



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS DA SAÚDE  
**NÍVEL MESTRADO**

**HISTOMORFOMETRIA DE GRANULOMAS PULMONARES NAS FASES AGUDA  
E CRÔNICA DURANTE A INFECÇÃO MURINA POR *Schistosoma mansoni* E  
ANÁLISE DAS CORRELAÇÕES COM EOSINOFILIA SANGUÍNEA, PRESENÇA  
DE OVOS E GRANULOMAS HEPÁTICOS**

São Luís - MA

2021

**BRUNO MILENO MAGALHÃES DE CARVALHO**

**HISTOMORFOMETRIA DE GRANULOMAS PULMONARES NAS FASES AGUDA  
E CRÔNICA DURANTE A INFECÇÃO MURINA POR *Schistosoma mansoni* E  
ANÁLISE DAS CORRELAÇÕES COM EOSINOFILIA SANGUÍNEA, PRESENÇA  
DE OVOS E GRANULOMAS HEPÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

São Luís - MA

2021

Carvalho, Bruno Mileno Magalhães de.

Histomorfometria de granulomas pulmonares nas fases aguda e crônica durante a infecção murina por *Schistosoma mansoni* e análise das correlações com eosinofilia sanguínea, presença de ovos e granulomas hepáticos / Bruno Mileno Magalhães de Carvalho. - 2021.

84 f.

Orientador(a): Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, SÃO LUÍS, 2021.

1. Eosinófilos. 2. Esquistossomose. 3. Granuloma Pulmonar. 4. Histomorfometria. I. Nascimento, Flávia Raquel Fernandes do. II. Título.

BRUNO MILENO MAGALHÃES DE CARVALHO

**HISTOMORFOMETRIA DE GRANULOMAS PULMONARES NAS FASES AGUDA  
E CRÔNICA DURANTE A INFECÇÃO MURINA POR *Schistosoma mansoni* E  
ANÁLISE DAS CORRELAÇÕES COM EOSINOFILIA SANGUÍNEA, PRESENÇA  
DE OVOS E GRANULOMAS HEPÁTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em        /        /

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento  
Doutora em Imunologia  
(Orientadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Valdênia Maria Oliveira de Souza  
Doutora em Imunologia  
(Examinadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Conceição de Maria Pedrozo e Silva de Azevedo  
Doutora em Ciências Biológicas  
(Examinadora)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rosane Nassar Meireles Guerra  
Doutora em Imunologia  
(Examinadora)

*“NEle estão escondidos todos os tesouros  
da sabedoria e do conhecimento”.*

**(Colossenses 2:3)**

**Dedico**

À minha família.

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de acordar cada manhã e usufruir de suas majestosas obras. Mesmo diante da minha pequenez.

À minha esposa Ana e ao meu filhinho Bruno que estiveram ao meu lado nesta caminhada, na alegria ou na tristeza, com amor, força e compreensão. Assim como às orações e aos ensinamentos da minha mãe e de todo o restante da família. Sinto-me a pessoa mais abençoada da face da Terra por tê-los comigo.

À minha orientadora professora Dra. Flávia Nascimento de quem sou admirador e grato desde os primeiros passos acadêmicos. Seria impossível expressar palavras sem minimizar meu sentimento de dívida e carinho por alguém tão competente e especial.

Às professoras Dra. Conceição Pedrozo e Dra. Rosane Guerra, porque devo a elas mais do que aprendi na faculdade de medicina. É notável o tamanho do conhecimento e a generosidade de cada uma.

Às professoras Dra. Marcia Maciel e Dra. Lucilene Amorim, pois estiveram sempre de braços abertos ao longo desta caminhada. Lembrarei sempre nas minhas orações!

Aos fundamentais colaboradores Irla, Gustavo, Jefferson, Gleyka, Victor, Gabriela, Ranielly, Dimitrius e Camilo, entre outros tantos colegas do Laboratório de Imunofisiologia, que ofertaram direcionamento e amizade. Aprendi ciências da saúde além dos livros.

Aos professores e discentes das bancas do programa, especialmente à professora Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza, ao professor Dr. Lívio Martins e ao professor Dr. Rafael Carvalho, pois contribuíram com ideias e conselhos de extremo valor.

Às mensagens e apoio dos mais que colegas, discentes do programa de mestrado em Ciências da Saúde.

À minha equipe de cirurgia torácica Alexandre, Cláudio e Frederico, que foram sensíveis e companheiros sempre me permitindo um ajuste de tempo para meu crescimento na docência.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão pela oportunidade e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão pelo incentivo.

## SUMÁRIO

|       |                                                                        |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------|----|
| 1     | INTRODUÇÃO.....                                                        | 1  |
| 2     | REFERENCIAL TEÓRICO.....                                               | 4  |
| 2.1   | Aspectos gerais da esquistossomose por <i>Schistosoma manson</i> ..... | 4  |
| 2.1.1 | Histórico.....                                                         | 4  |
| 2.1.2 | Epidemiologia.....                                                     | 5  |
| 2.1.3 | Ciclo biológico.....                                                   | 7  |
| 2.1.4 | Resposta imunológica durante o ciclo de <i>S. mansoni</i> .....        | 10 |
| 2.2   | Eosinófilos.....                                                       | 14 |
| 2.3   | Granulomas na Esquistossomose.....                                     | 16 |
| 2.3.1 | Granulomas pulmonares.....                                             | 18 |
| 2.4   | Esquistossomose pulmonar aguda.....                                    | 20 |
| 2.4.1 | Fisiopatologia e quadro clínico.....                                   | 21 |
| 2.4.2 | Diagnóstico.....                                                       | 22 |
| 2.4.3 | Tratamento.....                                                        | 24 |
| 2.5   | Esquistossomose pulmonar crônica.....                                  | 24 |
| 2.5.1 | Fisiopatologia e quadro clínico.....                                   | 25 |
| 2.5.2 | Diagnóstico.....                                                       | 26 |
| 2.5.3 | Tratamento.....                                                        | 27 |
| 2.6   | Novas classificações da esquistossomose pulmonar podem surgir.....     | 28 |
| 3     | OBJETIVOS.....                                                         | 31 |

|     |                                                                                                                                 |    |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1 | Geral.....                                                                                                                      | 30 |
| 3.2 | Específicos.....                                                                                                                | 30 |
| 4   | MATERIAL E MÉTODOS.....                                                                                                         | 32 |
| 4.1 | Obtenção e manutenção dos caramujos <i>Biomphalaria glabrata</i> .....                                                          | 32 |
| 4.2 | Obtenção das cercarias.....                                                                                                     | 32 |
| 4.3 | Animais.....                                                                                                                    | 32 |
| 4.4 | Delineamento Experimental.....                                                                                                  | 33 |
| 4.5 | Contagem de ovos nas fezes e no fígado.....                                                                                     | 34 |
| 4.6 | Avaliação de leucograma.....                                                                                                    | 35 |
| 4.7 | Avaliação histopatológica e histomorfométrica dos pulmões.....                                                                  | 35 |
| 4.8 | Análise estatística.....                                                                                                        | 36 |
| 5   | RESULTADOS .....                                                                                                                | 37 |
| 5.1 | Ovos nas fezes e no fígado comprovaram a infecção dos animais por <i>Schistosoma mansoni</i> .....                              | 37 |
| 5.2 | Animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> apresentaram leucocitose e eosinofilia sanguínea aos 60 e 90 dias.....        | 37 |
| 5.3 | O tecido pulmonar de animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> apresentou granulomas somente aos 90 dias.....           | 38 |
| 5.4 | Animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> apresentaram granulomas pulmonares mais raros, menores e mais tardios.....    | 42 |
| 5.5 | Na fase crônica, a eosinofilia sanguínea está associada a quantidade de ovos nas fezes e ao número de granulomas hepáticos..... | 45 |
| 6   | DISCUSSÃO.....                                                                                                                  | 48 |

|   |                                              |    |
|---|----------------------------------------------|----|
| 7 | CONCLUSÕES.....                              | 55 |
|   | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....              | 56 |
|   | ANEXOS.....                                  | 67 |
|   | ANEXO A - Declaração do comitê de Ética..... | 67 |

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

**CDC:** Centro Americano de Controle e de Prevenção de Doenças

**CEUA:** Comissão de Ética para o Uso de Animais

**DP:** Desvio padrão

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**ECP:** Proteína catiônica eosinofílica

**EDN:** Neurotoxina derivada do eosinófilo

**EM:** esquistossomose mansônica

**EP:** Estágio exsudativo-produtivo

**EPO:** Peroxidase eosinofílica

**FcεR:** receptor de alta afinidade para IgE

**GIDE:** Grupo Interdepartamental de Estudos sobre a Esquistossomose

**GM-CSF:** fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos

**HAP:** hipertensão arterial pulmonar

**HE:** hematoxilina e eosina

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogênio

**TNF-α :** Interferon-alfa

**IFN-γ:** Interferon-gama

**IgE:** Imunoglobulina E

**IgG :** Imunoglobulina G

**IL:** Interleucina

**ILCs:** células linfóides inatas

**LIF:** Laboratório de Imunofisiologia

**MBP:** Proteína básica principal

**MS:** Ministério da Saúde

**M1:** Macrófagos do tipo 1/ Classicamente Ativado

**M2:** Macrófagos do tipo 2/ Alternativamente Ativado

**NE:** Estágio necrótico-exsudativo

**NIS:** *Elements advanced research*

**NK:** Natural Killer

**P:** Estágio produtivo

**PBS:** Salina Tamponada com Fosfato, do inglês Phosphate Buffered Saline

**PBS:** Tampão fosfato de Sódio

**PCE:** Programa de Controle para Esquistossomose

**PCR:** proteína C-reativa

**PE:** Estágio exsudativo pré-granulomatoso

**pH:** Potencial hidrogeniônico

**SIGLECs:** lectinas semelhantes à imunoglobulina de ligação ao ácido siálico

**TGF:** Fator transformador de crescimento

**Th:** Linfócitos T helper

**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral alfa

**UFMA:** Universidade Federal do Maranhão

**UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais

**WHO:** Organização Mundial de Saúde, do inglês Word Health Organization

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                   |                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b>  | Distribuição mundial de algumas espécies de <i>Schistosoma</i> capazes de infectar humanos.....                                                                                                                                 | 6  |
| <b>Figura 2.</b>  | Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .....                                                                                                                                                                             | 9  |
| <b>Figura 3.</b>  | Resposta imune durante infecção por <i>Schistosoma</i> .....                                                                                                                                                                    | 13 |
| <b>Figura 4.</b>  | Eosinófilo corado com eosina.....                                                                                                                                                                                               | 14 |
| <b>Figura 5.</b>  | Mecanismo de ação do eosinófilo frente ao esquistossômulo.....                                                                                                                                                                  | 15 |
| <b>Figura 6.</b>  | Lâminas com granulomas hepáticos de acordo com a classificação abordada.....                                                                                                                                                    | 18 |
| <b>Figura 7.</b>  | Fisiopatologia do granuloma pulmonar.....                                                                                                                                                                                       | 19 |
| <b>Figura 8.</b>  | Corte histológico pulmonar demonstrando em A uma lesão plexiforme e em B um granuloma com ovo do parasito no seu interior.....                                                                                                  | 20 |
| <b>Figura 9.</b>  | Esquistossomose aguda em um pulmão de camundongo.....                                                                                                                                                                           | 21 |
| <b>Figura 10.</b> | Fases da esquistossomose pulmonar.....                                                                                                                                                                                          | 21 |
| <b>Figura 11.</b> | Tomografia de tórax de paciente com parênquima pulmonar normal em (A) e parênquima pulmonar com esquistossomose aguda em (B).....                                                                                               | 23 |
| <b>Figura 12.</b> | Tomografia de tórax de paciente com lesão pseudotumoral por esquistossomose em lobo inferior esquerdo (seta).....                                                                                                               | 26 |
| <b>Figura 13.</b> | Radiografia de tórax em PA normal com descrição anatômica radiológica em (A), e em (B) exame de paciente com esquistossomose pulmonar vascular hipertensiva que apresenta aumento do tronco pulmonar como indicado na seta..... | 27 |

|                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|-------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 14.</b> | Novas classificações da esquistossomose pulmonar: (a) Fase aguda ou síndrome de katayama; (b) fase intermediária, crônica inicial ou reversível; (c) Fase crônica ou irreversível .....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 29 |
| <b>Figura 15.</b> | Parasitas adultos de <i>S. mansoni</i> (seta vermelha) encontrados próximo à granulomas pulmonares (setas pretas) de camundongos com 12 semanas de infecção.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 30 |
| <b>Figura 16.</b> | Organograma experimental dos ensaios realizados após eutanásia dos camundongos.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 33 |
| <b>Figura 17.</b> | Número total de ovos encontrados nas fezes (A) e no fígado (B) de animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> . ....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 37 |
| <b>Figura 18.</b> | Cortes histológicos de tecido pulmonar de camundongos do grupo L (A) e grupo INF60 (B) corados com HE.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 40 |
| <b>Figura 19.</b> | Corte histológico de tecido pulmonar de camundongo do grupo INF60.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 41 |
| <b>Figura 20.</b> | Cortes histológicos de tecido pulmonar de camundongos com 90 dias de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 43 |
| <b>Figura 21.</b> | Aspectos dos granulomas encontrados nos diferentes grupos camundongos infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 44 |
| <b>Figura 22.</b> | Correlação entre as variáveis de eosinófilos no sangue e ovos nas fezes em (a) e (b), eosinófilos no sangue e ovos no fígado em (c) e (d), eosinófilos e número de granulomas hepático em (e) e (f), eosinófilos e área de granulomas hepáticos em (g) e (h), ovos nas fezes e número de granulomas hepáticos em (i) e (j), e ovos nas fezes e área dos granulomas hepáticos, em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> dos grupos INF 60 e INF90 respectivamente. .... | 46 |
| <b>Figura 23.</b> | Correlação entre as variáveis de eosinófilos no sangue e número de granulomas pulmonares em (a), eosinófilos no sangue e área de granulomas pulmonares em (b), ovos nas fezes e número de granulomas pulmonares em (c), ovos nas fezes e área de granulomas pulmonares em (d), ovos no fígado e número de                                                                                                                                                                          |    |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| granulomas pulmonares em (e), ovos no fígado e área de granulomas pulmonares em (f), número de granulomas pulmonares e número de granulomas hepáticos em (g) e área de granulomas pulmonares e área de granulomas hepáticos em (h), em animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> do grupo INF90..... | 47 |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

## LISTA DE TABELAS

|                  |                                                                                                                                                 |
|------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tabela 1.</b> | Contagem total de eosinófilos do sangue de camundongos infectados ou não por <i>Schistosoma mansoni</i> .....38                                 |
| <b>Tabela 2.</b> | Análise histopatológica do tecido pulmonar de camundongos limpos ou infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e eutanasiados com 60 dias.....39 |
| <b>Tabela 3.</b> | Número e área de granulomas encontrados no fígado e pulmão de animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> .....43                         |

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença de caráter debilitante que pode acometer vários tecidos do corpo humano. A resposta imunológica se inicia com predomínio de células Th1 e gradualmente é substituída para o perfil Th2 a partir da oviposição, para a formação e maturação dos granulomas. Enquanto o pulmão é um dos órgãos mais suscetíveis, pois está vulnerável ao parasito tanto na fase aguda quanto na fase crônica. Dentro deste contexto, o objetivo do trabalho é descrever as alterações histopatológicas e histomorfométricas no pulmão de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* bem como, investigar correlações com a presença de eosinófilos no sangue, ovos do parasito e granulomas hepáticos. Inicialmente, camundongos Swiss machos foram infectados via percutânea com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni* e eutanasiados após 60 (INF60) e 90 dias da infecção (INF90). Em cada tempo, também houve eutanásia em um grupo composto por animais não infectados. O sangue foi obtido por punção pelo plexo orbital para avaliação de leucócitos. O reto e fígado foram retirados respectivamente para comprovação da infecção e comparação histomorfométrica. Enquanto os pulmões foram removidos para análise histopatológica e histomorfométrica. Os dados mostraram que em sessenta dias da infecção, havia uma eosinofilia local e sistêmica ( $p < 0,0001$ ), associado ao processo inflamatório tecidual, com formação pré-granulomatosa e predomínio de granulócitos no tecido pulmonar, período em que já havia vários granulomas maduros no fígado. Aos noventa dias da infecção, observou-se o aparecimento de granulomas pulmonares e uma diminuição da eosinofilia sanguínea, a qual mostrou correlação com a quantidade de ovos nas fezes ( $r = -0,8$  e  $p = 0,01$ ) e número de granulomas no fígado ( $r = -0,8$  e  $p = 0,01$ ). Os dados ratificam a importância da participação dos eosinófilos no processo podendo ser capaz de discriminar momentos evolutivos e a intensidade da doença até o início da cronificação, como também expõe um retardo da doença pulmonar em comparação a doença hepática. Os dados apresentados neste trabalho ratificam a necessidade de observar a esquistossomose pulmonar como uma doença individualizada em seu diagnóstico, classificação e conduta.

**Palavras-chave:** Eosinófilos; Histomorfometria; Granuloma Pulmonar; Esquistossomose.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a debilitating disease that can affect various tissues of the human body. The immune response starts with a predominance of Th1 cells and gradually changes to the Th2 profile from oviposition, for the formation and maturation of granulomas. While the lung is one of organs most susceptible organs, it is vulnerable to the parasite in both the acute and chronic phases. Within this context, the objective of this work is to describe the histopathological and histomorphometric alterations in the lung of mice infected with *Schistosoma mansoni*, as well as to investigate correlations with the presence of eosinophils in the blood, parasite eggs and hepatic granulomas. Initially, male Swiss mice were percutaneously infected with 50 cercariae of *Schistosoma mansoni* and euthanized after 60 (INF60) and 90 days after infection (INF90). At each time point, there was also euthanasia in a group composed of uninfected animals. Blood was obtained by puncture through the orbital plexus for evaluation of leukocytes. The rectum and liver were removed respectively to prove the infection and histomorphometric comparison. While the lungs were removed for histopathological and histomorphometric analysis. The data showed that within sixty days of infection, there was local and systemic eosinophilia ( $p < 0.0001$ ), associated with a tissue inflammatory process, with pre-granulomatous formation and a predominance of granulocytes in the lung tissue, a period in which there were already several mature granulomas in the liver. Ninety days after the infection, the appearance of pulmonary granulomas and a decrease in blood eosinophilia were observed, which was correlated with the number of eggs in the feces ( $r = -0.8$  and  $p = 0.01$ ) and the number of granulomas in the liver ( $r = -0.8$  and  $p = 0.01$ ). The data confirm the importance of the participation of eosinophils in the process, being able to discriminate evolutionary moments and the intensity of the disease until the onset of chronicity, as well as exposing a delay in lung disease compared to liver disease. The data presented in this study confirm the need to observe pulmonary schistosomiasis as an individualized disease in its diagnosis, classification, and management.

Keywords: Eosinophils; Histomorphometry; Pulmonary Granuloma; Schistosomiasis.

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, cerca de 250 milhões de pessoas estão infectadas por algum parasito agente da esquistossomose, enquanto outras centenas de milhares permanecem em constante risco de infecção (WHO, 2020). A doença é reconhecida como uma das doenças tropicais negligenciadas, acometendo principalmente países do continente africano, asiático e americano (MACMANUS et al., 2018; MORAES et al., 2019). No Brasil, a doença detém altos índices, principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste (ROCHA et al., 2016).

Dentre as poucas espécies de trematódeos que são capazes de provocar a esquistossomose humana, apenas o *Schistosoma mansoni* tem sido relatado na América do Sul (GOMES et al, 2016; SIMÕES et al., 2017; DI BELLA et al., 2018; MELO et al., 2019). Esta espécie necessita de um hospedeiro intermediário para dar continuidade ao seu ciclo, o caramujo de gênero *Biomphalaria*, muito comum em algumas regiões do continente (SIMOES et al., 2017; MARTINS et al., 2019).

Após deixar o caramujo, as larvas de *S. mansoni*, denominadas cercárias, buscam o hospedeiro definitivo onde penetram através do tegumento causando a dermatite cercariana. As larvas sofrem modificações por dois ou três dias, originando os esquistossômulos, que em seguida, alcançam a corrente sanguínea (SOUZA et al., 2011; MACMANUS et al., 2018; NELWAN, 2019). Essa fase é caracterizada por uma resposta predominantemente Th1, havendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias como interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-6, IL-12, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ). A maioria dessas citocinas ativam células imunes inatas, especialmente macrófagos (PEARCE et al., 2004; HELMY et al., 2005; ZHENG et al., 2020).

Os esquistossômulos sobreviventes são levados pelo fluxo sanguíneo principalmente para o coração, pulmão e sistema porta-hepático, onde amadurecem e vão se transformar em verme adulto. Na veia porta hepática eles acasalam e depois são transportados até a veias mesentérica inferior (BURKE et al., 2009; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Durante esse período inicial, ou fase aguda, os pacientes sintomáticos costumam apresentar febre elevada acompanhada de calafrios, significativa sudorese, mal-estar geral, astenia e tosse não produtiva. A eosinofilia e as alterações radiológicas são comuns (BAHAROON et al., 2011; MACMANUS et al., 2018).

A fêmea adulta inicia a postura dos ovos por volta da quarta a sexta semana após a penetração cercariana (JENKINS-HOLICK, 2013; ZHENG et al., 2020). A oviposição contribui para a mudança do perfil tipo 1 para o tipo 2, quando há uma expansão das células Th2, eosinófilos e basófilos, aumentando a produção de IL-4, IL-5 e IL-13 e IgE, além da polarização de macrófagos em direção ao fenótipo M2 (FAIRFAX et al., 2012; SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Os ovos depositados por vermes fêmeas são postos no revestimento endotelial das paredes de capilares e disseminados no lúmen dos vasos ou translocados através do epitélio para o lúmen intestinal. Eles são metabolicamente ativos e altamente antigênicos, e por isso iniciam uma inflamação que leva à formação de um foco granulomatoso ao seu redor (PEARCE; MACDONALD, 2002; SCHWARTZ; FALLON, 2018).

