recém-amadurecidos, a resposta imune assume uma forma diferente, tornando-se fortemente polarizada para Th2 por volta da oitava semana (PEARCE et al., 2004). Tal fato justificaria a discrepância entre o que está descrito na literatura referente a fase aguda e crônica da infecção por *S. mansoni* e os dados observados no trabalho. Acredita-se que os baixos níveis de IFN e níveis elevados de IL-4 e IL-5 encontrados em fase aguda, sejam devido a polarização da resposta imune, onde citocinas Th1 se encontram em queda e as de Th2 em alta (PEARCE; MACDONALD; 2002). Além disso a análise foi realizada no 50º dia de infecção, período em que, segundo Pearce (2004) ocorre a polarização Th1-Th2.

A fase pró-inflamatória da resposta Th1 nos grupos observados pode ser comprovada a partir níveis aumentados da quimiocina MIP-2 na fase aguda quando comparados a fase crônica na qual foi observada a diminuição desta citocina.

Já na fase crônica, quando ocorre o inóculo de *P. brasiliensis* no início da fase aguda, e os dois evoluem juntamente para a fase crônica, pode se observar o padrão clássico da resposta Th2, com níveis baixos de IFN- $\gamma$  e IL-2 e altos níveis de IL-4 e IL-5. Porém quando ocorre o inóculo de *P. brasiliensis* já em fase crônica de *S. mansoni*, foi observado uma alteração dos níveis de citocinas da resposta Th1 (IFN- $\gamma$  e IL-2), porém as citocinas IL-4 e IL-5 se mantiveram elevadas. Este resultado sugere que a infecção por *P. brasiliensis* influencia o perfil da resposta imunológica dos camundongos, e que esta influência depende do momento em que ocorre o inóculo, visto que, segundo a literatura, a fase crônica da esquistossomose é caracterizada por uma baixa produção de IFN- $\gamma$  e um aumento da produção das citocinas da resposta imune Th2, como a IL-4 e IL-5 (JESUS et al., 2000).

## 6 CONCLUSÃO

1. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que os camundongos Swiss são resistentes a infecção por *P. brasiliensis*, uma vez que não foi observada morte nos grupos estudados e nem processo patológico nos tecidos analisados devido a presença do fungo.
2. A coinfeção foi confirmada, uma vez que foi observado granulomas esquistossomóticos no fígado e no pulmão, e a presença do fungo no epiplon e ovos do *S. mansoni* no mesmo tecido.
3. O número de granulomas encontrados nos tecidos não foi diferente entre os grupos estudados, porém acredita-se que a presença de *P. brasiliensis* influenciou da involução do granuloma no fígado.
4. O maior número de neutrófilos no fígado em fase crônica no grupo coinfectado mostra a influencia da presença do fungo no recrutamento de células durante o processo granulomatoso.
5. Acredita-se que a presença de *P. brasiliensis* pode acarretar a reativação da resposta granulomatosa e a mudança na sua composição celular e que estas alterações possam estar relacionado a alteração no perfil de IFN- $\gamma$ .

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.; MURPHY, K. M; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, United Kingdom, n. 383, p. 787-793, 1996.
- ABU-MADI, M.A. et al. Descriptive epidemiology of *Heligmosomoides polygyrus* in *Apodemus sylvaticus* from three contrasting habitats in south-east England. **Journal of Helminthology**, New York, v.72, p.93– 100, 1998.
- ACOSTA-RODRIGUEZ, E.V. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. **Nature Immunology**, United Kingdom, v.8, n.6, p.639-46, 2007.
- ANDRADE, Z.A. A patologia da esquistossomose humana. In: CARVALHO, O.S., COELHO, P.M.Z., LENZI, H. *Schistosoma mansoni* & *Esquistossomose*: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro:Fiocruz, 2008, p. 547.
- BALMER, O,TANNER, M. Prevalence and implications of multiple-strain infections. **Lancet. The Journal of Infectious Diseases**, Cary, v.11, p.868–878, 2011.
- BARROZO, L.V. et al.. Climate and acute/subacute paracoccidioidomycosis in a hyper-endemic area in Brazil. **International Journal of Epidemiology**, New York, v. 38, p. 1642-9, 2009.
- BENARD, G. An overview of the immunopathology of human paracoccidioidomycosis. **Mycopathologia**, California, v. 165, p. 209-221, 2008.
- BEHNKE, J. M., et al. Do the helminth parasites of wood mice interact? **Journal of Animal Ecology**, United Kingdom, v.74, p.982–993, 2005.
- BELLISIMO-RODRIGUES, F. et al. Paracoccidioidomycosis epidemiological features of a 1,000-cases series from a hyperendemic area on the southeast of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Oakbrook Terrace, v. 85, n. 3, p. 546-550, 2011.