A origem deste foco começa com um estágio pré-granulomatoso em que há uma agregação celular desorganizada que é seguida por um acúmulo gradual de macrófagos e eosinófilos ao redor do ovo recém-depositado. À medida que o granuloma amadurece, células dendríticas, células epitelióides e fibrócitos começam a aparecer na periferia, levando degeneração gradual dos ovos e aparecimento de fibras de colágeno, resultando na esquistossomose crônica (HAMS et al., 2013; BUTROUS, 2019).

O granuloma, ao mesmo tempo em que é nocivo ao indivíduo representando uma intensa reação celular com diversas complicações, também é benéfico, à medida que participam de funções como eliminação dos ovos pela mucosa intestinal e sequestro dos antígenos liberados por ele. Dessa maneira, a evolução mais benigna da esquistossomose depende da formação e modulação granulomatosa (PEARCE; MACDONALD, 2002; HAMS et al., 2013; SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Dentre os vários órgãos atingidos pela doença, o acometimento pulmonar é muito comum podendo chegar a uma prevalência de até 30% em alguns estudos (SOUSA et al., 2011). Clinicamente, as formas vasculares são as mais comuns, contudo, outras complicações já foram registradas como a migração de larvas ao parênquima e lesões pseudoneoplásicas no órgão (RODRIGUES et al., 2009; SOUSA et al., 2011).

A partir de necropsias de pulmões de humanos doentes, Raso e Andrade Filho (2014) demonstraram a lesão tissular associada a numerosos granulomas, por vezes confluentes, pequenos, em fase de fibrose, envolvendo ou não ovos, na parede ou na adventícia de pequenas

artérias ou arteríolas. Os autores também observaram a redução ou oclusão da luz dos vasos, assim como necrose da parede de algumas arteríolas.

Embora haja uma eosinofilia tecidual durante a infecção por *Schistosoma mansoni* em camundongos, mediada por citocinas do tipo 2, como IL-5 e IL-13, o verdadeiro papel do eosinófilo ao longo de todo o processo fisiopatológico ainda é incerto, mesmo que já se tenha relatado que esta célula possa promover a excreção de ovos do parasito ou ser capaz de destruir os miracídios presos dentro do granuloma (CAMPOS; PEREIRA, 2009; SCHWARTZ; FALLON, 2018). Estudos experimentais sobre o assunto apresentaram resultados paradoxos em várias oportunidades. Assim, o verdadeiro impacto da eosinofilia nos pacientes também carece de investigação, especialmente na sua correlação com as características da atividade da doença causadora (FURUTA et al., 2014).

Outro problema constante é que a maioria dos estudos histológicos sobre esquistossomose pulmonar envolveram apenas uma etapa da doença, alternando entre fase aguda ou crônica (após 3 meses de infecção), sem levar em conta a presença de uma possível fase intermediária, como já foi sugerido após alguns achados (GOBBI et al., 2019). O que pode ter gerado resultados insuficientes.

A hipótese deste trabalho é que a eosinofilia sanguínea presente desde o começo da fase aguda da infecção por *S. mansoni* ocorre concomitantemente com eosinofilia tecidual, alterações morfométricas, e histopatológicas no pulmão durante os estágios iniciais, fatores determinantes para uma reclassificação da esquistossomose pulmonar.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Aspectos gerais da esquistossomose por *Schistosoma mansoni*

#### 2.1.1 Histórico

Etimologicamente, a palavra "esquistossomose" vem da união de duas palavras gregas: "schistos" que significa "dividir" e "soma" que significa "corpo". O nome foi proposto no ano de 1858 por David Friedrich Weinland e adotada na Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica, devido a morfologia do verme do sexo masculino (DI BELLA et al., 2018).

Os primeiros achados do parasito transmissor reportam a 1250 a.C., quando ovos de *Schistosoma* foram encontrados em vísceras de múmias egípcias conforme comprovou Ruffer, em 1910. Também existem relatos de que na cidade de Cehang-lha, na China, foram encontrados ovos de *Schistosoma japonicum* em cadáver de cerca de 2.000 anos. Porém, foi somente em 1852 que realmente a doença começou a ser estudada (EL-DIB, 2019).

Neste ano, os pesquisadores alemães Theodor Maximilian Bilharz e Carl Theodor Ernst encontraram rastros da doença através de uma necrópsia no Hospital Kasr-El-Ainy, no Cairo. Bilharz a partir de então, obteve reconhecimento e anos depois originou-se a sinonímia para esquistossomose: "bilharziose" ou "bilharzíase" (DI BELLA et al., 2018; EL-DIB, 2019).

Patrick Manson, o 'Pai da Medicina Tropical', descobriu uma disseminação da esquistossomose na América Central no final do século XIX. Em seus estudos escreveu que tal zoonose possivelmente poderia apontar para algum molusco ou artrópode que as Índias Ocidentais e a África têm em comum, e, assim, indicou o tão procurado hospedeiro intermediário desconhecido da bilharzíase (DI BELLA et al., 2018).

Mais investigações do início do século XX descreveram os vermes adultos, enquanto importantes pesquisadores como Louis Sambon e o brasileiro Pirajá da Silva desvendaram os ciclos e verificaram que os vermes descritos por Bilharz compreendiam de fato, a duas espécies distintas, tanto em morfologia quanto na sua patogenicidade: *Schistosoma haematobium*, mais relacionado ao trato urinário, e *S. mansoni* que tem como importante característica o alojamento em vasos sanguíneos do trato digestivo (BUTROUS, 2019).

A introdução da esquistossomose no Brasil se deu provavelmente entre os séculos XVI e XIX por meio do tráfico de escravos originários da costa ocidental da África. De acordo com esta afirmação, os escravos trouxeram os parasitos ao ingressarem no país principalmente pelos

portos de Recife e Salvador para trabalharem nas lavouras de cana-de-açúcar (MARTINS et al., 2019).

Por ter clima favorável e abrigar boa quantidade do hospedeiro intermediário, o trematódeo *S.mansoni* conseguiu se instalar e multiplicar no país. Eventualmente, tanto *S. japonicum*, quanto *S. haematobium* também foram introduzidos nesta ocasião, porém a ausência de caramujos suscetíveis não permitiu a instalação de focos de transmissão destas duas espécies (SIMOES et al., 2017).

Portanto, *S. mansoni* é a única espécie causadora da esquistossomose descrita no país (NELWAN, 2019). A nomeação desta espécie é creditada à Sambon em 1907, contudo, de forma independente, dados mostram que Pirajá da Silva já fazia observações do trematódeo na mesma época. O brasileiro confirmou que o parasito produzia ovos com esporão lateral, vivia nas veias mesentéricas e era uma espécie distinta das descritas anteriormente (MARTINS et al., 2019).

### 2.1.2 Epidemiologia

Em 2015, em todo o mundo, estima-se que ocorreram 4,4 mil mortes associadas a doença, enquanto estima-se que 779 milhões de pessoas estiveram correndo risco de infecção (GBD, 2017; MORAES et al., 2019). Índices de morbidade observados até esse período também foram preocupantes à medida que apenas a malária dentre as todas as doenças parasitárias estudadas mostrou-se com piores resultados (CHOI; YU, 2015).

Até 2019, cerca de 78 países já notificaram infecções ocasionadas por trematódeos do gênero *Schistosoma*, sendo que nos últimos cinco anos, em 19 deles não foram registrados novos casos, o que por um lado pode indicar o início da interrupção da doença. Por outro lado, em 52 países ainda tem acontecido transmissão de intensidade moderada a alta (GBD, 2017; WHO, 2020) (Figura1).

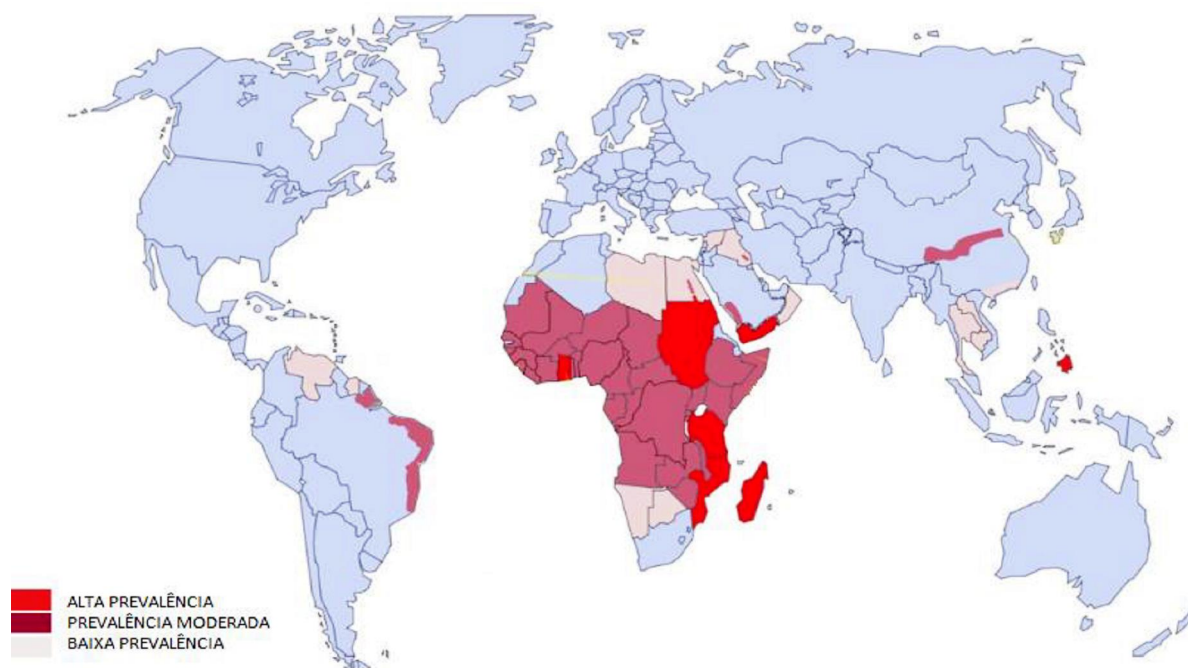


**Figura 1. Distribuição mundial de algumas espécies de *Schistosoma* capazes de infectar humanos.** Fonte: BUTROUS (2019) e modificado pelo autor.

As principais espécies de *Schistosoma* que infectam humanos têm distribuições diferentes. *S. mansoni* é amplamente distribuído por toda a África, Oriente Médio, por alguns países da América do Sul e em algumas ilhas do Caribe. *S. haematobium* é amplamente distribuído por toda a África. *Schistosoma japonicum* está mais localizado na Indonésia, China e partes do sudeste da Ásia. Enquanto *Schistosoma intercalatum* ocorre mais na região central e ocidental da África (IAMAT, 2015; BUTROUS, 2019; WHO, 2020).

Os principais fatores de riscos são as condições socioeconômicas precárias, saneamento básico deficiente, baixo nível de escolaridade e ausência de educação sanitária (MARTINS et al., 2019; MELO et al., 2019). Consequentemente, a faixa etária mais ameaçada é representada por crianças e adolescentes (COLLEY DG; SECOR WE, 2014; CASAVECHIA et al., 2019). Não obstante, existe um outro fator fundamental para a manutenção do ciclo, a complexa variedade de vetores que o trematódeo possui para a manutenção do ciclo nestes lugares (VEIGA-BORGEAUD et al., 1986; MIRANDA et al., 2015).

No Brasil, a esquistossomose se difundiu amplamente em função de movimentos migratórios em direção às áreas com precárias condições de saneamento básico. Começando na região Nordeste, uma extensa área de transmissão foi formada entre os estados do Rio Grande

do Norte e a Bahia. Entretanto, no século XVIII, com o declínio da produção açucareira no Nordeste, início do ciclo do ouro e diamante no Sudeste e ciclo da borracha na Amazônia, houve um fluxo migratório intenso introduzindo a endemia em outras regiões (NOYA, 2015; MARTINS et al., 2019).

A distribuição recente da doença apresenta um cinturão de terras contínuas e contíguas ao longo de quase toda a costa litorânea da região Nordeste, a partir do Rio Grande do Norte em direção ao Sul, incluídas as zonas quentes e úmidas dos estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, onde se interioriza alcançando Minas Gerais, no Sudeste, seguindo o trajeto de relevantes bacias hidrográficas. De forma localizada está presente também em outros estados de Norte à Sul (BRASIL, 2014; MARTINS et al., 2019).

No total, em mais de 19 unidades federais há registros de transmissões do parasito, inclusive em regiões mais afastadas como é o caso do município de Esteio, no Rio Grande do Sul. Em 2015, entre todos os casos notificados no Brasil, 78,7% foram na região nordeste (SILVA et al., 2019).

Desde 1970 quando foi implantado o Programa de Controle para Esquistossomose (PCE) houve uma redução gradativa na prevalência, hospitalização e óbitos pela doença no país. Pesquisas também mostram essa redução no Maranhão. A prevalência de positividade nos exames diagnósticos esteve em 2,5% no ano de 2016, enquanto a taxa de mortalidade anual do estado ficou abaixo de 0,5% (MENDES, 2019; SILVA et al., 2019).

A microrregião da Baixada Maranhense é tradicionalmente reconhecida como zona endêmica de esquistossomose, fato que foi atestado em estudo feito entre 2007 e 2016, porém entre os anos de 1997 e 2003, foram as cidades de Bacabal e Presidente Dutra os locais de maiores incidências da doença (CANTANHEDE et al., 2011; MENDES, 2019; SILVA et al., 2019).

### 2.1.3 Ciclo biológico

A transmissão da esquistossomose não ocorre por contato direto, nem por autoinfecção, sendo necessária a participação de um hospedeiro intermediário e outro definitivo (WEERAKOON et al., 2015). Embora com variações individuais, a suscetibilidade aos parasitos do gênero *Schistosoma* é geral. Isso implica dizer que qualquer pessoa, independente da idade, sexo ou grupo étnico, uma vez em contato com as cercárias, podem contrair a doença (BRASIL 2014).

Apenas uma pequena e limitada quantidade de trematódeos digenéticos - parasitos que têm um ciclo de vida complexo envolvendo dois a quatro hospedeiros - são capazes de causar a esquistossomose humana (CHUAH et al., 2019; MORAES et al., 2019). Cada um deles tem como hospedeiro intermediário uma espécie adequada de caramujo de água doce, no qual a larva se desenvolve antes de infectar o homem (IAMAT, 2015; MACMANUS et al., 2018).

O mais conhecido e estudado no Brasil é o causador da esquistossomose mansônica (EM): *S. mansoni*. Seu hospedeiro intermediário pertence ao gênero *Biomphalaria*, um caramujo com uma concha em forma de disco com cor marrom escuro ou de cor avermelhada. Além dos humanos, a infecção pode ser encontrada em roedores e alguns macacos contribuindo para manter o ciclo de transmissão e tornando sua eliminação mais difícil (CASAVECHIA et al., 2019; MELO et al., 2019; MORAES et al., 2019).

Como pode ser observado na Figura 2, existe um ciclo comum do parasito iniciado com a eliminação dos ovos nas fezes do hospedeiro definitivo infectado. Os ovos eclodem e as larvas neste momento podem ser liberadas nas coleções hídricas, enquanto vários fatores são capazes de influenciar esta etapa. A temperatura de aproximadamente 28° C, luminosidade intensa e bons níveis de oxigenação da água são os maiores exemplos. Os ovos chegam a ser tão sensíveis que não eclodem na água salgada ou na presença de urina (SHEBEL et al., 2012; IAMAT, 2015).

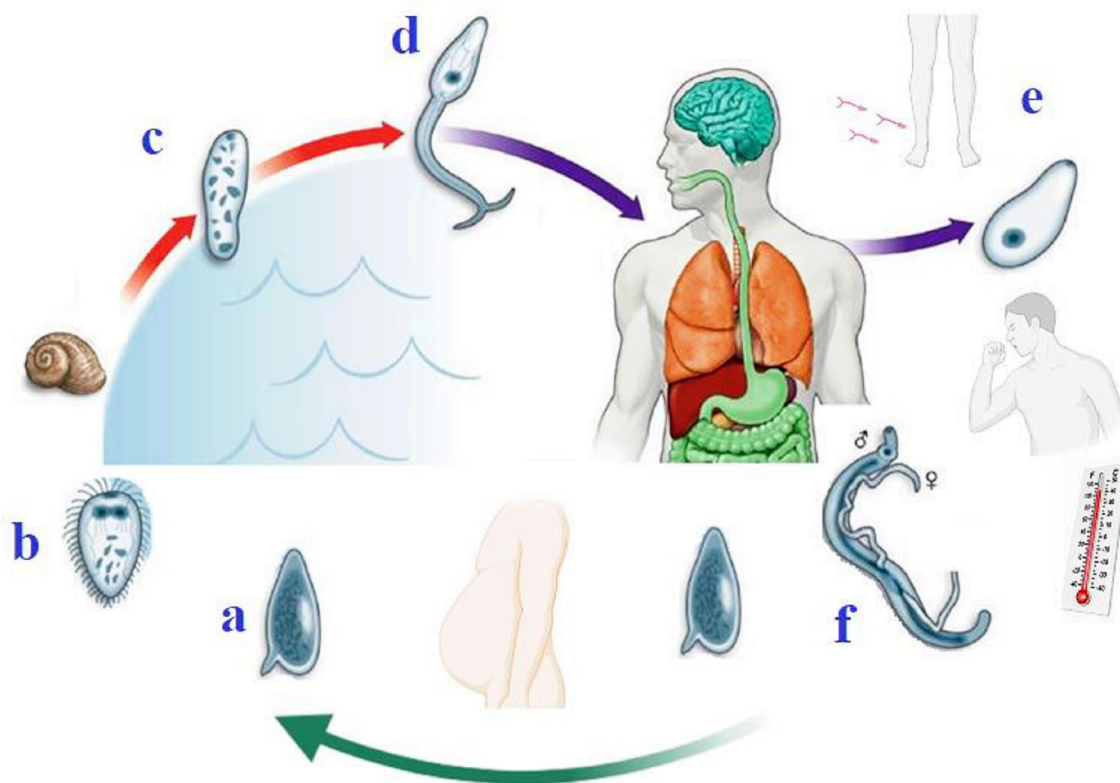


**Figura 2. Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.** Considera-se a = Ovo; b = Micrídeo; c= Esporocisto; d= Cercária; e= Esquistossômulo; f= Adultos. Fonte: CARVALHO (2020).

As larvas são ciliadas e conhecidas como miracídeos. Elas apresentam uma forma cilíndrica, com dimensões médias de 180µm de comprimento por 64µm de largura. Enquanto suas células germinativas, que darão sequência ao ciclo no caramujo, encontram-se na parte posterior do seu corpo (IAMAT, 2015; SIMOES et al., 2017).

Os miracídeos nadam a procura do hospedeiro intermediário podendo penetrar no respectivo caramujo ou acidentalmente em outros moluscos e até em girinos. Por outro lado, somente aqueles que encontram os verdadeiros vetores se desenvolverão. Durante este processo há formação dos esporocistos primários após a perda dos cílios, e por poliembrionia há formação dos esporocistos filhos ou esporocistos secundários, os quais migram principalmente para as glândulas digestivas do caramujo (MACMANUS et al., 2018; NELWAN, 2019).

Os esporocistos secundários sofrem ciclos de reprodução assexuada e após migrarem para a glândula digestiva do animal, dão origem a outras formas larvárias denominadas cercárias. Em apenas 6 semanas, um único miracídeo pode produzir milhares de cercárias, e esta produção pode continuar no mesmo caramujo por meses (IAMAT, 2015; NELWAN, 2019).

As cercárias ganham acesso ao meio hídrico através da formação e ruptura de vesículas no tegumento do hospedeiro intermediário, quando iniciam a busca pelo hospedeiro definitivo. Além do calor e luminosidade necessária, as novas larvas têm poucos dias de sobrevivência após sua liberação do caramujo. Ademais, todas as cercárias provenientes do mesmo hospedeiro intermediário, tendem a ser do mesmo sexo, pois um caramujo geralmente é infectado por apenas um miracídio (SOUSA et al., 2011; VERONESI; FOCACCIA, 2015).

Ao encontrarem um hospedeiro vertebrado, as cercárias firmam-se entre os folículos pilosos utilizando suas duas ventosas. A penetração se dá por meio de movimentos ativos e à ação das secreções histolíticas das glândulas de penetração causando irritação à camada invadida. No homem, a pele apresenta prurido e erupção localizada. Neste momento há perda da cauda e a larva é denominada de esquistossômulo (SOUSA et al., 2011; IAMAT, 2020).

A próxima etapa acontece com adaptações fisiológicas do esquistossômulo ao meio, migrando pelo tecido subcutâneo até o encontro de algum vaso. Em seguida, ao final de 3 semanas, eles são levados passivamente ao coração direito, pulmão e sistema portal (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Existem duas teorias para o transporte do pulmão até o fígado. A mais aceita é por via sanguínea a partir das arteríolas pulmonares até as veias que drenam para o coração esquerdo, aorta e sistema portal. A segunda hipótese defende um transporte transtissular em que as larvas atravessariam os alvéolos pulmonares até a pleura, diafragma e cavidade peritoneal. Contudo, o envolvimento dos dois tipos de migração é perfeitamente possível (HOULDER et al., 2021). Em infecções mais graves, a fase migratória através dos pulmões pode produzir uma pneumonite semelhante àquela observada na Síndrome de Loeffler produzida pelo ciclo de Loss de outros helmintos (KUNST et al., 2011).

Uma vez no sistema porta intra-hepático, os esquistossômulos se alimentam e amadurecem em adultos fêmeas e machos, quando acasalam e são transportados para a veia mesentérica inferior. Após a quarta ou quinta semana acontece a oviposição, daí então o ciclo é reiniciado (SHEBEL et al., 2012; SCHWARTZ; FALLON, 2018).

#### 2.1.4 Resposta imunológica durante o ciclo de *S. mansoni*

A resposta imunológica dos hospedeiros infectados possui várias etapas de acordo com o ciclo de vida do parasito. A fase aguda (os primeiros 3 meses) compreende a penetração das cercárias, migração dos esquistossômulos, vermes adultos e ovos produzidos, que por sua vez pode ser dividida em dois períodos evolutivos: o pré-patente ou pré-postural, que ocorre antes

da ovoposição, e pós-patente ou postural, que ocorre após a oviposição (HOULDER et al., 2021). Em seguida, a fase crônica se dá com a formação e maturação dos granulomas, apresentando quadros vasculares e pseudoneoplásicos de forma geral (SOUSA et al., 2011).

Todos esses períodos expressam centenas, senão milhares, de porções antigênicas, muitas das quais estimulam impactantes respostas humorais e celulares. Algumas dessas respostas continuam a aumentar durante a infecção crônica, e outras são fortemente reguladas negativamente (COLLEY; SECOR, 2014).

Após a penetração das cercárias no hospedeiro definitivo inicia-se a fase pré-postural, com importante concentração local de neutrófilos, macrófagos, células de Langerhans, além de degranulação de mastócitos, promovendo o prurido cutâneo da “dermatite cercariana” (SOUZA et al., 2011; MACMANUS et al., 2018). Neste momento, os esquistossômulos estão suscetíveis à imunidade celular e humoral, especialmente à mediada pelo complemento e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (GOBERT et al., 2007). Portanto, as larvas secretam uma proteína conhecida como Sm16 e induzem a produção de IL-10 por queratinócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (ANGELES et al., 2020).

A Sm16 demonstrou modular a imunidade inata ao prevenir a ativação clássica de macrófagos, enquanto a IL-10 constitui uma citocina anti-inflamatória que regula negativamente a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , inibindo assim a migração de células de Langerhans para o local de invasão (ANGELES et al., 2020; SHIELS et al., 2020). Esses mecanismos são fundamentais para sua sobrevivência por modularem a imunidade inata do hospedeiro, porém ainda assim, a resposta com perfil Th1 tem predominância no ciclo até a produção dos ovos (ZHENG et al., 2020).

Entre 30 a 60 dias, principalmente entre moradores de regiões não endêmicas, a doença pode evoluir com quadro febril debilitante (febre de Katayama), astenia, perda de peso, dor abdominal, diarreia e tosse, além de complicações como pleurite e pericardite. Sintomas estes que são decorrentes do aumento de mediadores inflamatórios como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, associada a deposição de complexos imunes. Em contrapartida, a melhora da sintomatologia acontece após a produção de IL-10 induzida pelos antígenos de ovos na fase postural (MACHADO et al., 2004; NIEMANN et al., 2010; MACMANUS et al., 2018).

A resposta Th1 tem um pico entre a 3ª e 5ª semana, com grande produção de citocinas pró-inflamatórias já citadas, além de IL-2, IL-12 e interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), que ativam células imunes inatas, especialmente os macrófagos (PEARCE et al., 2004; HELMY et al., 2005). Por

volta da sexta semana, à medida que os parasitos amadurecem, acasalam e começam a produzir ovos, a resposta altera-se acentuadamente com mudança do perfil inicial e surgimento de uma forte resposta Th2 (PEARCE; MACDONALD, 2002; ZHENG et al., 2020). Esta mudança é induzida principalmente por antígenos dos ovos e a resposta imune específica com a produção de anticorpos e citocinas é cada vez mais fundamental (PEARCE; MACDONALD, 2002; ZHENG et al., 2020). Além disso, estudos mostraram que a resistência à reinfecção está associada às células Th2, a partir da eosinofilia e produção de imunoglobulina E contra esquistossomos e citocinas como IL-4 e IL-5, enquanto imunoglobulina G específica (IgG4) foi associada à suscetibilidade à nova infecção (COLLEY; SECOR, 2014; MACMANUS et al., 2018).

Os linfócitos T auxiliares do tipo 2 são produtores de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 que, entre outras funções, induzem a produção de IgE pelas células B e ativação de eosinófilos, mastócitos e basófilos, componentes fundamentais na resposta aos helmintos, além da polarização de macrófagos em direção ao fenótipo M2 (FAIRFAX et al., 2012; SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Anticorpos da classe IgE ligam-se aos basófilos circulantes ou mastócitos teciduais, estimulando a liberação de histamina e outros mediadores da reação de hipersensibilidade imediata, desencadeando respostas que levam à destruição de helmintos. Teoricamente, os eosinófilos têm também a capacidade de destruir os esquistossômulos por meio do mecanismo de citotoxicidade celular dependente do anticorpo (MACHADO et al., 2004). Componentes granulares enzimáticos como a proteína básica principal (MBP) e a peroxidase eosinofílica (EPO) são secretados após a ligação entre imunocomplexo e o eosinófilo (DIAS et al., 2018).

Os ovos presos nos tecidos formam um foco inflamatório granulomatoso clássico do perfil tipo 2, caracterizado por ser rico em eosinófilos e linfócitos Th2, associado à infiltração adicional de macrófagos ativados de forma alternativa (M2) (ZHENG et al., 2020). Conforme o granuloma vai amadurecendo, as células dendríticas, macrófagos, células epitelióides e fibroblastos começam a aparecer na periferia, levando degeneração gradual dos ovos e aparecimento de fibras de colágeno (HAMS et al., 2013; BUTROUS, 2019). O granuloma torna-se oval e marcado também por fibroblastos, fator de desenvolvimento de fibrose (HAMS et al., 2013).

Durante toda a fase aguda, ainda existe uma importante interação entre os perfis Th1 e Th2. Pois o interferon gama e a IL-12 atuam como reguladores da resposta granular mediada

pela IL-4 e IL-13 (BOROS & WHITFIELD, 1999; ANGELES et al., 2020). A resposta Th2 tem pico por volta da oitava semana, daí então é modulada negativamente com diminuição do granuloma e progressão da infecção para a fase crônica (> 3 meses) (PEARCE et al., 2014; PEARCE; SCHWARTZ; FALLON, 2018) (Figura 3).

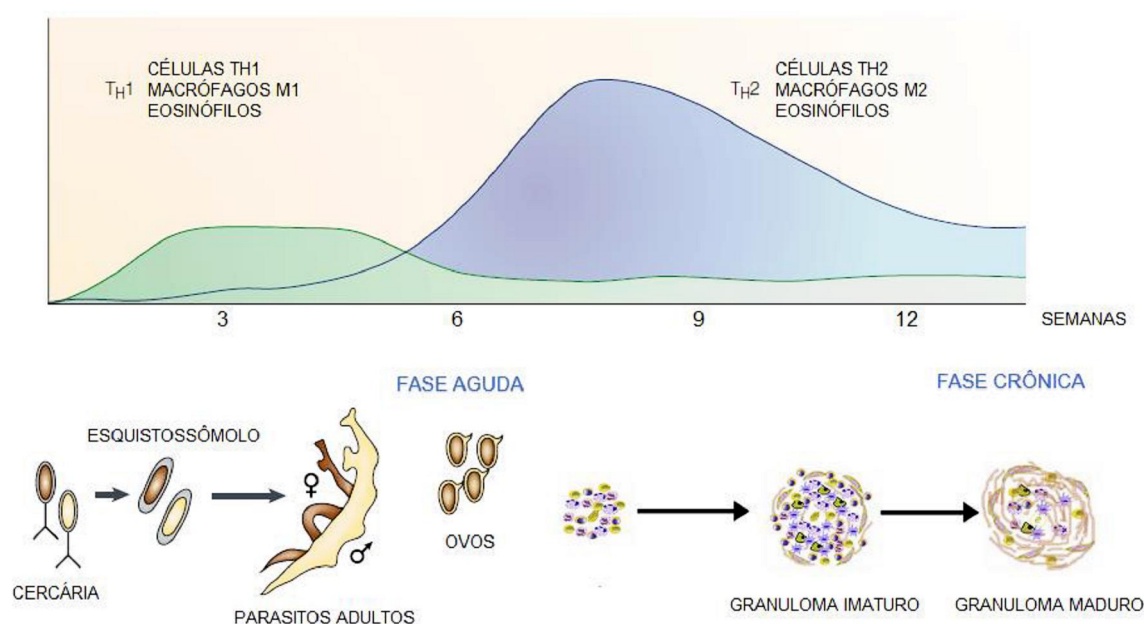


**Figura 3. Resposta imune durante infecção por *Schistosoma*.** Após a penetração das cercarias, transformação em equistossômos e maturação até a oviposição, acontece a mudança de predominância entre as respostas. Os antígenos dos ovos na casca estimulam Th2, que por sua vez serão fundamentais na formação do granuloma. Fonte: PEARCE; MACDONALD (2002) e modificado pelo autor.

A resposta Th17 também foi relatada após infecções por várias espécies de *Schistosoma*, com um pico entre a 8ª e 12ª semana. Uma combinação de TGF- $\beta$  mais IL-6 parece ser essencial para a diferenciação inicial, IL-21 para a amplificação e IL-23 para a subsequente estabilização (BUTROUS, 2019). Além disso, a citocina IL-17 também pode estar associada a uma maior inflamação hepática e regulação dos granulomas (WEN et al., 2011; ZHENG et al., 2020).

Ademais, entende-se que na ausência de células Th1, linfócitos Th17 conduzem a resposta, estimulando o aumento de neutrófilos na inflamação granulomatosa (RUTITZKY et al., 2005; RUTITZKY; STADECKER, 2011; ZHENG et al., 2020). Contudo, não havendo tanto células Th1 quanto Th17, tem-se a formação de granulomas menores, com aumento da produção de células do tipo Th2 (ANGELES et al., 2020; ZHENG et al., 2020).

Entrementes, células T reguladoras Foxp3+ desempenham um papel fundamental na supressão das respostas imunes durante a infecção, tanto controlando a imunopatologia do

patógeno quanto inibindo a imunidade protetora. Na fase patente, essas células quando ativadas suprimem a resposta Th2 induzida pelo ovo, porém pouco se sabe sobre sua indução e papel durante o estágio pré-patente (REDPATH et al., 2015).

Diante das mais diversas observações, verifica-se que o sistema imunológico humano é incapaz de resistir à infecção primária, e o desenvolvimento da resistência à superinfecção pode levar anos. Uma resposta Th2 controlada parece ser a chave para um bom resultado e, embora esse tipo de resposta seja um fator de risco para o desenvolvimento de fibrose, também pode estar ligado ao desenvolvimento de resistência a novas infecções (FAIRFAX et al., 2012). Por outro lado, qualquer desvio extremo na polarização Th1/Th2 pode resultar numa exacerbação ou morte prematura pela doença (ZHENG et al., 2020).

## 2.2 Eosinófilos

Em 1987, Paul Ehrlich nomeou de eosinófilos as células sanguíneas de vertebrados que eram desenvolvidas na medula óssea a partir de precursores mielóides e que eram capazes de se corar de vermelho-alaranjado por eosina, um corante acidófilo (WEISSLER, 2017; SIMON et al., 2020). Trata-se de glóbulos brancos da linhagem granulocítica que se diferenciam sob influência da IL-5, IL-3 e do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (WELLER et al., 2020). Assim, possuem grânulos citoplasmáticos e raramente apresentam mais do que três lobos nucleares (HOFFBRAND; MOSS, 2013) (Figura 4).

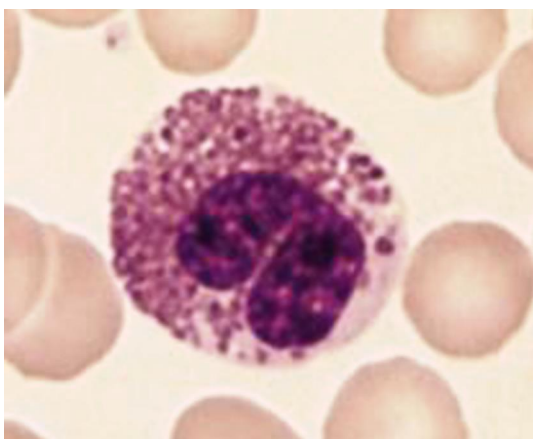


**Figura 4. Eosinófilo corado com eosina.** Fonte: HOFFBRAND; MOSS (2013).

Os eosinófilos possuem importante atuação contra vários patógenos, incluindo helmintos, além do envolvimento na patogênese de diversas doenças, especialmente as que possuem características alérgicas, capazes de comprometer principalmente os tecidos cutâneo,

vascular, cardíaco e pulmonar (WEISSLER, 2017; BMJ, 2020; SIMON et al., 2020). Apesar de apresentar grande atuação na imunidade inata e adaptativa do organismo, o eosinófilo também está presente na reparação e modelação tecidual, estabelecendo um equilíbrio entre dano e proteção, pois são fontes de IL-13 e TGF- $\beta$ , importantes mediadores pró-fibróticos que são capazes de estimular a produção de colágeno (MUNITZ & LEVI-SCHAFFER, 2004; JOHNSTON et al., 2020).

Em contraste com outros tipos celulares do sistema imunológico que requerem um longo e complicado processo de sinais para produzir citocinas e outras proteínas, os eosinófilos podem liberar imediatamente seus conteúdos pré-formados por degranulação após o acionamento de receptores de superfície (WEISSLER, 2017). Na esquistossomose por exemplo, durante o estímulo a população Th2, há intensa produção de IL-4 e IL-5. A IL-4 promove aumento de IgE, que se liga à superfície do helminto, enquanto a IL-5 ativa os eosinófilos, que se ligam ao imunocomplexo e secretam grânulos com componentes enzimáticos (Figura 5). A Proteína básica principal (MBP), a proteína catiônica eosinofílica (ECP), a neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) e a peroxidase eosinofílica (EPO) são os principais componentes granulares conhecidos (MENDES et al., 2000; WELLER et al., 2020).

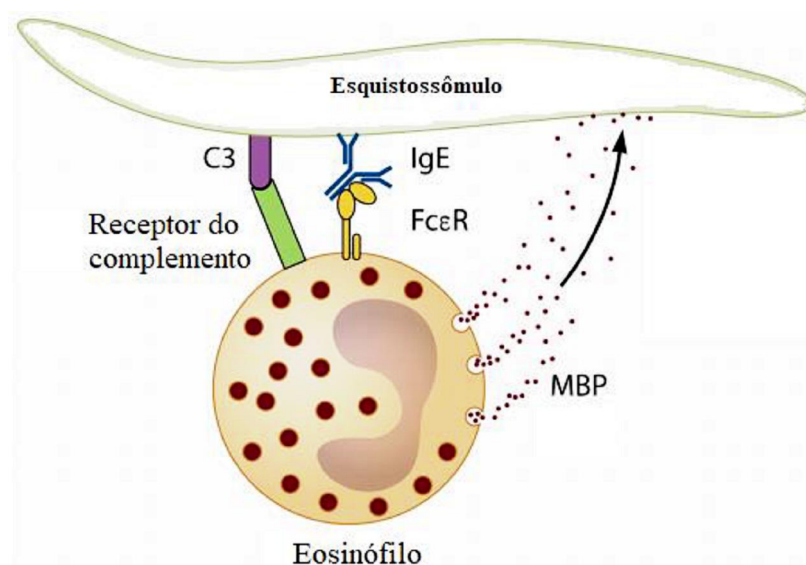


**Figura 5. Mecanismo de ação do eosinófilo frente ao esquistossômulo.** Sendo C3, um dos componentes do sistema complemento, MBP, a proteína básica principal e FcεR, o receptor de alta afinidade para IgE. Fonte: ARIYARATNE; FINNEY (2019) e modificado pelo autor.

*In vitro*, a ECP promove a fragmentação e a ruptura de formas jovens de *S. mansoni*. Estudos também demonstraram que quando associada ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a EPO

destrói o esquistossômulo. Enquanto a MBP mostrou-se tóxica a larvas de helmintos, e provavelmente causa danos aos ovos do parasito em seres humanos (LINS et al., 2008).

Uma outra característica bem pertinente é a expressão de numerosos receptores de superfícies que promovem crescimento, adesão, quimiotaxia, desgranulação e, interação célula-célula como no caso das lectinas semelhantes à imunoglobulina de ligação ao ácido siálico (SIGLECs), representadas principalmente por SIGLEC-8 no sangue humano e SIGLEC-5 (CD 170) em camundongos (RAVIN; LOY, 2016; AMARAL, 2018). Estudos revelaram importante envolvimento de SIGLECs na apoptose celular, portanto pesquisas voltadas para esses receptores podem abrir caminho para novas formas de seguimento e tratamento contra doenças que causam reações alérgicas, ou nas infecções por helmintos (BOCHNER, 2009).

A quantidade de eosinófilos representa cerca de 1 a 3% de todos os tipos de leucócitos contidos do sangue periférico de humanos e possui variação numérica ao longo do dia, tendo uma vida média de 6 dias nos tecidos e apenas de 1 dia na circulação (MENDES et al., 2000). O aumento na contagem desta célula no sangue periférico é definido como eosinofilia, ou seja, quando a contagem ultrapassa cerca de  $0.6 \times 10^9/L$ . Este limiar pode mudar entre os sexos e variações étnicas (BMJ, 2020).

A eosinofilia nos tecidos ou no sangue periférico resulta de dois mecanismos distintos. O primeiro é chamado de expansão policlonal e acontece por um estímulo da resposta Th2 e superprodução de IL-5 como é observado na resposta contra helmintos, enquanto a expansão clonal, acontece quando apenas um tipo celular é preferido, surgindo no contexto de doenças neoplásicas (WELLER et al., 2020). Nos países em desenvolvimento a causa mais comum do aumento dessas células é a parasitária, enquanto as causas alérgicas predominam nos países mais desenvolvidos (BMJ, 2020).

### **2.3 Granulomas na Esquistossomose**

A infecção assintomática pode estar presente em até 90% dos indivíduos, o que demonstra uma adaptação bem sucedida do parasito ao ser humano. Grande parte deste feito está ligado à resposta granulomatosa e a um estado de hiporresponsividade imunológica. Assim, em última análise, o granuloma termina sendo benéfico tanto para o hospedeiro, quanto para o *Schistosoma* (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Está bem estabelecido que grande parte da etiopatologia da esquistossomose se deve principalmente aos resultados dessa resposta inflamatória pois muitos dos ovos ficam presos no tecido do hospedeiro e formam um granuloma com níveis variáveis de fibrose (HAMS et al.,

2013). Este pequeno foco no tecido é desenvolvido por uma gama de mecanismos e tipos celulares (KUMAR et al., 2018).

É importante destacar que o ovo é um organismo biologicamente ativo capaz de manipular a imunidade do hospedeiro a fim de alcançar com sucesso a sua excreção. Sua casca contém importantes glicoproteínas como a Alfa-1 que induz a liberação de IL-4 a partir de basófilos e lhe dá uma capacidade de infiltração através de membranas celulares, como também, a ômega-1 que possivelmente está associada a produção de IL-13 e é capaz de estimular ainda mais a expansão de células Th2 (SCHWARTZ; FALLON, 2018). Outros antígenos da casca, provavelmente, também estimulam essa resposta, quando há uma indução do recrutamento e ativação de eosinófilos, macrófagos alternativamente ativados (M2), linfócitos T CD4+ e miofibroblastos ao seu redor, que evoluem progressivamente para geração de fibrose, principalmente no intestino e no sistema porta-hepático (CARVALHO et al., 2008; CORLISS et al., 2016).

Granulomas intestinais são ricos em macrófagos M2 e por isso imagina-se que este tipo celular também pode ajudar no transporte mais eficiente do ovo ao lúmen intestinal (SCHWARTZ; FALLON, 2018). Estudos ainda sugerem que células linfóides inatas (ILCs), principalmente a ILC-2, também exerça um papel fundamental na formação da fibrose e excreção dos ovos a partir da sua influência na polarização para a resposta Th2 (HEPWORTH, 2017; SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Em relação ao dano vascular, Enolase (fosfopiruvato hidratase) e Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) dos ovos foram identificadas como receptores de superfície para ligação do plasminogênio. Agindo como estimulador da atividade fibrinolítica. Em contrapartida, foi observado que ovos podem se ligar a plaquetas estimulando a ativação plaquetária, como também a outras proteínas plasmáticas do hospedeiro, incluindo o fator de von-Willebrand, facilitando a adesão ao endotélio (SCHWARTZ; FALLON, 2018).

Durante o acometimento nos mais diversos órgãos, estas respostas ocasionarão formas intestinais e hepato-intestinais, distúrbios vasculares, formas pseudoneoplásicas, nefropatia esquistossomótica e as lesões ectópicas da doença. O principal mecanismo na maioria delas parece ser semelhante, a fibrose. Exceção feita à nefropatia esquistossomótica, pois são os imunocomplexos depositados nos glomérulos que darão origem aos distúrbios (SOUZA et al., 2011).

Os indivíduos que evoluem das formas agudas para as formas crônicas da esquistossomose apresentam, em geral, uma modulação em que o foco exsudativo-necrótico do estágio inicial transforma-se em um granuloma produtivo, com menor número de células inflamatórias, sem necrose em torno dos ovos e mais fibrose. Indivíduos que modulam mal a ponto de manter o granuloma grande, são justamente aqueles que evoluirão para a forma hepatoesplênica da doença (BRASIL, 2014). Estágio que possui diversas complicações capazes de levar o paciente ao óbito (SOUZA et al., 2011).

Por conseguinte, os granulomas podem ser classificados histologicamente em 4 estágios evolutivos bem distintos. O primeiro é o estágio exsudativo pré-granulomatoso (PE), caracterizado por ser um infiltrado de células inflamatórias em processo de organização ao redor do ovo do parasita; O segundo, necrótico-exsudativo (NE), é identificado por um halo central de necrose e numerosas células de processos inflamatórios irregularmente nas camadas subsequentes; o terceiro, exsudativo-produtivo (EP), caracterizado por uma rica estrutura de fibras de colágeno e células inflamatórias concentradas na periferia, tem um aspecto mais organizado e circunferencial; e o último estágio é o produtivo (P), com espessura típica de fibras de colágeno e poucas células inflamatórias (FATURETO et al., 2003; AMARAL et al., 2017).