BERLINER, M. D.; RECA, M. E. Vital staining of *Histoplasma capsulatum* with Janus Green B. **Sabouraudia**, United Kingdom , v. 5, p.25-29, 1966.

BISINELLI, J.C., FERREIRA, M.L.S. Doenças infecciosas: paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana). In: Tommasi AF. **Diagnóstico em patologia bucal**. 3ª ed. São Paulo: Pancast, p. 202-9, 2002.

BLANK, J. et al. Mycobacterium tuberculosis Coinfection Has No Impact on Plasmodium berghei ANKA-Induced Experimental Cerebral Malaria in C57BL/6 Mice. **Infection and Immunity**, Washington. v.84, n.2, p.502-510, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 7. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BINA J.C, PRATA, A. A evolução natural da esquistossomose em uma área endêmica. In: **Aspectos peculiares da infecção por *Schistosoma mansoni***. Centro de Estudos e Doenças Regionais. Salvador: Centro editorial e didático da Universidade Federal da Bahia, Bahia, p.13-33, 1984.

BISINELLI, J.C., FERREIRA, M.L.S. Doenças infecciosas: paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana). In: Tommasi AF. **Diagnóstico em patologia bucal**. 3ª ed. São Paulo: Pancast. p. 202-9, 2002.

BOROS, D. L.; LUKACS, N. W. The role of egg antigens, cytokines in granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n. 4, p. 75-79, 1992.

CALDAS, S. et al. Therapeutic responses to different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs in experimental infection by benznidazole-resistant parasite stock. **Parasitology - Cambridge University Press**, United Kingdom, v.141, n. 12, p. 1-10, 2014.

CALICH, V. L.; KASHINO S. S. Immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Research in Immunology**. v.149, n.4-5, p.407-17, 1998.

CALICH, V.L.G. et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection **Mycopathologia**, California, v.165, n.(4-5), p.223-36.

CALVI, S.A., et al. Effect of cytokines on the in vitro fungicidal activity of monocytes from An Bras paracoccidioidomycosis patients. **Microbes and Infection**, United Kingdom, v.5, p.107-13, 2003.

CAPRON, M.; CAPRON, A. **Effector functions of eosinophils in schistosomiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, n.4, p. 167-170, 1992.

CATTADORI, I.M., BOAG B, HUDSON, P.J. Peak shift and epidemiology in a seasonal host–nematode system. **Proceedings of Royal Society**, United Kingdom, v.272, p.1163-1169, 2005.

CARVALHO, E.M, SANTOS, S. B., JESUS, A. R. A resposta imune no contexto das co-infecções associadas à esquistossomose. In: CARVALHO, O.S., COELHO, P.M.Z, LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008, 20 ed., cap. 23, p. 718-730.

CHENSUE S.W. et al. Role of IL-4 and IFN- $\gamma$  in *Schistosoma mansoni* egg induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution and relationship to macrophage function. **The Journal of Immunology**, Rockville, v.148, p.900-906, 1992.

CHUAH, C. et al. Cellular and chemokine-mediated regulation in schistosome-induced hepatic pathology. **Trends in Parasitology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 141–150, 2014.

COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **Lancet**, London, v. 383, n. 9936, p. 2253–64, 2014.

DALE, D.C., BOXER, L., LILES, W.C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood Journal**, Washington, v.112, n.4, p.935-45, 2008.

DECARLI, M.L. et al. Serum antibody levels correlate with oral fungal cell numbers and influence the patients' response to chronic paracoccidioidomycosis. **Mycoses**. v.58, e.6, p.356-61., 2015

DEFRANCO, A., LOCKSLEY, R., ANDROBERTSON, M. Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease, **New Sciences Press**, Northants, UK, 2007.

DEJESUS, A. R. et al. Clinical and Immunologic Evaluation of 31 Patients with Acute *Schistosomiasis mansoni*. **The Journal of Infection Diseases**, Cari, v.185, n.1, p. 98-105, 2002.

FALLON, P.G., SMITH, P., AND DUNNE, D.W. Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. **European Journal of Immunology**, Germany, v.28, p.1408–1416., 1998.

FAVA NETO, C.; CASTRO, R. M.; GOLÇALVES, A. P. Ocorrência familiar de Blastomicose Sul Americana: a propósito de 14 casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 7, p. 332 -6, 1965.