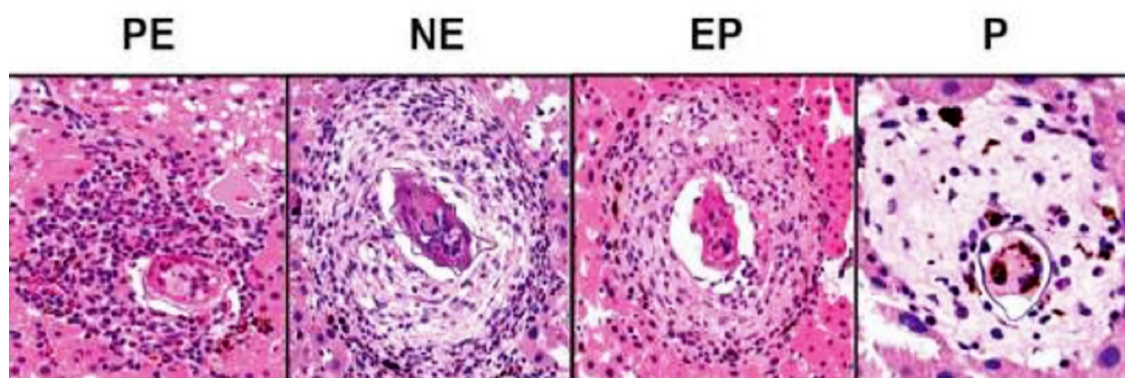


**Figura 6. Lâminas com granulomas hepáticos de acordo com a classificação abordada.** PE (estágio pré-granulomatoso); NE (estágio necrótico-exsudativo); EP (estágio exsudativo-produtivo); P (estágio produtivo). Fonte: AMARAL et al. (2017).

### 2.3.1 Granulomas pulmonares

A resposta granulomatosa aos ovos é capaz de trazer complicações ao órgão como: fibrose pulmonar, hipertensão pulmonar e, eventualmente, cor pulmonale. E como precisa de um longo período para se estabelecer, trata-se de uma reação de hipersensibilidade tardia (CARVALHO et al., 2008; NIEMANN et al., 2010).

Estas reações levam mais de 12 horas para se desenvolver e são mediadas por linfócitos T. Morfologicamente, representa uma grande tentativa do corpo de isolar um local de infecção persistente (ROITT et al., 2018). Evidências apontam a produção de grandes quantidades de IL-4 e pouca de IFN- $\gamma$ . Este último seria produzido por linfócitos T (CD 8+) e não por células NK, sendo a regulação feita por IL-10 e TGF- $\beta$  (CARVALHO et al., 2008).

Macrófagos, eosinófilos e neutrófilos formam camadas concêntricas ao redor do ovo e então, ocorre mais recrutamento celular e aumento do tamanho do granuloma. Entretanto, uma vez que o estímulo antigênico (proveniente dos ovos) é destruído, acontece uma deposição de fibrilas de cromatina e colágenos com subsequente degradação e remodelação que contribui para a fibrose tecidual final (BUTROUS, 2019). Para tanto, citocinas inflamatórias são substituídas gradualmente por citocinas que estimulam o crescimento e regulação para a maturação do granuloma, porém, tais alterações histológicas não ocorrem somente no órgão, mas também dentro de vasos sanguíneos (HOULDER et al., 2021) (Figura 7).

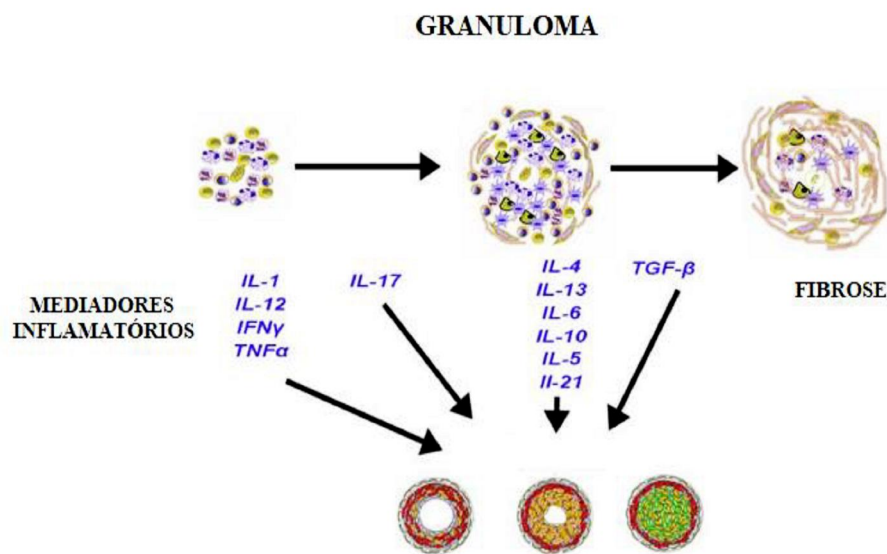


**Figura 7. Fisiopatologia do granuloma pulmonar.** A resposta inflamatória em torno dos ovos é capaz de causar dano ao tecido vascular através dos mais diversos estímulos. Fonte: BUTROUS (2019) e modificado pelo autor.

Os ovos que ficam presos aos vasos produzem grande disfunção das células endoteliais e até remodelamento local (BUTROUS, 2019). As principais alterações vasculares incluem: ateromas nas artérias elásticas principais similares aos observados na aterosclerose sistêmica, proliferação das células da íntima muscular e células musculares lisas nas artérias musculares médias, levando a espessamento da íntima e média com estreitamento da luz, e hipertrofia da

média com reduplicação das membranas elásticas internas e externas das artérias menores e arteríolas. A espessura da parede dos vasos pode exceder o diâmetro da luz a ponto de quase obliterar. Proliferações endoteliais também podem formar múltiplos lumens no interior das pequenas artérias no ponto em que se ramificam nas artérias médias, as chamadas lesões plexiformes (KUMAR et al. 2018; MAUAD et al., 2014; KNAFL et al., 2020) (Figura 8).

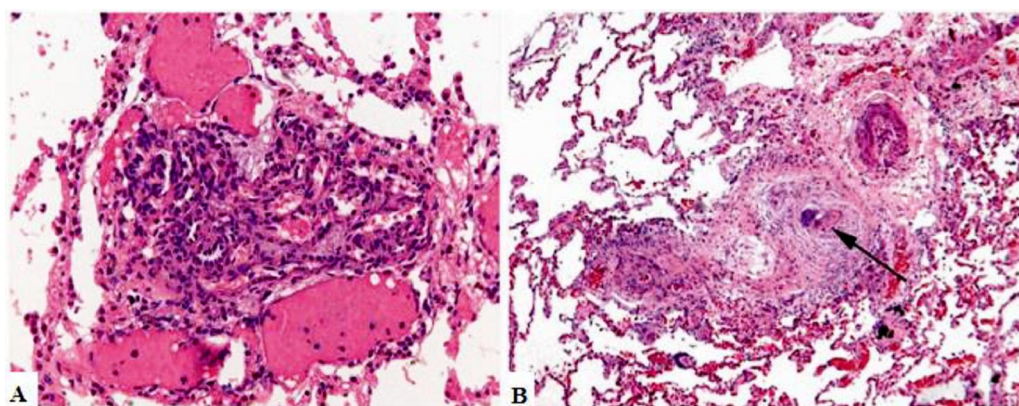


**Figura 8. Corte histológico pulmonar demonstrando em A uma lesão plexiforme e em B um granuloma com ovo do parasito no seu interior (seta).** Fonte: MAUAD et al. (2014).

O tamanho, proporção e tipos celulares irão variar, assim como fatores celulares e químicos que controlam a formação do granuloma mostram diferenças entre as espécies distintas de *Schistosoma*. Também variam de acordo com a cepa, espécie, idade, sexo, duração ou intensidade da infecção, predisposição genética, co-infecção, reinfecção, alterações cronológicas do ovo em maturação e outros fatores ambientais (BUTROUS, 2019). A partir da 2ª ovioposição, os granulomas tendem a ser menores (FATURETO et al., 2003; BUTROUS, 2019).

## 2.4 Esquistossomose pulmonar aguda

No entendimento clássico da esquistossomose, os sintomas iniciais da doença eram representados por diarreia, febrícula, cefaleia, sudorese, astenia, anorexia, emagrecimento e mialgia durante semanas. Portanto, quando se falava em acometimento pulmonar, imaginava-se estágios avançados e associados a formas clínicas hepáticas complicadas (SCHWARTZ, 2002; COSTA et al., 2012). Entretanto, ao se estudar o ciclo do parasito, verifica-se a migração do equistossômulo no órgão desde o quarto dia, com pico entre o décimo e o décimo segundo dia, diminuindo continuamente até aproximadamente o vigésimo dia após a infecção (HOULDER et al., 2021).

Este é o momento mais difícil para a sobrevivência do verme e da continuidade do seu ciclo no hospedeiro definitivo (BUTROUS, 2019). Aparentemente, os antígenos de larvas estimulam uma resposta mais eficiente para produção de linfócitos e citocinas Th1 no órgão em comparação a resposta produzida na pele (GOBERT et al., 2007) (Figura 9).

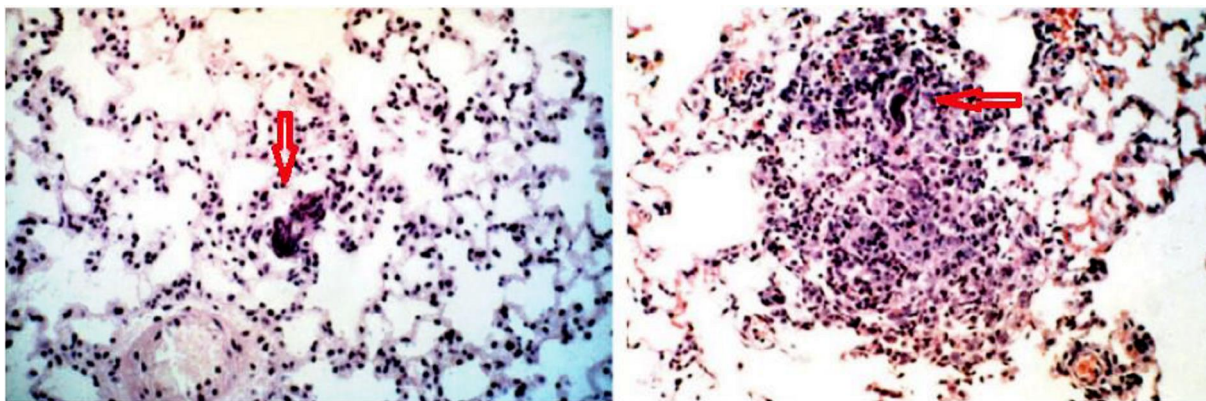


**Figura 9. Esquistossomose aguda em um pulmão de camundongo.** À esquerda há um esquistossomolo cruzando um capilar (seta). À direita, uma forte reação inflamatória é vista em torno de um esquistossomolo (seta). Fonte: LAMBERTUCCI (2010).

#### 2.4.1 Fisiopatologia e quadro clínico

Visto que o paciente pode apresentar sinais e sintomas em diversas etapas da doença, inclusive durante os primeiros dias de infecção (fase aguda), entende-se que os pulmões podem ser acometidos basicamente de duas formas, com 2 momentos distintos (Figura 10). A primeira forma acontece na migração inicial do parasito para o órgão produzindo reação tóxica tênue com áreas ocasionais de consolidação pulmonar. Enquanto a segunda origina-se por embolia de ovos, podendo causar resposta granulomatosa danosa, porém é mais característica de estágios mais avançados da doença (COSTA et al., 2012). Excepcionalmente, em raros casos publicados, ovos foram encontrados em biopsias pulmonares de pacientes ainda nas primeiras semanas de doença (CORON et al., 2016).

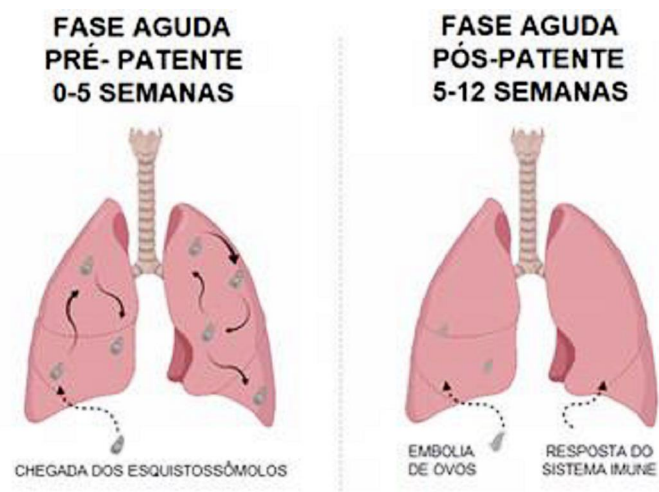


**Figura 10. Fases da esquistossomose pulmonar.** Fonte: HOULDER (2021) e modificado pelo autor.

Na fase aguda, além do quadro clássico já descrito, a febre pode vir acompanhada de tosse e eosinofilia periférica caracterizando ainda mais a febre de Katayama. Esta síndrome foi relatada pela primeira vez no Japão e afetava indivíduos não-imunes que viajavam para áreas endêmicas da doença principalmente durante estações chuvosas (BAHAROON et al., 2011). De forma variável, os sintomas podem aparecer em qualquer intervalo entre duas e doze semanas de infecção, ou seja, na presença ou ausência dos ovos (HOULDER et al., 2021).

Durante o período inicial há produção de citocinas pró-inflamatórias especialmente de perfil Th1. Essas substâncias são as grandes responsáveis pelos sintomas toxêmicos e tem sua pior intensidade próximo a oviposição que acontece por volta da quinta e sexta semana. Daí o hospedeiro produz linfócitos Th2 contra o helminto, estimulando IL-4, IL-5 e IL-10 por ação antigênica aos ovos, aumentando assim a produção de anticorpo, uma vez que a IL-4 induz a troca de classe de imunoglobulinas nos linfócitos B para IgE e a IL-5 induz a produção e ativação de eosinófilos. De forma análoga ao IFN- $\gamma$ , a IL-4 também promove retroalimentação positiva para a via Th2 e suprime a via Th1 (JUNIOR et al., 2010; BRASIL, 2014).

#### 2.4.2 Diagnóstico

Exames radiológicos costumam exibir infiltrados pulmonares difusos e nodulares, ao mesmo tempo que podemos observar o exame laboratorial com leucocitose acompanhada de níveis séricos elevados de IgE (PORDEUS et al., 2008; BAHAROON et al., 2011). Então, é natural que em casos mais graves, onde exista hipóxia, a esquistossomose possa ser confundida com uma pneumonia eosinofílica aguda causada por diversas outras etiologias (ALLEN;

DAVIS, 1994). Porém, como a maioria dos pacientes no início do ciclo apresentam apenas sintomas leves, ou são até mesmo assintomáticos, não é difícil associar a síndrome de Katayama com uma eosinofilia pulmonar de “síndrome de Loeffler”, que é definida a partir do momento que se observa sintomas relacionados à passagem de helmintos parasitos através dos alvéolos.

A eosinofilia laboratorial coexiste com imagens transitórias e migratórias de consolidação que normalmente desaparecem espontaneamente dentro de um mês (BASTOS; BRITO, 2011). Os eosinófilos são conhecidos por produzir um número de substâncias, incluindo prostaglandina E2 e substância P, que pode induzir tosse, explicando assim, o sintoma durante a patologia (HOULDER et al., 2021). Além disso, provas de função hepática (transaminases, fosfatase alcalina e gama glutamil transferase) geralmente estarão aumentadas em até 90 dias (BRASIL, 2014).

Por outro lado, exames de tomografia computadorizada também podem mostrar lesões com os mais diversos tamanhos, chegando a verdadeiras massas pulmonares em alguns casos. Achados que podem estar presentes inclusive em pacientes que não apresentam sintomas respiratórios (GOBBI et al., 2019). Além disso, derrames pleurais podem ocorrer por deposição de imunocomplexos vasculares associados a resposta inflamatória das primeiras semanas de doença (JAUREGUIBERRY et al., 2010) (Figura 11).

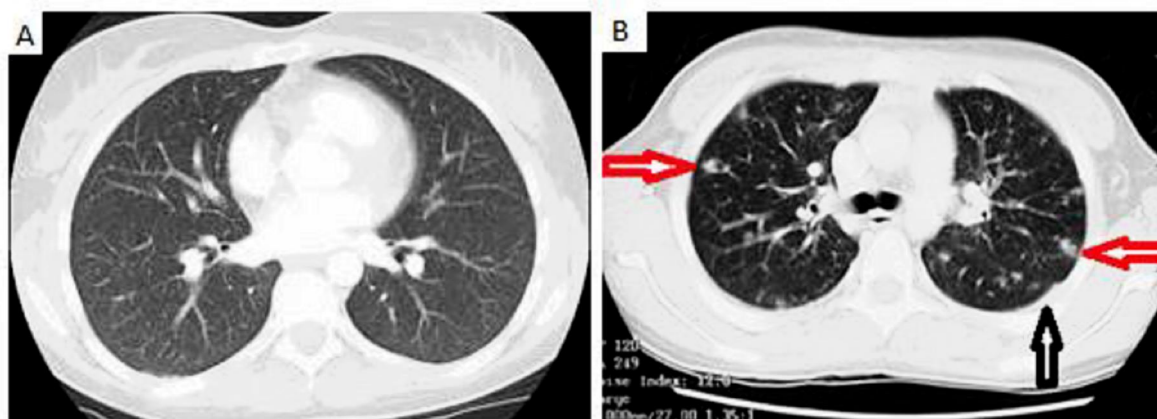


**Figura 11. Tomografia de tórax de paciente com parênquima pulmonar normal em (A) e parênquima pulmonar com esquistossomose aguda em (B).** Seta vermelha mostra infiltrado nodular bilateral enquanto seta preta apresenta derrame pleural laminar. Fonte: BAHAROON et al. (2011) e modificada pelo autor.

Tanto a Organização Mundial de Saúde (OMS) quanto o Ministério da Saúde (MS) adotam como padrão ouro para o diagnóstico de infecção humana por *S. mansoni*, o método laboratorial de Kato-Katz, visto que possibilita classificar a carga parasitária do paciente infectado através do cálculo de ovos por gramas de fezes (BARBOSA et al., 2017). Por outro

lado, como em muitos casos o paciente deve se encontrar na fase pré-postural, uma biopsia pulmonar nas primeiras semanas de doença consegue ser mais eficaz (BAHAROON et al., 2011). Outra forma de diagnóstico recentemente descoberta é o PCR com utilização de marcadores específicos que expõe o DNA de *Schistosoma* pelas fezes ou urina dos indivíduos, porém essa técnica ainda não foi implementada mundialmente (CNOPS et al., 2020).

#### 2.4.3 Tratamento

A doença raramente mata, mas devido a grande morbidade até aqui, requer a detecção e tratamento precoce de todos os portadores para evitar a ação patogênica acumulativa que indivíduos promovem após a ovoposição do trematódeo (BRASIL, 2014). O objetivo do tratamento é a redução da produção de ovos por meio da redução da carga de vermes. Isso reduz a morbidade e mortalidade, mesmo na ausência de erradicação completa do verme (CLERINX; SOENTIENS, 2020). Pacientes com esquistossomose pulmonar aguda podem responder positivamente a um curso de uma ou mais doses orais de praziquantel. Alguns estudos já demonstraram grande eficácia contra os parasitos presentes no pulmão (PORDEUS et al., 2008; BAHAROON et al., 2011; COLLEY; SECOR, 2014). Por outro lado, outros autores relatam que a droga não apresenta resultados tão bons na fase inicial quando comparada ao uso de glicocorticoides, ao oxaminiquine ou ao arthemeter (JAUREGUIBERRY et al., 2020). Portanto, em caso de sintomas graves, a prednisona (1mg/kg) deve ser iniciada um dia antes do esquistossomicida (BRASIL, 2014; MARTINS et al., 2019). Os corticóides ajudam a reduzir as reações alérgicas agudas e são capazes de reduzir danos causados pela reação inflamatória aguda excessiva dos granulomas (MACMANUS et al., 2018).

### 2. 5 Esquistossomose pulmonar crônica

Um dos primeiros relatos da presença de ovos de esquistossomose nos pulmões foi em 1885 em nativos africanos. Depois disso apareceram vários outros relatos no Egito descrevendo manifestações patológicas relacionadas a hipertensão pulmonar em pacientes infectados por *S. mansoni* e *S. haematobium* (BUTROUS, 2019).

A importância e foco dos estudos no órgão se dá à medida que a prevalência de esquistossomose pulmonar crônica em portadores com doença hepatoesplênica foi estimada em acima de 8% (PAPAMATHEAKIS et al., 2014). Inclusive, em alguns casos relatados chegou a ser o órgão com maior número de granulomas de *S. mansoni* identificados, além de já haver outros registros de acometimento pulmonar isolado (CORON et al., 2016).

Dessa forma, há vários anos é conhecido que a evolução da doença inicial consegue culminar com a embolia de ovos do parasito e formação de granulomas, desenvolvendo então as formas vasculares pulmonares ou alterações parenquimatosas como na lesão pseudoneoplásica (SOUSA et al., 2011). Por isso, é necessário desconfiar deste diagnóstico diferencial em áreas endêmicas a partir de uma simples clínica de tosse ou de uma leve dispneia, e até mesmo na ausência de sintomas pulmonares (RODRIGUES et al., 2009; GRAHAM; KUMAR, 2014).

### 2.5.1 Fisiopatologia e quadro clínico

Para chegar nos estágios crônicos da infecção, mais da metade dos ovos depositados nas vênulas são varridos na circulação para múltiplos órgãos além do pulmão, com a maioria terminando no fígado para uma resposta granulomatosa. Esta reação será a grande responsável por grande parte da fisiopatologia esquistossomótica final. (SCHWARTZ; FALLON, 2018; BUTROUS, 2019).

As formas vasculares pulmonares são as mais prevalentes e podem ser divididas em não hipertensiva ou acianótica, e hipertensiva ou cianótica. Com o aparecimento da hipertensão arterial pulmonar (HAP), a dispneia de esforço, palpitações, tosse seca, dor torácica constritiva e síncope de esforço, tornam-se comuns em pacientes parasitados (CARVALHO et al., 2008; BRASIL, 2014).

O principal mecanismo subjacente à patogênese da HAP associada à esquistossomose é a inflamação proveniente dos ovos e granulomas, porém vermes mortos e/ou vasculite pulmonar por imunocomplexos configuram como outras boas hipóteses. Entretanto, a relação entre o remodelamento vascular e os mediadores inflamatórios permanece ainda pouco compreendida (COLLEY; SECOR, 2014; GRAHAM; KUMAR, 2014).

Ainda não está claro também se todos os casos de acometimento vascular, inevitavelmente, evoluem para cor pulmonale. Se o processo é apenas uma questão de tempo. Outras possibilidades para os diferentes tipos e intensidades da doença, poderiam ser a quantidade e a velocidade com que os ovos são embolizados ao órgão, assim como o tipo da espécie de *Schistosoma* (SCHWARTZ, 2002).

Indivíduos com esquistossomose possuem maior chance de desenvolver doenças como a tuberculose devido provavelmente ao enfraquecimento da capacidade dos macrófagos de conter a micobactéria (DINARDO et al., 2016).

### 2.5.2 Diagnóstico

Quanto às lesões parenquimatosas, a patologia é capaz de se apresentar tanto com lesões nodulares, comuns quando associada a tuberculose ou neoplasias, com lesões pseudoneoplásicas, por intensa neoformação conjuntiva a partir de grande quantidade de ovos calcificados e granulomas, quanto em forma de ‘pneumonite intersticial’ (Figura 12). Este último quadro ocorre como um fenômeno de hipersensibilidade eosinofílica ao parasito, tanto na forma toxêmica da infecção, como no decurso do tratamento (CARVALHO et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; YOUSELF; ISHAQ, 2019).

Ao exame físico encontra-se um estado geral comprometido, turgência jugular, hepatomegalia dolorosa, ausculta respiratória com roncos, sibilos, frêmito tóraco-vocal diminuído e áreas de submacicez, além de edema de membros inferiores. Ausculta cardíaca pode revelar ritmo em galope. Parte deste quadro é também atribuído a microfístulas arteriovenosas, sobretudo nas extremidades com baqueteamento digital (SOUSA et al., 2011).

Exames radiológicos podem revelar aumento da área cardíaca e calibre da artéria pulmonar, pedículo hilar denso, desvio do septo interventricular, vascularização periférica do pulmão reduzida ou ausente, presença de veias colaterais pericárdio-frênicas, aumento do calibre do sistema ázigo-hemiázigo, entre outras (Figura 13). O padrão eletrocardiográfico na esquistossomose pulmonar avançada se confunde com o padrão da HAP, ou seja, sinais de hipertrofia de ventrículo direito e desvio do eixo do QRS para a direita (CARVALHO et al., 2008; PORDEUS et al, 2008). O eco-doppler-cardiograma confirma uma sobrecarga direita e mostra a pressão pulmonar acima de 20mmHg (BRASIL, 2014).



**Figura 12. Tomografia de tórax de paciente com lesão pseudotumoral por esquistossomose em lobo inferior esquerdo (seta).** Fonte: RODRIGUES et al. (2009).

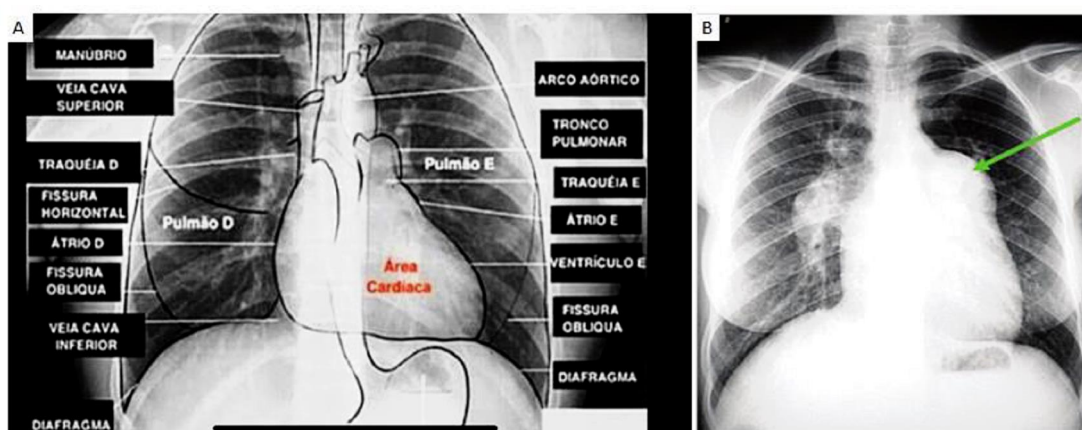


**Figura 13. Radiografia de tórax em PA normal com descrição anatômica radiológica em (A), e em (B) exame de paciente com esquistossomose pulmonar vascular hipertensiva que apresenta aumento do tronco pulmonar como indicado na seta. Fonte: BRASIL (2014) e modificado pelo autor.**

Além da história clínica e dos exames complementares, o diagnóstico nesta fase da doença pode ser realizado por métodos diretos (pesquisa de ovos nas fezes, pesquisa de anticorpo do parasita circulante e biopsias) e indiretos (ensaio imuno enzimático, imunofluorescência e reação peri-ovular). Entretanto e infelizmente, o caráter crônico e insidioso da esquistossomose faz com que muitos pacientes frequentemente não procurem tratamento (BRASIL, 2014; MARTINS et al., 2019).

### 2.5.3 Tratamento

A terapia específica deve ser efetuada o mais previamente possível com o praziquantel via oral na dose de 40mg/kg (NELWAN, 2019; YOUSELF; ISHAQ, 2019). O tratamento oral com a droga é capaz de promover alguma reversão das lesões granulomatosas no tecido alveolar, mas não mostram a mesma eficácia na doença vascular (BUTROUS, 2019; (CLERINX; SOENTIENS, 2020). Embora o tratamento anti-helmíntico não pareça melhorar significativamente a clínica da hipertensão pulmonar por esquistossomose, ele é benéfico e capaz de diminuir a taxa de progressão da doença (GRAHAM; KUMAR, 2014).

A proteção contra este estágio da patologia parece estar associada a deficiência combinada de IL-4 e IL-13 que diminuiria a ação fibrótica induzida por TGF-beta após exposição ao parasito. Por isso, a inibição direcionada dessa via poderá ser uma nova abordagem terapêutica potencial para estes pacientes (GRAHAM; KUMAR, 2013). KUMAR et al., 2015; KNAFL et al., 2020).

Para pseudotumores equistossomóticos, a ressecção cirúrgica também pode ser indicada em alguns casos. Outra importante observação é que boa parte dos portadores de hipertensão

pulmonar também apresentam hipertensão portal e nesses casos, cirurgias baseadas no desvio de sangue do sistema portal estão contraindicadas, pois podem agravar o quadro pulmonar por um aumento de fluxo sanguíneo para a veia cava inferior (RODRIGUES et al., 2009; BRASIL, 2014; PAPAMATHEAKIS et al., 2014).

## **2. 6 Novas classificações da esquistossomose pulmonar podem surgir**

Devido a um fluxo humano migratório sem precedentes da África ao continente europeu no início do século XXI, o interesse e as pesquisas sobre doenças tropicais vêm crescendo em vários países onde os profissionais da saúde muitas vezes não eram suficientemente treinados para essas áreas. Por outro lado, trata-se de países onde costumeiramente não faltam recursos e tecnologias para serem aplicadas para diagnóstico e tratamento das diversas patologias (DIAS; GONÇALVES, 2007; GOBBI et al, 2019).

Nesse contexto, iniciou-se uma nova perspectiva sobre a clínica e apresentação das fases da esquistossomose pulmonar a partir de novos casos com melhor acompanhamento radiológico. Gobbi et al. (2019), após observarem casos com nódulos pulmonares transitórios que desapareceram rapidamente após o tratamento, assim como nódulos pulmonares que desapareceram sem tratamento, sugeriram a necessidade de reclassificação.

Por mais que tivessem características da fase aguda, os casos foram incompatíveis com a classificação tradicional, pois tais achados não eram acompanhados de infiltrados pulmonares nos exames radiológicos e nem possuíam cronologia adequada, já que nos relatos dos pacientes constavam vários meses após a exposição. Portanto, os autores postularam a presença de uma fase "intermediária" de esquistossomose que ocorre nos pulmões e pode ser também definida como uma "fase crônica inicial". Fase em que fêmeas adultas transitam pelos pulmões e podem efetuar a oviposição (Figura 14).

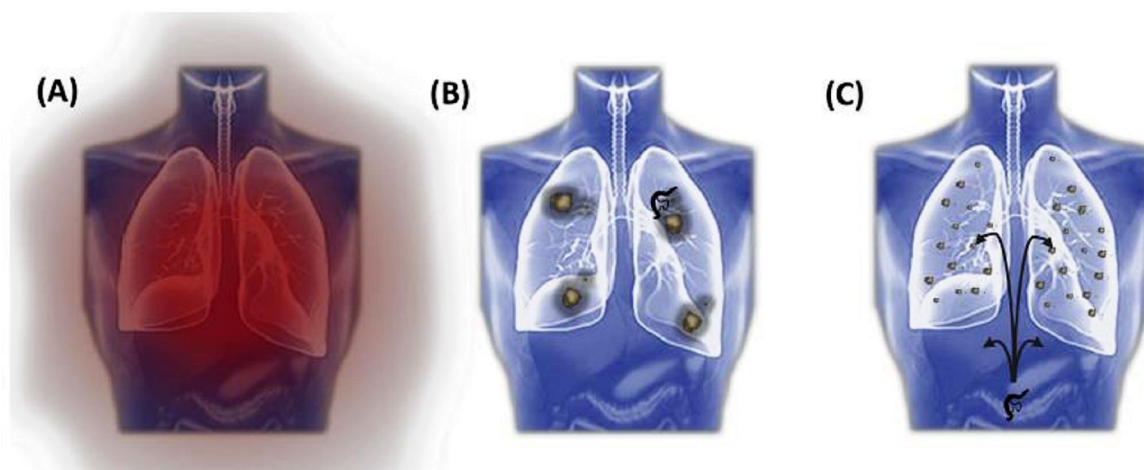


**Figura 14. Novas classificações da esquistossomose pulmonar: (a) Fase aguda ou síndrome de katayama; (b) fase intermediária, crônica inicial ou reversível; (c) Fase crônica ou irreversível.** Fonte: GOBBI et al., 2020.

Um ano depois, Goobi et al. (2020) acrescentaram uma nova perspectiva baseada na grande eficiência do tratamento com praziquantel via oral contra parasitos adultos, em contraste com a diminuta responsividade da medicação para os quadros crônicos, e paralelamente a outros achados tomográficos atípicos da doença. No ensejo, deliberaram que mais sensato seria que Síndrome de Katayama, quando presente, caracterizada por um padrão intersticial difuso, mas sem lesões nodulares na imagem, esquistossomose pulmonar “reversível” e esquistossomose pulmonar “irreversível”, respectivamente, fossem reconhecidos como nova classificação (Figura 14).

Estudos experimentais ainda não trouxeram enfoque para novas fases da doença no pulmão, contudo características intermediárias da esquistossomose no órgão foram identificadas no trabalho de Kolosionek et al. (2013) que avaliava as alterações histológicas vasculares em camundongos infectados por *S. mansoni*. com eutanásia às 12 semanas. Eles observaram parasitos adultos nas lâminas de tecido pulmonar próximo aos granulomas formados (Figura 15). Exatamente como sugere a fase intermediária da reclassificação de GOOBI et al. (2020).

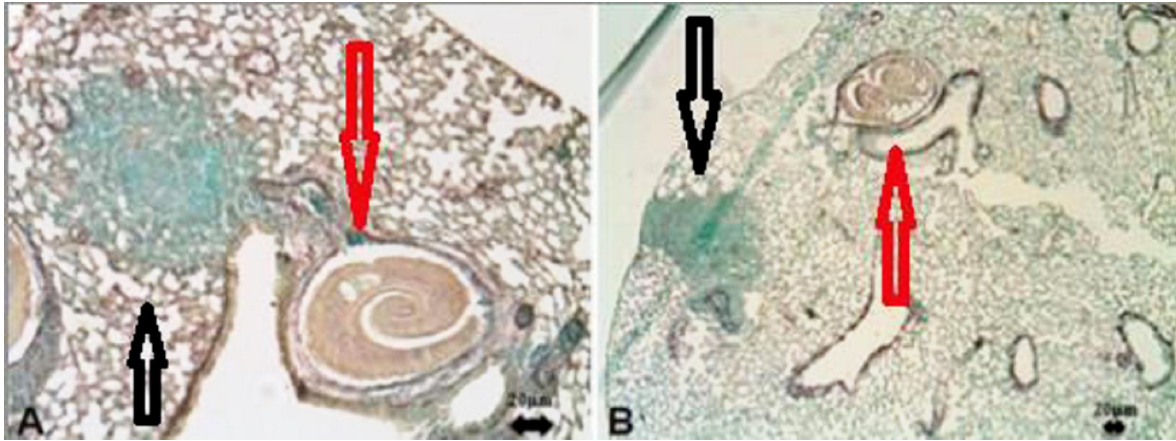


**Figura 15.** Parasitos adultos de *S. mansoni* (seta vermelha) encontrados próximo à granulomas pulmonares (setas pretas) de camundongos com 12 semanas de infecção. Fonte: KOLOSIONEK et al., 2013.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Investigar as alterações histopatológicas e histomorfométricas no pulmão de camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* e as correlações com a eosinofilia sanguínea, presença de ovos e granulomas hepáticos.

#### 3.2. Específicos

- ✓ Descrever as alterações histopatológica e histomorfométrica do pulmão de camundongos infectados por *S. mansoni*;
- ✓ Avaliar a progressão dos granulomas na esquistossomose pulmonar por *S. mansoni*;
- ✓ Avaliar a progressão do leucograma na esquistossomose pulmonar por *S. mansoni*;
- ✓ Investigar a correlação entre eosinofilia sanguínea, carga parasitária e alterações histomorfométricas do pulmão e fígado na esquistossomose por *S. mansoni*;

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção e manutenção dos caramujos *Biomphalaria glabrata*

Os espécimes de *B. glabrata* foram gentilmente cedidos pelo Moluscário do laboratório de Imunologia de Helmintos do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre a Esquistossomose (GIDE), localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Seguindo as normas de transporte de material biológico, os caramujos foram transportados contendo a cepa LE de *S. mansoni*. A cepa foi mantida por sucessivas infecções em hamsters (*Mesocricetus auratus*) e caramujos *B. glabrata*, de acordo com a técnica descrita por Pellegrino e Katz (1968).

Os espécimes foram mantidos no Laboratório de Imunofisiologia (LIF) da Universidade Federal do Maranhão, em aquários de vidro com água desclorada (GERKEN, 1977). Para sua nutrição e fortalecimento da concha, os caramujos tiveram como substrato uma fina camada de argila, acrescidos com carbonato de cálcio e farinha de ostra, e como alimento, folhas de alface, segundo Malek (1985).

### 4.2 Obtenção das cercárias

Os caramujos foram acondicionados individualmente em recipientes de vidro, e expostos por quatro horas à iluminação artificial em água desclorada, para estimular a eliminação de cercárias. As larvas obtidas foram analisadas quanto a sua viabilidade, posteriormente concentradas e contadas, com o auxílio de uma lupa esterioscópica (SMITHERS; TERRY, 1965).

### 4.3 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos com idade entre 3 e 4 meses, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os animais foram mantidos a temperatura média de  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade relativa de 44-56%, sob ciclos normais de claro e escuro de 12 horas, com livre acesso a ração esterilizada e água acidificada. O certificado de aprovação do Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da UFMA, sob o nº 23115.002254/2020-18, consta em anexo (Anexo A). Ressalta-se, que os experimentos foram realizados por pesquisadores treinados, empregando-se material laboratorial apropriado e descartável, respeitando-se os princípios éticos.

#### 4.4 Delineamento Experimental

Os animais (n=12) foram infectados por via percutânea com 50 cercárias viáveis de *S. mansoni*, obtidas de exemplares de *B. glabrata* provenientes da Cepa LE de Belo Horizonte – MG. Após 60 (grupo INF60, n=6) e 90 (grupo INF90, n=6) dias, os animais foram eutanasiados. Em cada dia foram eutanasiados também animais do grupo Limpo (Não infectado).

Para eutanásia, foi utilizado o método de superdosagem anestésica. Os animais foram pesados e anestesiados através de injeção intramuscular (i.m.) na pata esquerda com 100µL de solução: Cloridrato de Xilasina 2% (10mg/Kg) e Cloridrato de Ketamina 10% (90mg/Kg) e PBS com hidromódulo 2:1:1 utilizando seringa e agulha estéril descartável. Após a certificação do plano anestésico, houve a coleta de sangue, remoção dos pulmões e confirmação de infecção (nas fezes e no tecido hepático) nos grupos infectados. A partir daí, cada metade amostral seguiu para estudos histopatológico com avaliação histomorfométrica. O tecido hepático dos animais infectados também foi utilizado para comparação histomorfométrica entre os granulomas dos dois órgãos (Figura 16).

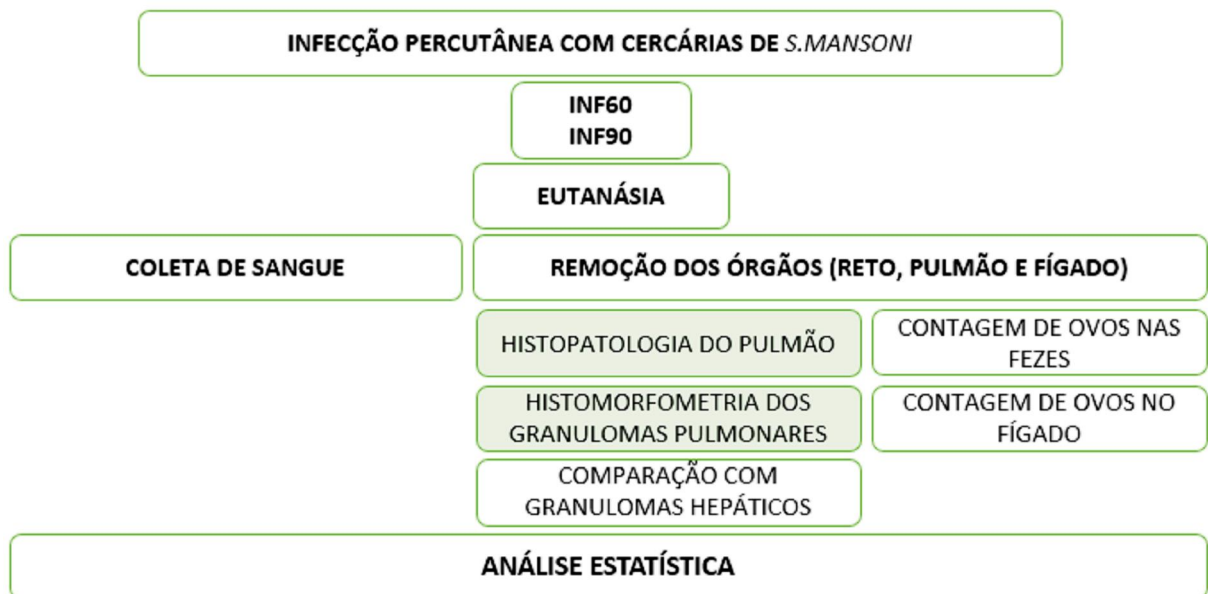


**Figura 16. Organograma experimental dos ensaios realizados após eutanásia dos camundongos.** Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 4.5 Contagem de ovos nas fezes e no fígado

Amostras de fezes foram coletadas do reto dos animais eutanasiados e pesadas. Foram então, diluídas em 2mL de solução salina (0,87% NaCl). Após homogeneização, a amostra foi completada com 10mL de solução formol tamponado a 10%, e posteriormente submetidas a contagem. Para a quantificação de ovos nas fezes, segundo protocolo padronizado por Negrão-Corrêa et al (2004), a solução fecal foi bem homogeneizada, foram preparadas seis lâminas com alíquotas de 100µL de cada amostra e examinadas ao microscópio óptico. Posteriormente, transformamos o valor obtido para ovos por grama de fezes acordo com a fórmula abaixo, onde: 1- Somatório de ovos encontrados em todas as lâminas analisadas; 2- Número de lâminas analisadas; 3- Volume final resultante da solução fecal; 4- Peso do material (fezes).

$$\frac{\left( \begin{array}{l} \boxed{1} \rightarrow \sum \text{Ovos (lâminas)} \\ \boxed{2} \rightarrow \text{Nº de lâminas} \end{array} \right)}{\quad} \times \begin{array}{l} \boxed{3} \\ \text{V (mL)} \times 10 \end{array}$$

$\boxed{4} \rightarrow \text{Peso (Fezes)}$

Para a quantificação de ovos no fígado, os lobos direitos foram separados no ato da eutanásia, pesados e digeridos individualmente em solução de hidróxido de potássio (KOH) 5% a 37°C por 4 h, ou até que não mais se observasse a presença de fragmentos de tecido. O material resultante da digestão tecidual foi transferido para tubos de 15mL e centrifugados por 1 min/ 200 g. O sobrenadante foi desprezado, cuidadosamente, e foram adicionados mais 14mL de solução salina (0,87% NaCl). O procedimento de lavagem foi repetido cinco vezes e o material ressuspenso em 10mL de solução salina e armazenado a 4°C até a contagem dos ovos. Para a contagem, seis lâminas com alíquotas de 100µL de cada amostra foram examinadas ao microscópio óptico. Os ovos foram quantificados de acordo com a fórmula abaixo, e posteriormente apresentados como total de ovos/órgão/animal. Sendo: 1- Somatório de ovos encontrados em todas as lâminas analisadas; 2- Número de lâminas analisadas; 3- Volume final resultante da digestão; 4- Peso do material digerido.

$$\frac{\left( \begin{array}{l} \boxed{1} \rightarrow \sum \text{Ovos (lâminas)} \\ \boxed{2} \rightarrow \text{Nº de lâminas} \end{array} \right)}{\quad} \times \begin{array}{l} \boxed{3} \\ \text{V (mL)} \times 10 \end{array}$$

$\boxed{4} \rightarrow \text{Peso (Órgão)}$

#### 4.6 Avaliação de leucograma

Após a anestesia dos animais (descrito no tópico 4.4), o sangue foi obtido do plexo orbital, coletado em tubo cônico de 2mL, e utilizado para fazer o esfregaço sanguíneo, imediatamente, 10µL de sangue. Em seguida, 20µL foram diluídos em 380 µL do Líquido de Turck (100mL de solução de ácido acético 2%, 1mL de solução de violeta genciana) para contagem dos leucócitos totais (ARAÚJO-JORGE; CASTRO, 2000).