FERRARI, N. et al. The role of host sex in parasite dynamics: field experiments on the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis*. **Ecology Letters**. v.7, p.88–94, 2004

FERREIRA, H.S et al. Intestinal protein absorption in malnourished mice with acute *Schistosomiasis mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.88, p.581-587, 1993.

FERREIRA, A. E. R. **Avaliação do processo inflamatório pulmonar em murinos infectados com *Schistosoma mansoni* e estimulados com LPS**. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, 2014.

FORTES, M. R. P. et al. Imunologia da paracoccidiodomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasil, v.86, n.3, p.516-25, 2001.

FRANCO, M. et al. Paracoccidiodomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 20, p. 129-32. 1987.

GARCIA, I., et al. High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF and IFN- $\gamma$  in the

differentiation of protective granulomas. **European Journal of Immunology**. UK, v. 27, p. 3182–3190, 1997.

GEORGE, P. J. et al. Helminth infections coincident with active pulmonary tuberculosis inhibit mono- and multifunctional CD4+ and CD8+ T cell responses in a process dependent on IL-10. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v.10, n.9, 2014.

GRAHAM, A.L et al. Transmission consequences of co-infection: cytokines writlarge? **Trends Parasitology**, Amsterdam, v.23, p.284–291, 2007.

GROCOTT, R. G. A stain for fungi in tissue sections and smears, using Gomori's methenamine-silver nitrate technic. **American Journal of Clinical Pathology**, UK, v.25, p. 975-979, 1955.

HAMS, E. et al. The Schistosoma granuloma: friend or foe. **Friends in immunology**. 2013.

HERBERT, D.R. et al. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and down modulates T helper 1 responses and immunopathology. **Immunity**, v.20, p.623–635, 2004.

HOTEZ P.J., FENWICK, A. Schistosomiasis in Africa: an emerging tragedy in our new global health decade. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, US, . v.3, n. 485, 2009.

HURST, M.H., WILLINGHAM, A.L., LINDBERG, R. Tissue responses in experimental schistosomiasis japonica in the pig: a histopathologic study of different stages of single low – or high- dose infections. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.24, p.151-159, 2000.

IABUKI K., MONTENEGRO M.R. Experimental paracoccidioidomycosis in the Syrian hamster: morphology, ultrastructure and correlation of lesions with presence of specific antigens and serum levels of antibodies. **Mycopathologia**. n.67, p.131-41, 1979.

JANKOVIC, D., et al. CD4+ T cell- mediated granulomatous pathology in schistosomiasis down regulated by a B cell dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. **Journal of Experimental Botany**, v.187, p. 619–629, 1998.



JAMES, S. L.; COLLEY, D. G. Eosinophil mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. **Journal Reticuloendothelial Society**. v.20, p.359-374, 1976.

KASHINO, S. S. et al. Resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* is linked to a preferential Th1 immune response, whereas susceptibility is associated with absence of IFN -  $\gamma$  production. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, San Fransisco, v. 20, n. 1, p. 89 – 97, 2000.

KRAKOWER, C., HOFFMAN, W.A., AXTMAYER, J.H. The fate of schistosomes (*S. mansoni*) in experimental infections of normal and vitamin A deficient white rats. **The Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine**. v.16, p.269-345, 1940.

KNAPP, K. L., RICE, N. A. Human Coinfection with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* in the United States. **Journal of Parasitology Research**. v. 2015, p. 1-11, 2015.

LAMB, R.L., WILSON, S, KHALIFE, J. Malaria and Schistosomes. **Immunity to Parasitic Infection**. 2011

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, São Paulo, v. 105, n. 4, p. 422–35, jul. 2010.

LELLO, J. et al. The relative contribution of co-infection to focal infection risk in children. **Royal Society Publishing**, London, v.280, p.2012-2813, 2012.

LENGELER C, UTZINGER J, TANNER M. Questionnaires for rapid screening of schistosomiasis in sub-Saharan Africa. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 80, p. 235–242. 2002.

LENZI, H. L., LENZI, J. A. Comparative distribution of eosinophils in bone marrow, blood and peritoneal cavity in murine schistosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Brasil, v.23, p.989-994, 1997

LENZI, H.L., ROMANHA, W. S. Schistosomal granuloma is like a small multicelular organism that operates as a complex system. In: CARVALHO, O.S; COELHO; P.M.Z; LENZI, H.L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008, 20 ed., cap,19.

LENZI, H.L., et al. Four whole-istic aspects of schistosome granuloma biology: fractal arrangement, internal regulation, autopoietic component and closure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.101, e.1, p.219-231, 2006.

LITCHEMBERG, F.V.O.N. Studies on granuloma formation. III antigen sequestration and destruction in the schistosomae pseudotubercle. **American Journal of Pathology**. 45: 75-94. 1964.