Para contagem global de leucócitos foi utilizada câmara Neubauer, com auxílio de microscópio óptico de luz comum (Olympus CX40), sob aumento de 40X. Ao total de células contadas (N), foi aplicada a fórmula: Leucócitos/mm<sup>3</sup> = N x 50 (ARAÚJO- JORGE; CASTRO, 2000). A contagem diferencial dos leucócitos foi realizada no esfregaço sanguíneo corado com o kit panótico rápido (Laborclin), com auxílio de microscópio óptico de luz comum, sob aumento de 100X. Uma quantidade de cada tipo de célula foi estabelecida, encontrada ao final da contagem de 100 leucócitos.

#### 4.7 Avaliação histopatológica e histomorfométrica dos pulmões

Amostras dos pulmões foram retiradas dos camundongos, e fixadas em formol a 10% por 48 horas. O material passou por uma sequência de imersão em álcool a 70%, 80%, 95% e absoluto 1 e 2. Posteriormente, foi imerso em xilol 1 e 2 para clarificação e finalmente, foi embebido em parafina histológica para inclusão. Após a inclusão em parafina os blocos foram seccionados em micrótomo na espessura de 5µm e os cortes corados com hematoxilina-eosina (HE) (LUNA, 1968).

Foram avaliados infiltrado inflamatório, edema, lesão tecidual, necrose, presença de granulomas, remodelamento vascular e congestão vascular, por meio do sistema de escore que determina (0) ausente, (1) leve, (2) moderado e (3) intenso (LIBERIO et al., 2011). Para a análise histomorfométrica foi realizada uma metodologia similar a aplicada por Rodrigues et al. (2021). Utilizou-se o software ImageJ, em imagens de 6 campos aleatórios por amostra histológica, para a contagem do número e área dos granulomas. As imagens foram realizadas com microscópio invertido acoplado a uma câmera digital e sistemas de computador (NIS-*Elements advanced research*). Todas as avaliações foram realizadas por observadores “duplo-cegos”.

#### **4.8 Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados utilizando Software Prism 9 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Todos os dados foram analisados pelo Teste de Normalidade (teste de Kolmogorov-Sirnov). Os resultados foram expressos como média e desvio padrão (média  $\pm$  DP). Para dados paramétricos entre os diferentes grupos, foi utilizado para comparação o teste *t* de Student, e para correlação o teste de Pearson. Os dados com distribuição não paramétrica foram submetidos ao Teste Mann-Whitney para a comparação, e para a correlação, foi utilizado o teste de Spearman. Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Ovos nas fezes e no fígado comprovaram a infecção dos animais por *Schistosoma mansoni*

Os animais dos grupos INF60 e INF90 apresentaram ovos nas fezes e no fígado (Figura 17). O grupo INF90 apresentou mais ovos no fígado quando comparados ao INF60 (Figura 17a). Por outro lado, os animais do grupo INF90 tiveram menos ovos nas fezes que os animais do grupo INF60 (Figura 17b).

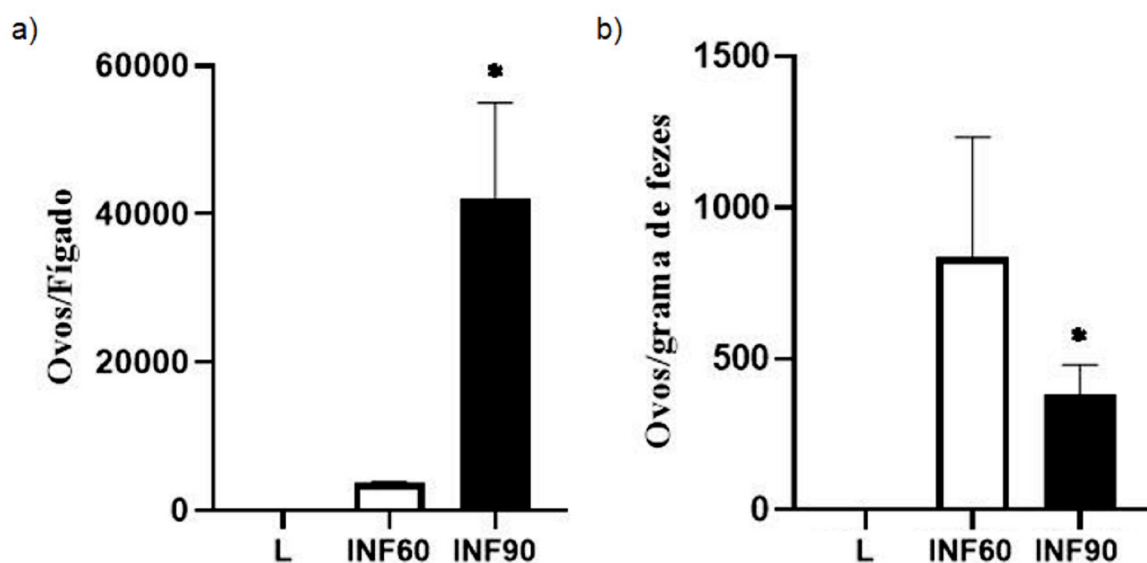


Figura 17. Número total de ovos encontrados nas fezes (A) e no fígado (B) de animais infectados por *Schistosoma mansoni*. Camundongos Swiss machos foram infectados por via percutânea com 50 cercárias. Após 60 (INF60) e 90 (INF90) dias de infecção foi realizada a contagem de ovos no fígado e nas fezes. Os dados representam a média  $\pm$  desvio padrão de 6 animais por grupo infectados e 12 animais do grupo Limpo.

\* $p < 0.05$  entre os grupos de camundongos infectados

### 5.2 Animais infectados por *Schistosoma mansoni* apresentaram leucocitose e eosinofilia sanguínea aos 60 e 90 dias

Os animais do grupo INF60 apresentaram aumento de eosinófilos circulantes. A contagem global de eosinófilos no sangue correspondeu a média de 21% dos leucócitos totais (Tabela 1). Quando comparados aos animais do grupo Limpo, os camundongos do grupo INF60 apresentaram aumento do número de leucócitos totais, neutrófilos, monócitos e eosinófilos (Tabela 1).

Os animais do grupo INF90 também apresentaram um aumento do número de leucócitos totais, porém foram os linfócitos que tiveram o aumento mais expressivo, representando

aproximadamente 60% do total de glóbulos brancos. Quando comparado ao grupo INF60, o grupo INF90 apresentou uma importante diminuição da eosinofilia em contraste a um significativo aumento de linfócitos circulantes (Tabela 1).

**Tabela 1. Contagem total de eosinófilos do sangue de camundongos infectados ou não por *Schistosoma mansoni***

| Célula<br>(x10 <sup>3</sup> / mm <sup>3</sup> ) | Grupos                |                    |                       |                    |
|-------------------------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|                                                 | Limpo 60 <sup>a</sup> | INF60 <sup>b</sup> | Limpo 90 <sup>a</sup> | INF90 <sup>b</sup> |
| <b>Leucócitos</b>                               | 3,7±0,6 <sup>c</sup>  | 6,5±0,9*           | 2,9±0                 | 6,0±0,1*           |
| <b>Neutrófilos</b>                              | 2,6±0,5               | 3,0±0,4            | 1,6±0,3               | 1,2±0,3#           |
| <b>Linfócitos</b>                               | 0,9±0,3               | 0,6 ±0,2*          | 1,0±0,3               | 3,8±0,4*#          |
| <b>Monócitos</b>                                | 0,1±0,1               | 1,4 ±0,6*          | 0,2±0                 | 0,5±0,1*           |
| <b>Eosinófilos</b>                              | 0                     | 1,4 ±0,4*          | 0                     | 0,3±0,1*#          |
| <b>Basófilos</b>                                | 0                     | 0                  | 0                     | 0                  |

<sup>a</sup> O grupo limpo não foi infectado.

<sup>b</sup> No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados após 60 (INF60) e 90 (INF90) dias de infecção.

<sup>c</sup> Os dados representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo.

\*p<0,05 em comparação aos respectivos grupos limpos;

#p<0,05 em comparação ao INF60

### 5.3 O tecido pulmonar de animais infectados por *Schistosoma mansoni* apresentou granulomas somente aos 90 dias

Os pulmões dos animais do grupo INF60 apresentaram alterações, principalmente perivasculares, com aumento do infiltrado inflamatório, predominantemente granulocítico (eosinófilos e neutrófilos), edema, congestão vascular e hemorragia quando comparados ao grupo Limpo (Tabela 2). Entretanto, não foram observadas áreas de remodelamento vascular ou necrose tecidual, nem a presença de granulomas maduros (Tabela 2, Figura 18 e 19).

Os aspectos observados nos tecidos pulmonares do grupo INF90 foram infiltrados inflamatórios irregularmente dispersos pelo tecido ou em aspectos arredondados, e ao redor de ovos do parasito, com várias células polimorfonucleares e mononucleares, além de hemorragia, edema e alterações vasculares (Tabela 2 e Figura 20).

A comparação entre os achados histopatológicos dentre os grupos INF60 e INF90, demonstrou uma persistência de características inflamatórias ao longo dos dias. Ademais, diferentemente do grupo INF60, foram encontrados granulomas maduros, assim como indícios de remodelamento vascular no grupo INF90 (Tabela 2).

**Tabela 2. Análise histopatológica do tecido pulmonar de camundongos limpos ou infectados por *Schistosoma mansoni* e eutanasiados com 60 dias.**

|                                     | Grupos                |                    |                       |                    |
|-------------------------------------|-----------------------|--------------------|-----------------------|--------------------|
|                                     | Limpo 60 <sup>a</sup> | INF60 <sup>b</sup> | Limpo 90 <sup>a</sup> | INF90 <sup>b</sup> |
| <b>Infiltrado inflamatório</b>      | 0.6 ±0.2 <sup>c</sup> | 1.5 ±0*            | 0.5 ±0.1              | 1.6 ±0.1*          |
| <b>Necrose</b>                      | 0                     | 0                  | 0                     | 0                  |
| <b>Edema</b>                        | 1±0                   | 1.3±0.2*           | 0.3±0.1               | 1.6 ±0.1*          |
| <b>Presença de granuloma maduro</b> | 0                     | 0                  | 0                     | 0.3±0.2            |
| <b>Congestão vascular</b>           | 1.6±0.2               | 2.6±0.2*           | 0.5±0.1               | 1.3±0.1*#          |
| <b>Remodelamento vascular</b>       | 0                     | 0                  | 0                     | 0.1±0              |
| <b>Hemorragia</b>                   | 1±0                   | 2 ±0*              | 0.5±0.1               | 1.3 ±0.1*#         |

A avaliação realizada com base no escores: 0= ausente; 1= leve; 2= moderado; 3= intenso. Os dados representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo.

<sup>a</sup> O grupo limpo não foi infectado.

<sup>b</sup> No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados após 60 (INF60) e 90 (INF90) dias de infecção.

<sup>c</sup>Os dados representam a média ± desvio padrão de 6 animais por grupo.

\*p<0.05 em comparação aos respectivos grupos limpos;

#p<0,05 em comparação ao INF60

O edema do tecido pulmonar do grupo INF 60 foi identificado por meio do espessamento dos septos interalveolares visto principalmente na Figura 18 (B). Congestão

vascular, infiltrado inflamatório tanto alveolar quanto perivascular, assim como pontos hemorrágicos, foram relevantes e podem ser identificadas na figura 18 (C) e (D).

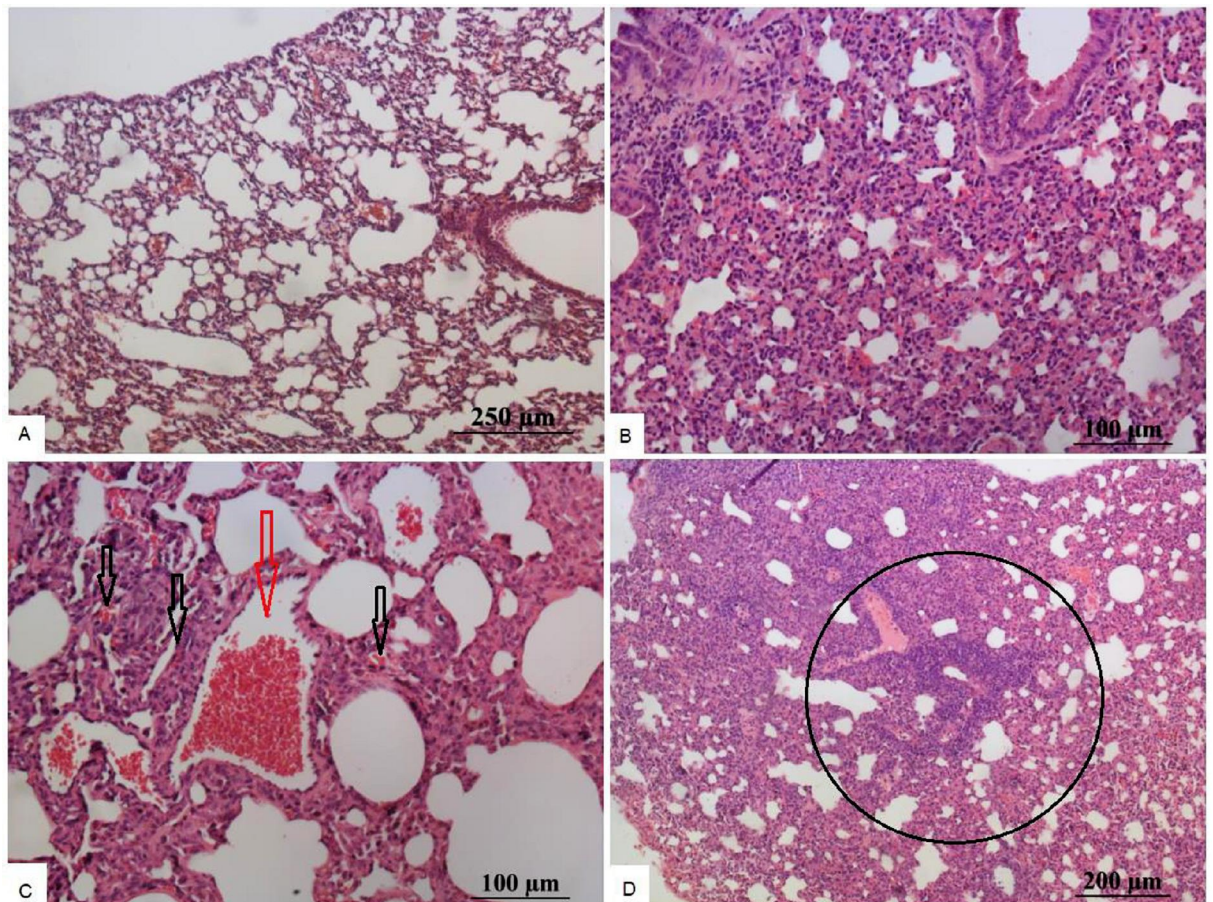


**Figura 18. Cortes histológicos de tecido pulmonar de camundongos limpos e após 60 dias de infecção por *Schistosoma mansoni*.** Lâminas coradas com HE. Figura (A) representa pulmão de camundongo limpo. Figura (B), (C) e (D) representam pulmões infectados. As setas pretas apresentam pontos hemorrágicos, a seta vermelha demonstra congestão vascular, e o círculo apresenta infiltrado inflamatório intenso (C) e (D).

Um ponto de grande destaque é que no tecido do grupo INF60 se observou grande quantidade de infiltrado mononuclear e polimorfonuclear nas mais diversas áreas, chegando, inclusive, a apresentar forma circular ou ovalar, como um granuloma em formação, com imagens sugestivas de fibras de colágeno difusas, mas sem a presença do ovo e fibrose central para caracterizar um granuloma maduro clássico da doença. Eosinófilos puderam ser vistos com o aumento da imagem na Figura 19.

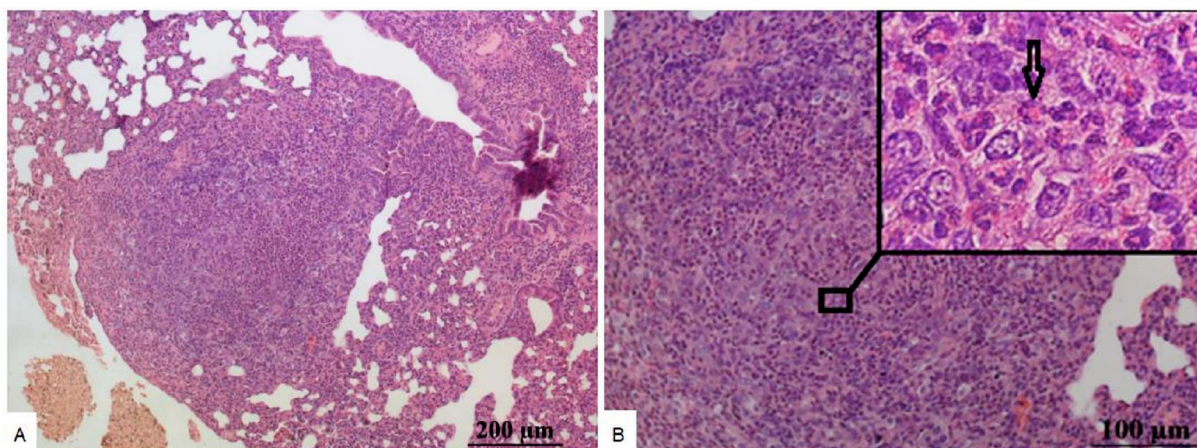


**Figura 19. Corte histológico de tecido pulmonar de camundongo do grupo INF60.** Lâmina corada com HE. Achado com características de um granuloma em formação em (A) e (B). A seta mostra eosinófilo em destaque.

Além dos sinais inflamatórios, entre as lâminas do grupo INF90 foram identificados sinais de remodelamento vascular e presença de granulomas. Contudo, esses dois achados foram observados em animais diferentes e numa porcentagem aproximada de 16% da amostra, ou seja, apenas um animal (Figura 20).

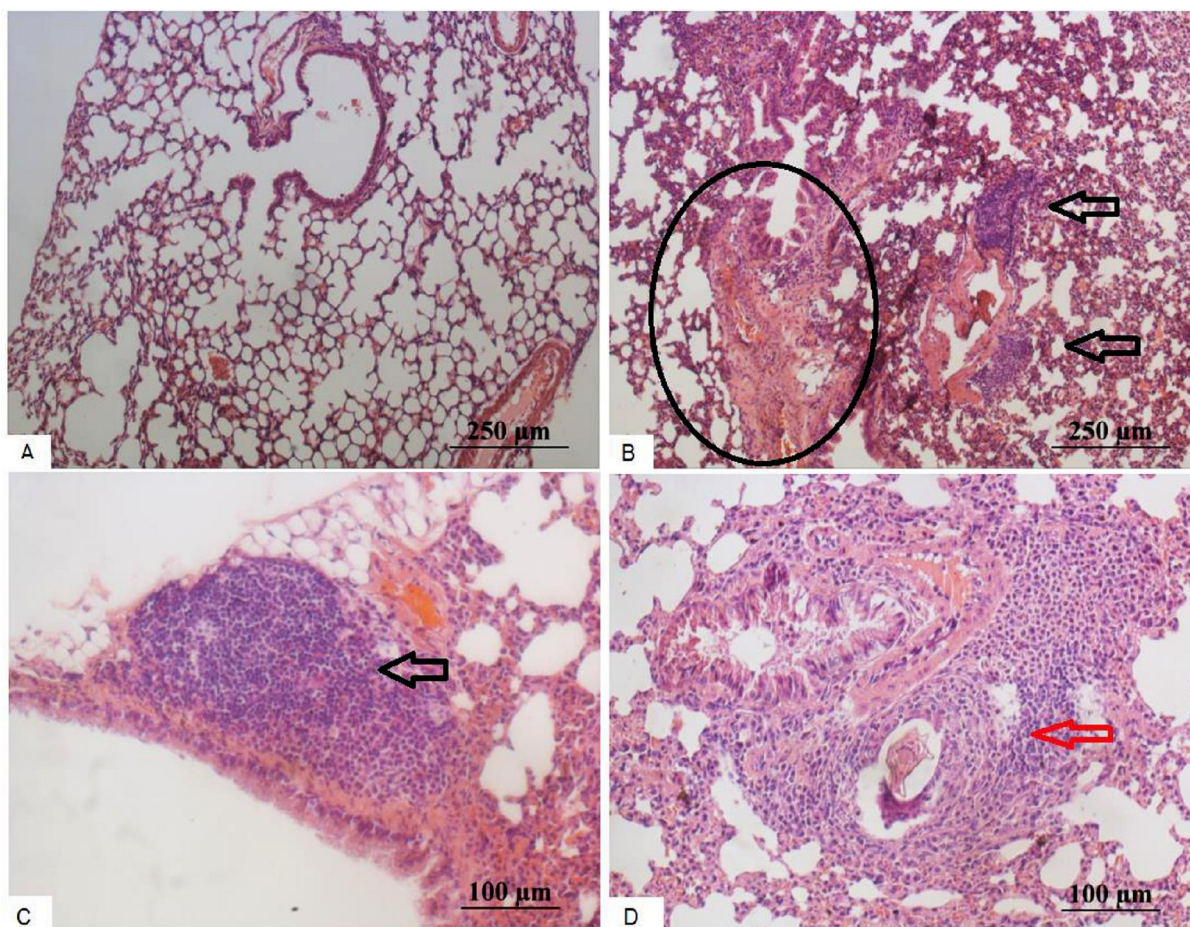


**Figura 20. Cortes histológicos de tecido pulmonar de camundongos com 90 dias de infecção por *Schistosoma mansoni*.** Lâminas coradas com HE. Tecido pulmonar de camundongo do grupo Limpo em (A) e do grupo infectado em (B), (C) e (D). Remodelamento vascular apresentado pelo círculo em (B) e infiltrado inflamatório apresentado pela seta preta em (B) e (C). A seta vermelha em (D) mostra granuloma pulmonar ao redor do ovo do parasito.

#### **5.4 Animais infectados por *Schistosoma mansoni* apresentaram granulomas pulmonares mais raros, menores e mais tardios**

Quanto ao número e área média de granulomas foram observadas quantidade e dimensão maiores e estatisticamente significativas na topografia hepática (Tabela 3). Assim como, quando comparamos os dados do mesmo órgão, porém entre grupos diferentes, houve um decréscimo da área média de granuloma hepático do grupo INF90 ( $0,03 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ ) em relação a área média de granuloma hepático do grupo INF60 ( $0,17 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ ).