MALUF, M.L.F., et al. Prevalência de paracoccidiodomicose: infecção determinada através de teste sorológico em doadores de sangue na região noroeste do Paraná, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 36, p. 11. 2003.

MAMONI, R. L. et al. Enhanced production of specific IgG4, IgE, IgA and TGF-beta in from patients with the juvenile form of paracoccidiodomyosis. **Medical Mycology**. v.40, p. 153-162, 2002.

MARQUES, S.A., CORTEZ, D.B., LASTORIA, J.C. Paracoccidiodomicose: Frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasil, v. 82, p.411-7, 2007.

MARQUES, S.A., CORTEZ, D.B., LASTORIA, J.C. Paracoccidiodomicose: Frequência, morfologia e patogênese de lesões tegumentares. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Brasil, v. 82, p.411-7, 2007.

MAZIGO, H.D. et al. Co-infections with *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni* and intestinal helminths among schoolchildren in endemic areas of Northwestern Tanzania. **Parasites Vectors**, USA, v. 3, p. 44, 2010.

MELO, A. L. C., ZECH, P. M. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, p. 203-205, 2005.

METWALI, A. et al. The granulomatous response in murine schistosomes *Schistosoma mansoni* does not switch to Th1 in IL-4 deficient C57BL/6 mice. **The Journal of Immunology**, Rockville, v.157, p. 2.546-4.553, 1996.

MOSMANN, T. R; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annual Review of Immunology**, California, n. 7, p. 145-173, 1989.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I, TAVARES-NETO, J., ALUIZIO PRATA; TOSTA, C.E. Antibody response to *Salmonella typhi* in human *Schistosomiasis mansoni*. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 29, n. 5, 1996.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M.I, TOSTA, C.E., PRATA, A. Salmonelose septicêmica prolongada associada à esquistossomose: evolução do conhecimento e mecanismos imunopatogênicos. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 42, n. 4, p. 436-445. 2009.

NEVES, J. **Esquistossomose mansônica**: clínica da forma aguda ou toxêmica. Rio de Janeiro: Medsi, 1986.

NEVES, J. Forma aguda ou toxêmica da esquistossomose mansônica/ Acute or toxemic form of *Schistosoma mansoni*'s schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.87,n.4: 321-324, 1992.

OLIVEIRA, F. J. **Efeito imunopatológico de co-infecção de camundongos com *Paracoccidioides brasiliensis* e com *Schistosoma mansoni***. 2014. 94f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina,UEL, Londrina, 2014.

OLIVEIRA, S. J. et al. Cytokines and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. **Microbes Infection**, v. 4, p. 129-144, 2002.

PALMEIRA D.C.C. et al. Prevalência da infecção pelo *Schistosoma mansoni* em dois municípios do Estado de Alagoas. **Revista Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasil, v. 43, n. 3, p. 313-7, 2010.

PAGLIARI C, PEREIRA NV, KANASHIRO L, STEGUN FW, CRODA J, DUARTE MI, et al. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 37, p. 565-70, 2010.

PAGLIARI, C., SOTTO, M.N. Dendritic cells and pattern of cytokines in paracoccidioidomycosis skin lesions. **The American Journal of Dermatopathology**, Sal Lake City, v.25, p.107-12, 2003.

PAGLIARI C, PEREIRA NV, KANASHIRO L, STEGUN FW, CRODA J, DUARTE MI, et al. Characterization of cytotoxic immune response in skin and mucosal lesions of paracoccidioidomycosis. **Journal of Cutaneous Pathology**. v.37, p.565-7, 2010.

PEARCE, E. J. et al. Downregulation of Th1 cytokine production of Th2 responses to a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **Jornal of Experimental Medicine**, v.173, p.159-166, 1991.

PEARCE, E. J. et al. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunological Reviews**. v. 201, p. 117–126, 2004.

PEARCE, E.L., MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews**, United Kingdom, v.2, 2002.

PESSOA, S; MARTINS, A. V. **Parasitologia Médica**, 11 ed, Rio de Janeiro, cap. 35, p. 361- 406. 1998.

RAMOS, E.S.M. Paracoccidioidomycosis. **Dermatologic Clinics**. v.26, p.257-69. 2008.

RAMOS, S. P. et al. Antigenuria and antigenemia in experimental murine paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**. v.43, p.631-636, 2005.

JESUS, A. R., et al. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **The Journal of Infectious Diseases**. n.185, p.98-105, 2002.

RICHTER, J. et al. Severe liver fibrosis caused by *Schistosoma mansoni*: management and treatment with a transjugular intrahepatic portosystemic shunt. **The Lancet Infectious diseases**, London, v. 15, p. 731–737, 2015.