Vale ressaltar que o único foco granulomatoso nas lâminas de tecido pulmonar do grupo INF60 foi excluído dessa estatística por se considerar que o granuloma ainda estava em formação. Contudo, se admitirmos a comparação entre a área média do foco pré-granulomatoso pulmonar do grupo INF60 e a área média dos granulomas pulmonares maduros encontrados do

grupo INF90, teremos um decréscimo de aproximadamente 10%, sendo 0,017 mm<sup>2</sup> a área média dos granulomas pulmonares encontrados nos animais do grupo INF90, contra 0,019mm<sup>2</sup> da lesão pré-granulomatosa vista no grupo INF60.

**Tabela 3. Número e área de granulomas encontrados no fígado e pulmão de animais infectados por *Schistosoma mansoni***

| Pulmão                   |                                      |                                      | Fígado                               |                                      |
|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
|                          | Número de granulomas/mm <sup>2</sup> | Área de granuloma em mm <sup>2</sup> | Número de granulomas/mm <sup>2</sup> | Área de granuloma em mm <sup>2</sup> |
| <b>INF60<sup>a</sup></b> | 0*                                   | 0*#                                  | 19,50±3,10 <sup>b</sup>              | 0,17±0,04#                           |
| <b>INF90<sup>a</sup></b> | 0,50±1,20*                           | 0,02±0,01*                           | 22,60±2,80                           | 0,03±0,04                            |

<sup>a</sup>No dia 0 os camundongos foram infectados com 50 cercárias e eutanasiados após 60 (INF60) e 90 (NF90) dias de infecção. O grupo limpo não foi infectado.

<sup>b</sup>Os dados representam a média ± desvio padrão de 4 animais no grupo INF60 e 6 animais no grupo INF90.

\*p<0.05 em comparação ao fígado;

#p<0,05 em comparação ao INF90;

Enquanto maioria dos granulomas hepáticos do grupo INF60 e INF90 apresentavam células inflamatórias mais periféricas e uma topografia predominantemente central de fibrose, ou seja, características de fases mais avançadas de granuloma, os granulomas pulmonares observados no grupo INF90 apresentaram infiltrado inflamatório com topografia aleatória e sem fibrose evidente (Figura 21).

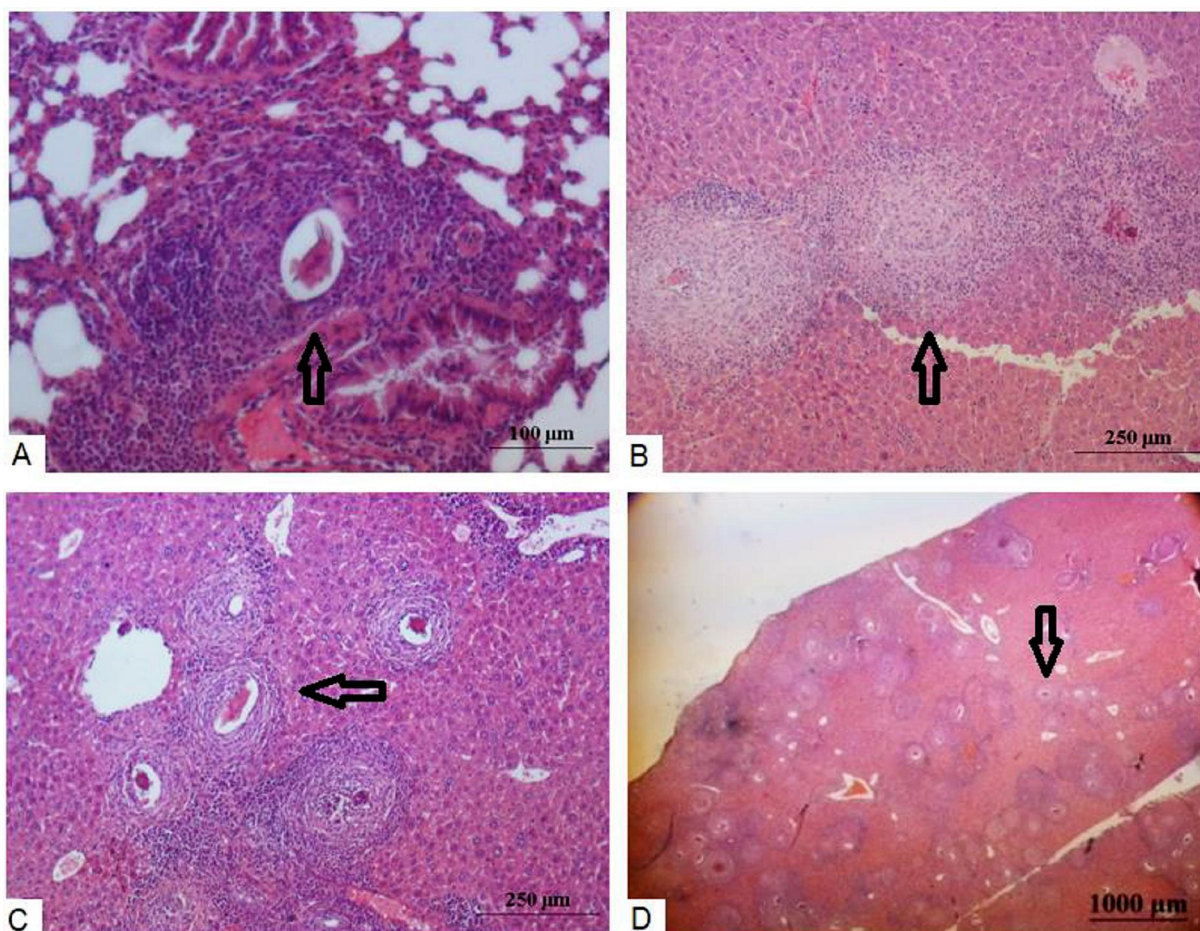


**Figura 21. Aspectos dos granulomas encontrados nos diferentes grupos camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*.** Lâminas coradas com HE. Granuloma visto no pulmão de camundongo com 90 dias de infecção em A, granuloma encontrado no fígado com 60 dias de infecção em B, e granulomas observados com 90 dias de infecção em C e D. As setas mostram os granulomas.

Como já observado anteriormente, apenas um animal do grupo INF90 apresentou granulomas pulmonares (16%). Os granulomas possuíam uma área média de  $0,017\text{mm}^2$ . Valor que representou aproximadamente a metade da área média dos granulomas hepáticos do mesmo animal ( $0.034\text{mm}^2$ ). Além disso, o número de granulomas hepáticos superou em quase nove vezes a quantidade de granulomas pulmonares. Em comparação ao restante amostral do grupo INF90, o animal que apresentou granuloma pulmonar foi o terceiro animal com mais quantidade de ovos encontrados nas fezes (434,8399) e o segundo em quantidade de ovos encontrados no fígado (54750). Quanto aos parâmetros sanguíneos, o animal também apresentou peculiaridades, pois em comparação ao restante amostral do INF90, foi encontrado maior linfocitose ( $4,63 \times 10^3/\text{mm}^3$ ) e menor eosinofilia ( $0,18 \times 10^3/\text{mm}^3$ ).

### **5.5 Na fase crônica, a eosinofilia sanguínea está associada a quantidade de ovos nas fezes e ao número de granulomas hepáticos.**

Para avaliar se os dados leucométricos (quantidade de eosinófilos), parasitológicos (ovos encontrados nas fezes e fígado) e histomorfométricos (área média e número de granulomas do fígado e pulmão) estariam associados, foi feita a correlação entre as variáveis.

No grupo INF60 não houve correlação entre o número de eosinófilos no sangue e o número de ovos nas fezes (Figura 22a) e no fígado (Figura 22c), bem como com o número (Figura 22e) e área dos granulomas (Figura 22g). Da mesma forma, não houve correlação entre o número de ovos nas fezes e o número de granulomas (Figura 22i) e a área dos granulomas (Figura 22l) hepáticos.

Por sua vez, no grupo INF90 houve correlação negativa entre o número de eosinófilos no sangue e o número de ovos nas fezes (Figura 22b) ( $r = -0,8$  e  $p = 0,01$ ) e uma correlação positiva entre o número de eosinófilos e o número de granulomas hepáticos (Figura 22f) ( $r = 0,8$  e  $p = 0,04$ ). Entretanto, não houve correlação entre o número de eosinófilos e o número de ovos no fígado (Figura 22d) nem em relação à área dos granulomas hepáticos (Figura 22h). Da mesma forma, não houve correlação entre o número de ovos nas fezes e o número de granulomas (Figura 22j) e a área dos granulomas (Figura 22m) hepáticos.

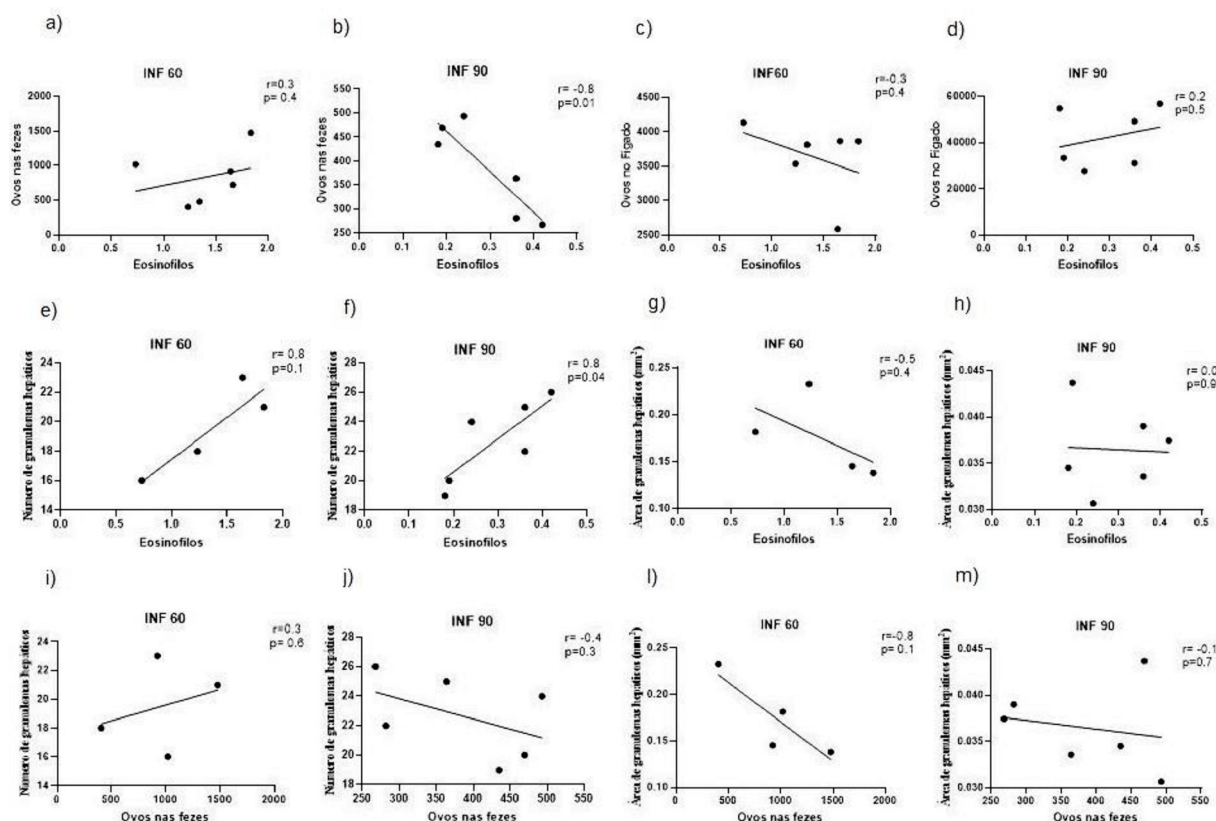


**Figura 22.** Correlação entre as variáveis de eosinófilos no sangue e ovos nas fezes em (a) e (b), eosinófilos no sangue e ovos no fígado em (c) e (d), eosinófilos e número de granulomas hepático em (e) e (f), eosinófilos e área de granulomas hepáticos em (g) e (h), ovos nas fezes e número de granulomas hepáticos em (i) e (j), e ovos nas fezes e área dos granulomas hepáticos, em animais infectados por *Schistosoma mansoni* dos grupos INF 60 e INF90 respectivamente. Os dados laboratoriais e parasitológicos foram obtidos de 6 animais infectados e 6 animais limpos eutanasiados com 60 dias e de 6 animais infectados e 6 animais limpos eutanasiados com 90 dias. Dados histopatológicos e histomorfométricos foram obtidos de 4 animais infectados e 4 animais limpos eutanasiados com 60 dias e de 6 animais infectados e 6 animais limpos eutanasiados com 90 dias.

Quando analisadas as correlações das variáveis com o granuloma pulmonar do INF90 foi observado que não houve correlação entre o número de granulomas pulmonares e número de eosinófilos no sangue (Figura 23a), entre eosinófilos no sangue e área de granulomas pulmonares (Figura 23b), entre ovos nas fezes e número de granulomas pulmonares (Figura 23c), entre ovos nas fezes e área de granulomas pulmonares (Figura 23d), entre ovos no fígado e número de granulomas pulmonares (Figura 23e), entre ovos no fígado e área de granulomas pulmonares em (Figura 23f), entre número de granulomas pulmonares e número de granulomas hepáticos (Figura 23g), e entre área de granulomas pulmonares e área de granulomas hepáticos (Figura 23h).

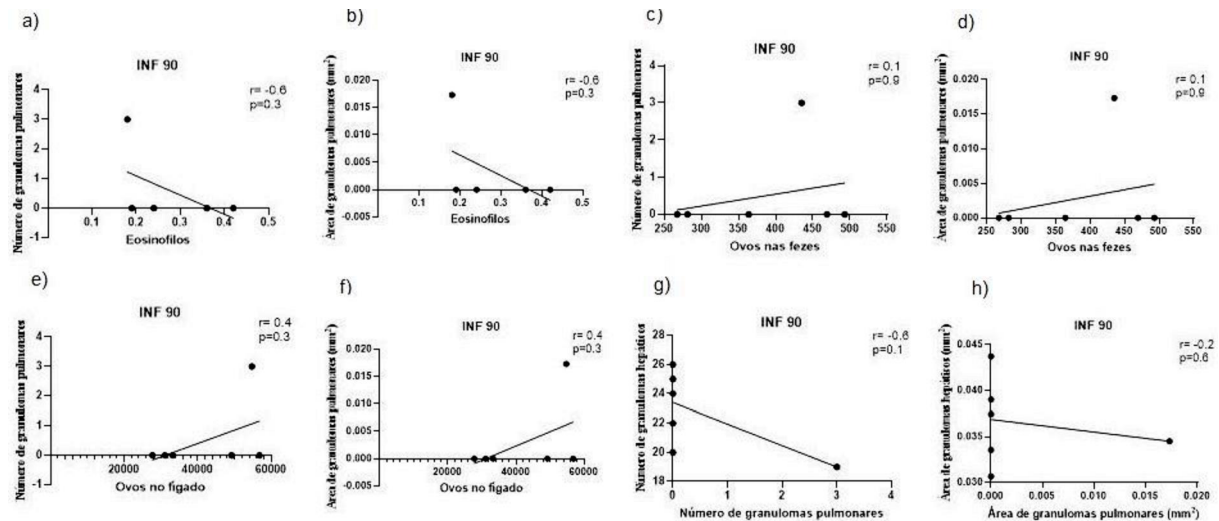


**Figura 23. Correlação entre as variáveis de eosinófilos no sangue e número de granulomas pulmonares em (a), eosinófilos no sangue e área de granulomas pulmonares em (b), ovos nas fezes e número de granulomas pulmonares em (c), ovos nas fezes e área de granulomas pulmonares em (d), ovos no fígado e número de granulomas pulmonares em (e), ovos no fígado e área de granulomas pulmonares em (f), número de granulomas pulmonares e número de granulomas hepáticos em (g) e área de granulomas pulmonares e área de granulomas hepáticos em (h), em animais infectados por *Schistosoma mansoni* do grupo INF90. Os dados laboratoriais e parasitológicos foram obtidos de 6 animais infectados e 6 animais limpos eutanasiados com 60 dias e de 6 animais infectados e 6 animais limpos eutanasiados com 90 dias. Dados histopatológicos e histomorfométricos foram obtidos de 4 animais infectados e 4 animais limpos eutanasiados com 60 dias e de 6 animais infectados e 6 animais limpos eutanasiados com 90 dias.**

## 6. DISCUSSÃO

Os dados deste trabalho apontaram para um aumento dos eosinófilos sanguíneos durante a fase aguda, que reduz com o tempo, porém ainda permanece elevado até o início da fase crônica, quando o grau de eosinofilia sanguínea está associado a uma menor quantidade de ovos nas fezes e à um aumento do número de granulomas hepáticos. Ademais, neste intervalo existe uma evolução menor e mais tardia do granuloma pulmonar em relação ao observado no tecido hepático, podendo corresponder a uma fase evolutiva interposta da esquistossomose, como sugerido por Gobbi et al. (2019; 2020).

Conceitualmente, infere-se que uma doença aguda seja relativamente súbita, com sintomas evidentes de duração limitada. Enquanto um distúrbio crônico tenha longa duração, com evolução lenta, e conseqüentemente, nunca é curado totalmente, pois o agente agressor geralmente persiste nos tecidos, estando em equilíbrio com o hospedeiro (SILVA, 2011; SCUTTI, 2016). O Centro Americano de Controle e de Prevenção de Doenças (CDC) (2021) estabelece que doenças crônicas são definidas de forma ampla como condições que duram um ano ou mais e causam limitações. Enquanto o Ministério da Saúde brasileiro reafirma que o prognóstico de patologias crônicas não tem garantia de cura (BRASIL, 2013).

Em concordância com os conceitos acima, Gobbi et al. (2019; 2020) fizeram uma crítica à tradicional diferenciação entre fases aguda e crônica por um prazo de 12 semanas contados a partir do momento da exposição, classificando-a como arbitrária. Seus argumentos foram baseados em descobertas recentes de nódulos pulmonares transitórios que desapareceram rapidamente após o tratamento do paciente, assim como nódulos pulmonares que desapareceram sem tratamento em outro caso, mesmo após meses de infecção. Desse modo, a resolução completa dos casos gera dúvidas e novas expectativas diante de alguns conceitos da formação do granuloma à medida que deveria existir uma fibrose local, e conseqüentemente, dificuldade de resolução espontânea ou mesmo após introdução de um antiparasitário. Por isso, os autores defenderam a adição de uma fase intermediária ou reversível onde seria capaz de encontrar fêmeas adultas efetuando a oviposição enquanto transitam pelos pulmões.

Baharoon et al (2011) relataram um caso de um paciente com esquistossomose pulmonar aguda que possuía nódulos pulmonares ao exame de tomografia de tórax e foi diagnosticado por meio de biopsia pulmonar após a décima semana de uma viagem para área endêmica. A histopatologia mostrou um granuloma pulmonar com um ovo no centro e pequeno infiltrado inflamatório periférico. Então, após tratamento com praziquantel e corticóide,

observaram não somente a melhora clínica, como também o desaparecimento dos nódulos pulmonares na radiografia de tórax. Portanto, na existência de uma fase intermediária ou reversível, estudos experimentais da patologia pulmonar em diferentes etapas também poderiam trazer novas perspectivas.

O grupo INF60 do estudo fez parte da periodicidade reconhecida até o momento como fase aguda. Os aspectos observados nos tecidos pulmonares dos camundongos foram infiltrados inflamatórios com predominância de neutrófilos e eosinófilos, hemorragia, edema e congestão vascular, além de um foco inflamatório arredondado, com áreas sugestivas de fibras de colágeno, indicando uma forma mais precoce ou fragmentada de um granuloma sem ovo (Figura 19). O achado cabe facilmente no conceito publicado por Ariyaratne e Finney (2019) de que o conjunto de fibras de colágeno depositado entre camadas de células imunes inatas, principalmente macrófagos e eosinófilos, bem como células T CD4<sup>+</sup> seria definido como granuloma Th2. Os mesmos autores ainda relataram que, curiosamente, macrófagos alternativamente ativados residentes no miocárdio estavam aumentados em infecções por *S. mansoni* em outros órgãos, e por isso, tal resposta poderia induzir a reparação tecidual em locais desprovidos de parasitos, trazendo consequências ainda piores ao hospedeiro.

O foco inflamatório encontrado exibiu características do primeiro estágio de granuloma da classificação apresentada por Amaral et al (2017), estágio pré-granulomatoso, caracterizado por um infiltrado de células inflamatórias em processo de organização. Em contraste com a maioria dos focos granulomatosos vistos no tecido hepático que já possuíam características das últimas fases. Da fase exsudativa-produtiva, uma rica estrutura de fibras de colágeno, porém ainda com aspecto desorganizado, e do estágio final ou produtivo, com organização das fibras de colágeno e menos células inflamatórias (AMARAL et al., 2017; FATURETO et al., 2003).

Schwartz e Fallon (2018) afirmaram que granulomas intestinais possuem um predomínio de macrófagos enquanto os granulomas hepáticos detêm uma maior quantidade de eosinófilos. Consequentemente, o granuloma pulmonar nas fases iniciais parece ter uma maior proximidade histopatológica com granuloma hepático, se comparadas às informações sobre a morfologia dos granulomas intestinais. Entretanto, como não avaliamos os granulomas intestinais no presente estudo essa premissa ainda carece de maiores comprovações.

Ovos do parasito foram encontrados nas fezes e no fígado de camundongos do grupo INF60 e o tecido hepático também apresentava vários granulomas. Isso assegura que todos os camundongos deste grupo foram infectados com sucesso. Como também corrobora com o que

foi exposto por Butrous (2019) que afirmou que a oviposição de *S. mansoni* se dá no sistema porta-hepático, portanto espera-se que os primeiros indícios da doença crônica sejam vistos apenas no fígado. Entretanto, não havia ovos nos pulmões o que corrobora com Raso e Andrade Filho (2014) que relataram que apenas uma pequena porcentagem de hospedeiros acometidos por esquistossomose terá a embolia e granuloma pulmonar após a oviposição do parasito, mesmo entre aqueles que já possuem acometimentos em outros sistemas. Assim, é possível que outras complicações derivadas de tal evento também não estejam presentes, como lesões plexiformes por angiogênese ou remodelamento vascular (SCHWARTZ; FALLON, 2018; BRUTOUS, 2019). Entretanto, vale ressaltar que as principais alterações vistas no estudo foram preferencialmente perivasculares. Naturalmente, conforme o decorrer do tempo, era de certa forma, previsto que novos indícios de alterações histológicas estivessem presentes dentro dos pequenos e grandes vasos.