- RIGHETTO R.C, et al. Comorbidades e coinfeções em pessoas vivendo com HIV/Aids. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, Fortaleza, v.15, n.6, p.942-8, 2014.
- ROTHENBERG, M.E, HOGAN, S.P. The Eosinophil. **Annual Review of Immunology**, California, v.24, p.147–74, 2006.
- RUMBLEY, C. A. et al. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the Schistosome granuloma. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.162, p. 1003-1009, 1999.
- SINGER-VERMES, L. M.; BURGER, E.; FRANCO, M. F.; et. al. Evaluation of pathogenicity and imunogenicity of seven *Paracoccidioides brasiliensis* isolates in susceptible inbred mice. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 27, n. 2, p. 71-82, 1989.
- SILVA, A., SANTANA, L. B., JESUS, A. R., A Resposta Imune na Forma Aguda da Esquistossomose Mansonii. In: **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008.
- SILVA-VERGARA, M. L.; MARTINEZ, R. Inquérito epidemiológico com paracoccidioidina e histoplasmina em área agrícola de café em Ibiá, Minas Gerais, Brasil. **Revista Iberoamericana de Micologia**, Barcelona, v. 15, n. 4, p. 294-297, Dec. 1998.
- SHER, A. R. et al. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. **The Journal of Immunology, Baltimore**, v. 145, n.11, p. 3911-3916, 1990.
- SHIKANAI-YASUDA et al. Consenso em paracoccidioidomicose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília,. v.39, n.3, p.297-310, 2006.
- STADECKER, M. J. The regulatory role of the antigen-presenting cell in the development of hepatic immunopathology during infection with *Schistosoma mansoni*. **Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, New York, n. 67, p. 269-272, 1999
- STAVITSKY, A. B. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. **Infeccion and immunity**, Washington, v.72, p.1-12, 2004.

STEINBERG, M. S. Adhesion in development: an historical overview. **Developmental Biology**. v.180, p. 377-388, 1996.

TEIXEIRA-CARVALHO, T. **Estudos de Aspectos imunocitoquímicos associados às formas clínicas da esquistossomose mansônica humana**. 2004. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2004.

TORRES-DAMAS,W., YUMPO-CÁRDENAS, Y., MOTA-ANAYA,E. Coinfección de mucormicosis rinocerebral y aspergilosis sinusal. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública**, Lima, v. 32, n. 4, 2015.

VON LICHTENBERG, F. et al. Comparative histopathology of schistosome granulomas in the hamster. **American Journal of Pathology**. v. 72, p. 149-178, 1973.

WEIBEL. E.R, KISTLER, G.S., SCHERLE, W.F. Practical stereological methods for morphometric cytology. **Journal Cell Biology**. v.30,p. 23-37, 1966.

WILSON, S., KHALIFE, J. Malaria and Schistosomes in Lamb, T.J. **Immunity to parasitology infection**, Washington, 2014.

WYNN, T.A. et al. IL-10 regulates liver pathology in acute murine schistosomiasis mansoni but is not required for immune down-modulation of chronic disease. **The Journal of Immunology, Baltimore**, n. 160, p. 4473-4480, 1998.

WHO Expert Committee. Prevention and Control of Schistosomiasis and Soil-Transmitted Helminthiasis. **World Health Organization technical report series**, Geneva, v. 912, p. 1-57, 2002.

WHO. **Preventive chemotherapy in human helminthiasis - coordinated Use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers**. Geneva, World Health Organization, 2006.

ZHU, J; YAMANE, H; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4T Cell populations. **Annual Review of Immunology**, v. 28, p.445-489, 2010.

**ANEXO**  
**ANEXO A – Carta do Comitê de Ética**



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**Universidade Federal de Alfenas . UNIFAL-MG**  
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 . Alfenas/MG . CEP 37130-000  
Fone: (35) 3299-1000 . Fax: (35) 3299-1063



Alfenas, 20 de janeiro de 2014.

Prof<sup>a</sup>. Raquel Lopes Martins Souza

Prezada Professora;

O projeto sob sua coordenação, registro nº 543/2013, intitulado “Análise histopatológica e imunológica de tecidos em camundongos coinfectedados com *Schistosoma mansoni* e *Paracoccidioides brasiliensis*” está em conformidade com os princípios éticos exigidos na experimentação animal, tendo sido apreciado e aprovado por essa Comissão.

Por ser verdade, firmo o presente.

---

Prof Dr Carlos Giovani de Oliveira Nascimento  
Presidente da CEUA – Unifal-MG