A análise histopatológica e histomorfométrica do grupo INF90 fez parte da periodicidade reconhecida até o momento como fase crônica, pois foram submetidos a eutanásia com 90 dias de infecção. Contudo, como já foi visto, essa cronologia dualista com ponto decisivo aos 3 meses é passível de crítica. Visão corroborada com os achados do grupo INF90. Os aspectos observados nos tecidos pulmonares foram infiltrados inflamatórios com várias células poli e mononucleares, hemorragia, edema, alterações vasculares, além de granulomas, que apresentavam características do segundo estágio, fase necrótica-exsudativa, com processos inflamatórios irregularmente espalhadas em forma de um halo ao redor do ovo (AMARAL et al., 2017; FATURETO et al., 2003). Enquanto a doença hepática mostrava-se superior no amadurecimento, número e área dos granulomas.

Quanto às alterações perivasculares e intravasculares, foi observado alguns sinais de início de remodelamento vascular além de congestão no grupo INF90 (Figura 20). Em um dos raros estudos experimentais e histopatológicos sobre granulomas pulmonares que acompanhou a evolução da lesão por várias semanas (entre a décima e a vigésima quinta), Vidal et al. (1993) observaram que histologicamente, os granulomas eram representados por agregados celulares compactos e escasso estroma, sendo que macrófagos e eosinófilos eram os principais tipos histológicos encontrados, seguidos por linfócitos, e que haviam dois tipos de granulomas pulmonares distintos. Um que envolve o tecido alveolar, “granuloma alveolar”, e outro que envolve vasos, “granuloma arterial”. O primeiro com boa resposta ao tratamento medicamentoso contra o parasito, enquanto o segundo não. No estudo foi aplicado um modelo

de ligadura de veia porta que segundo os autores foi determinante para alguns resultados distintos, como um número e volume superior de granulomas pulmonares em relação aos hepáticos.

Portanto, a cronificação da esquistossomose pulmonar pode na verdade se tratar de duas patologias completamente diferentes, uma alveolar, similar ao que ocorre em outros órgãos, e outra vascular, em que acontece após a doença hepática crônica. Nesta última entidade, os ovos poderiam se alojar nas arteríolas pulmonares e produzir uma endarterite pulmonar granulomatosa, com desenvolvimento subsequente de hipertensão pulmonar e cor pulmonale. Essa progressão poderia estar associada ao aumento cardíaco e dilatação da artéria pulmonar, manifestações que representam a doença em estágio terminal e irreversível (CLERINX; SOENTIENS, 2021).

Neste trabalho, aos 90 dias de infecção, granulomas arteriais não foram encontrados, porém foi observada uma patologia granulomatosa alveolar em 16% da amostra (um animal). De acordo com Vidal et al (1993), esse tipo de granuloma pode responder ao tratamento antiparasitário. Na mesma porcentagem foi encontrado características de angiogênese próximo aos infiltrados perivasculares. Índices menores em comparação ao estudo de Kolosionek et al. (2013) que infectaram camundongos com o dobro de cercarias e fizeram eutanásia com doze semanas. Eles constataram uma média de 28% de pulmões acometidos. Essas alterações vasculares estão associadas a patologia hipertensiva vascular, a qual esta sim, até seu desenvolvimento, teria uma evolução mais lenta e pouca chance de cura quando instalada, aspectos conceituais de fase crônica.

Então, além da terapia contra o parasito, por volta de 3 meses de infecção, a implementação de uma terapia focada na diminuição da progressão de alterações vasculares, podem apresentar resultados fundamentais para impedir a cronificação. Em estudos experimentais, a utilização de substâncias anti-inflamatórias e imunomoduladoras associadas ao praziquantel já mostraram mais benefícios que a terapia tradicional contra a esquistossomose crônica (EL-SISI et al., 2013; RODRIGUES et al, 2020). De acordo com Mickael e Graham (2019), como as terapias atuais não podem reverter a hipertensão arterial pulmonar induzida por esquistossomose após sua instalação, o tratamento é limitado a terapia vasodilatadora principalmente, mas como investigações identificaram vários componentes do eixo entre inflamação Th2, sinalização de TGF- $\beta$  e doença vascular pulmonar, e considerando que qualquer imunossupressor acarreta outros problemas ao paciente como infecções, seria ideal

visualizar como alvo terapêutico uma droga que agisse em mediadores da sinalização de TGF- $\beta$ .

Durante a formação granulomatosa, sabe-se também que eosinófilos são fontes de TGF- $\beta$  e IL-13, importantes mediadores pró-fibróticos que estimulam a produção de colágeno (MUNITZ & LEVI-SCHAFFER, 2004). Além disso, atuam tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (JOHNSTON et al., 2020). A resposta eosinofílica vista no leucograma do grupo INF60 (em torno de 21,4%) apresenta-se intensamente aumentada, uma vez que os parâmetros hematológicos normais de camundongos Swiss variam de 0 a 4 pontos percentuais de eosinófilos no hemograma (CASTELLO BRANCO et al., 2011).

Para Jaureguiberry et al (2010), este aumento de eosinófilos no sangue periférico é comum na esquistossomose aguda, porém os valores podem estar nos padrões de normalidade em até 27% dos casos. Acredita-se que de forma geral, essas células migrem da medula óssea através do sistema circulatório para o local da infecção, onde se acumulam e promovem danos aos parasitos. Informação reforçada após a neutralização de IL-5 durante a infecção, que resultou em uma falta de acúmulo de eosinófilos em granulomas hepáticos, sugerindo que os eosinófilos são provavelmente recrutados do sangue. No entanto, a maioria das afirmações sobre o papel dos eosinófilos nos granulomas são baseadas em evidências *in vitro*, enquanto o papel desempenhado por eosinófilos na eliminação do parasito *in vivo* até então, são bem menos compreendidos (ARIYARATNE; FINNEY, 2019).

Aos 90 dias de infecção, ou seja, após a décima segunda semana, ovos do parasito também foram encontrados nas fezes e no fígado de camundongos, confirmando a infecção do grupo INF90. Porém, em comparação ao grupo INF60, houve redução substancial na eliminação de ovos nas fezes, ao mesmo tempo que ocorreu uma linfocitose circulante (em torno de 60,8%), e a eosinofilia sanguínea caiu significativamente, de 21,4% para 5,4% aproximadamente. De acordo com Davids (2020), o aumento conjunto desses dois tipos celulares é visto em infecções e reações alérgicas, entre outras condições. No entanto, a regressão concomitante da eosinofilia sanguínea e da excreção de ovos, pode inferir uma íntima relação entre a intensidade da infecção e a quantidade de eosinófilos circulantes. Corroborando com Clerinx e Soentiens (2021) quando afirmaram que o grau de eosinofilia depende do estágio, intensidade e duração da esquistossomose.

Por outro lado, dados deste estudo sugeriram uma correlação no grupo INF90 entre o aumento da quantidade de eosinófilos e uma diminuição da quantidade de ovos nas fezes. Como

também uma correlação entre uma maior eosinofilia sanguínea e uma maior quantidade de granulomas no fígado. Achados que supostamente contrariam a ideia de que eosinófilos afetam a resposta imune facilitando a saída dos ovos do parasito da mucosa para a luz intestinal (OLIVEIRA, 2016). Assim, de acordo com o que foi observado, quanto maior a quantidade de eosinófilos no sangue, poderíamos ter uma menor possibilidade diagnóstica por meio do método mais tradicional de observação de ovos nas fezes. Baaten et al. (2011) aplicaram testes sorológicos em aproximadamente 1200 viajantes para o diagnóstico de esquistossomose entre outras parasitoses, e também afirmaram que a eosinofilia sanguínea não seria um bom exame laboratorial para triagem de doenças parasitárias, contudo a explicação para a afirmação se deu pelo baixo valor preditivo positivo do exame.

Outro achado importante do estudo foi que o único animal do grupo INF90 que apresentou granuloma pulmonar também apresentou a menor quantidade de eosinófilos circulantes (aproximadamente 3%) entre todos os camundongos infectados do estudo. Valor similar ao encontrado em camundongos com esquistossomose crônica do estudo de Ramos (2004). Esse animal foi o terceiro camundongo com mais quantidade de ovos encontrados nas fezes e o segundo em quantidade de ovos encontrados no fígado. Portanto, pode se tratar de um animal que manteve a resposta imunológica eosinofílica menos intensa, o que pode nos levar a sugerir que a persistência da eosinofilia na esquistossomose poderia ser investigada como fator prognóstico. Wang et al. (2020), que observaram eosinofilia em 91% de 78 casos de esquistossomose mansoni, descreveram que apenas 3 pacientes eram assintomáticos. Eles afirmaram também que essa alteração laboratorial dura por volta de 2 a 10 semanas durante o curso da doença. Então, se alterações laboratoriais significativas, quantitativas e/ou percentuais, são capazes de acompanhar o quadro clínico do paciente e persistem mesmo após o tempo exigido para cronificação da doença, admite-se novamente que o período de 90 dias é insuficiente para dizer que há um equilíbrio entre o parasito e hospedeiro esperado na fase crônica. Smits et al. (2007), em estudo experimental com camundongos infectados por *S. mansoni* eutanasiados com 8, 12 e 16 semanas, observaram no lavado broncoalveolar que os eosinófilos, entre outras células inflamatórias que inicialmente estavam aumentadas, permaneciam reduzindo progressivamente ao longo das semanas.

Para Oliveira (2016), os eosinófilos não têm participação essencial no controle da infecção, não sendo capaz de alterar significativamente a mortalidade, mas que sua ausência impactaria na evolução das lesões. O autor, observou que após 12 semanas de infecção, os

granulomas hepáticos de camundongos deficientes deste tipo celular mostraram importante redução de volume associado a um novo processo de imunomodulação. Além disso, o autor observou uma maior retenção de ovos no intestino e uma redução significativa de citocinas especialmente de perfil Th2. Elas foram IL-33, IL-5 e IL-13, além das citocinas regulatórias IL-10, IL-17 e TGF-alfa. O impacto de eosinófilos na evolução das lesões granulomatosas foi reforçado neste trabalho à medida que tanto a eosinofilia sanguínea, quanto a área das lesões diminuíram no grupo INF90 em comparação ao grupo INF60. Por outro lado, ainda existem pontos que necessitam de maior esclarecimento. Estudos de Reimert et al (2006) observaram que eosinófilos sanguíneos foram ativados durante a infecção, contrastando-se com uma diminuição significativa nas primeiras 24h após o uso de praziquantel. Contudo, essa diminuição, também chamada de eosinopenia, foi seguida pelo desenvolvimento de eosinofilia sanguínea 3 semanas depois.

Por fim, a partir dos resultados que foram vistos entre os grupos estudados, pode-se supor então que a resposta imunológica é intensa nas primeiras semanas de infecção e que a presença de eosinofilia no sangue periférico dos camundongos dos dois grupos estudados durante a maturação do granuloma assente uma predominância da resposta tipo Th2 com estímulo à produção de IL-4, IL-5 e IL-13. Citocinas que estão envolvidas também com a sinalização de TGF- $\beta$  e remodelamento vascular (GRAHAM; KUMAR, 2013). Os cortes histológicos também ratificam essa informação, pois mesmo com possíveis variações quantitativas, mostraram importante presença de tipos celulares associados a essa resposta imune (SCHWARTZ; FALLON, 2018). Dessa maneira, tais resultados apoiam que intervenções terapêuticas diferenciadas e específicas contra a esquistossomose pulmonar consigam promover maior benefício, observando-se o controle da eosinofilia local e sistêmica como bom parâmetro laboratorial para evolução da doença, como também, alicerça a ideia de que tais tratamentos específicos poderiam apresentar algum resultado mesmo que feitos em pacientes que já possuíssem uma doença granulomatosa hepática mais avançada.

## 7. CONCLUSÕES

Diante dos resultados expostos podemos concluir que durante a infecção do tecido pulmonar de camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*:

- ✓ Existe uma eosinofilia sistêmica que diminui conforme a doença cronifica;
- ✓ O grau de eosinofilia sanguínea tem associação com o número de ovos nas fezes e ao número de granulomas hepáticos no início da fase crônica (90 dias)
- ✓ Granulomas pulmonares são mais tardios, menores e mais raros em comparação ao granuloma hepático;
- ✓ Vários conceitos de cronicidade não se enquadram nos achados do início da doença crônica da esquistossomose pulmonar.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELES JMM, MERCADO, VJP, RIVERA PT. Behind Enemy Lines: Immunomodulatory Armamentarium of the Schistosome Parasite. *Frontiers in Immunology*, 11: 1-12; 2020.
- ALLEN JN, DAVIS WB. Eosinophilic lung diseases. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 150 (5): 1423-1438; 1994.
- AMARAL FC. Avaliação da expressão de receptores Siglec-5 e -9 em neutrófilos humanos estimulados com LPS. 117ff. Dissertação ( Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.
- AMARAL KB, SILVA TP, DIAS FF, MALTA KK, ROSA FM, COSTA-NETO SF, GENTILE R, MELO RCN. Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. *Plos One* ,1: 1-20; 2017.
- ARIYARATNE A, FINNEY CAM. Eosinophils and Macrophages within the Th2-Induced Granuloma: Balancing Killing and Healing in a Tight Space. *Infection and Immunity*, 87 (10): 1-15; 2019
- BAATEN GG, SONDER GJ, GOOL TV, KINT JÁ, HOEK AVD. Travel-related schistosomiasis, strongyloidiasis, filariasis, and toxocariasis: the risk of infection and the diagnostic relevance of blood eosinofilia. *BioMed Central Infectious Diseases*, 11(84): 2-8; 2011.
- BARBOSA CS, GOMES EC, MARCELINO JMR, CAVALCANTE KRLJ, NASCIMENTO WRC. Controle de qualidade das lâminas pelo método Kato-Katz para o diagnóstico parasitológico da esquistossomose mansônica. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Lab. 53; 2017.
- BASTOS AL, BRITO ILA, Esquistossomíase pulmonar aguda: achados na TCAR e apresentação clínica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 37(6): 823-825; 2011.
- BAHAROON SA, AL-JAHDALI HH, BAMEFLEH HS, ELKEIR AM, YAMANI YM. Acute Pulmonary Schistosomiasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 3 (1): 303-305; 2011.
- BMJ. Avaliação da eosinofilia. Disponível em: <https://bestpractice.bmj.com/topics/pt-br/835>. Acesso em 18 de Outubro de 2020.
- BOCHNER BS. Siglec-8 on human eosinophils and mast cells, and Siglec-F on murine eosinophils, are functionally related inhibitory receptors. *Clinical & Experimental Allergy*. 39(3): 317–324; 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Atenção Básica. Diretrizes para o cuidado das pessoas com doenças crônicas nas redes de atenção à saúde e nas linhas de cuidado prioritárias/ Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2013. 30 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Manson: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 144 p.

BUTROUS G. Schistosome infection and its effect on pulmonary circulation. *Global Cardiology Science and Practice*, 5: 1-44; 2019.

BURKE ML, JONES MK, GOBERT GN, LI YS, ELLIS MK, MCMANUS DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 31(4):163-176; 2009.

CAMPA P, DEVELOUX M, PHAR GB, PHARM DM, LAME C, CARAYON MJ, GIRARD PM. Chronic *Schistosoma mekongi* in a Traveler—A Case Report and Review of the Literature. *Journal of Travel Medicine*, v21: 361-363, 2014.

CAMPOS LEM, PEREIRA LFF. Eosinofilia pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 35 (6): 561-573; 2009.

CANTANHEDE SPD, FERREIRA AP, MATTOS IE. Esquistossomose mansônica no Estado do Maranhão, Brasil, 1997-2003. *Cad. Saúde Pública*, 27 (4): 811-816; 2011

CARVALHO OS; COELHO PMZ; LENZI, HL. *Schistosoma manson* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. 1º ed: Editora FIOCRUZ; 2008.

CASAVECHIA MTG, MELO GAN, FERNANDES ACBS, DE CASTRO KR, PEDROSO RB, SANTOS TS, TEIXEIRA JJV. Systematic review and meta-analysis on *Schistosoma manson* infection prevalence, and associated risk factors in Brazil. *Parasitology*, 145: 1000–1014; 2018.

CASTELLO BRANCO ACS, DINIZ MFF, ALMEIDA RN, SANTOS HB, OLIVEIRA KM, RAMALHO JA, DANTAS JG. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos wistar e camundongos swiss do biotério professor Thomas George. *Revista Brasileira de Ciências e Saúde*, 15 (2): 209-214; 2011

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). About Chronic Diseases. Disponível em: <https://www.cdc.gov/chronicdisease/about/index.htm#:~:text=Chronic%20diseases%20are%20defined%20broadly,disability%20in%20the%20United%20States>. Acesso em: 14 de Maio de 2021.

CHOI M, YU J. Who Neglects Neglected Tropical Diseases? – Korean Perspective. *Journal of Korean Medical Science*, 30 (2): 122–130; 2015.

CHUAH C, GOBERT GN, LATFI B, HEO CC, LEO CY. Schistosomiasis in Malaysia: A review. *Journal Acta Tropica*, 190: 137-143; 2019.

CLERINX J, SOENTIENS P. Schistosomiasis: Epidemiology and clinical manifestations. Disponível em: [https://www.uptodate.com/contents/schistosomiasis-epidemiology-and-clinical-manifestations?search=esquistossomose&source=search\\_result&selectedTitle=1~85&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/schistosomiasis-epidemiology-and-clinical-manifestations?search=esquistossomose&source=search_result&selectedTitle=1~85&usage_type=default&display_rank=1). Acesso em 23 de Maio de 2021.

CLERINX J, SOENTIENS P. Schistosomiasis: Treatment and prevention. Disponível em: [https://www.uptodate.com/contents/schistosomiasis-treatment-and-prevention?search=esquistossomose&source=search\\_result&selectedTitle=2~85&usage\\_type=default&display\\_rank=2](https://www.uptodate.com/contents/schistosomiasis-treatment-and-prevention?search=esquistossomose&source=search_result&selectedTitle=2~85&usage_type=default&display_rank=2). Acesso em 13 de Dezembro de 2020.

CNOPS L, HUYSE T, MANIEWSKI U, SOENTJENS P, BOTTIEAU E, ESBROECK MV, CLERINX J. Acute Schistosomiasis with *A. S. Mattheei* x *S. Haematobium* Hybrid Species in a Cluster of 34 Travelers Infected in South Africa. *Clinical Infectious Diseases*, 2020.

COLLEY DG, SECOR WE. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, 36: 347–357; 2014

CORON N, GOVIC YL, KETTANI S, PIHET M, HEMERY S, GENTILE L, CHABASS D. Case Report: Early Detection of *Schistosoma* Egg-Induced Pulmonary Granulomas in a Returning Traveler. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 94(3): 611–614; 2016.

CORLISS BA, AZIMI MS, MUNSON J, PEIRCE SM, MURFEE WL. Macrophages: an inflammatory link between angiogenesis and lymphangiogenesis. *Microcirculation*, 23: 95–121; 2016.

COSTA LGFS, BRUM AV, BRUM TL, BRUM VL, LOPES AC, JUNIOR AMP, FALCAO AP, DIAS LC, BUSSAD PA, ALVES RT. Esquistossomose com descompensação pulmonar aguda. Relato de caso. *Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica*, 10(2): 172-174; 2012.

DAVIDS AS. Approach to the adult with lymphocytosis or lymphocytopenia. Disponível em: [https://www.uptodate.com/contents/approach-to-the-adult-with-lymphocytosis-or-lymphocytopenia?search=linfocitose&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/approach-to-the-adult-with-lymphocytosis-or-lymphocytopenia?search=linfocitose&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1). Acesso em 10 de Novembro de 2020.

DIAS FF, AMARAM KB, MALTA KK, SILVA TP, RODRIGUES GSC, ROSA FM, RODRIGUES GOL, COSTA VV, CHIARINI-GARCIA H, WELLER PF, MELO RCN. Identification of Piecemeal Degranulation and Vesicular Transport of MBP-1 in Liver-Infiltrating Mouse Eosinophils During Acute Experimental *Schistosoma mansoni* Infection. *Front. Immunol*, 9: 1-14; 2018.

DIAS S, GONÇALVES A. Migração e Saúde, in DIAS, Sónia (org.), *Revista Migrações - Número Temático Imigração e Saúde*, 1: 15-26; 2007.

DI BELLA S, RICCARDI N, GIACOBBE DR, LUZZATI R. History of schistosomiasis (bilharziasis) in humans: from Egyptian medical papyri to molecular biology on mummies. *Pathogens and Global Health*, 112: 268-273; 2018.

DINARDO AR, MACE EM, LESTEBERG K, CIRILLO JD, MANALAKAS AM, GRAVISS EA, ORANGE JS, MAKEDONAS G. Schistosome Soluble Egg Antigen Decreases Mycobacterium tuberculosis-Specific CD4+ T-Cell Effector Function With Concomitant Arrest of Macrophage Phago-Lysosome Maturation. *The Journal of Infectious Diseases*, 214 (3): 479–488; 2016.

EL-DIB NA. Theodor Bilharz and a life trip to Egypt. *Parasitologists United Journal*, 12 (1): 3-7; 2019.

EL-SISI A, AWARA W, EL-MASRY T, EL-KOWRANY S, EL-GHARBAWY R. Effects and mechanism of action of immunomodulating agents against schistosomiasis-induced hepatic inflammation and fibrosis in mice. *Research In Pharmaceutical Biotechnology*, 3(4): 32-45; 2011.

FAIRFAX K, NASCIMENTO M, HUANG SC, EVERTS B, PEARCE EJ. Th2 responses in schistosomiasis. *Seminars in Immunopathology*, 4: 836-871; 2012.

FATURETO AC, CORREIA A, SILVA MBO, BARRA MFC, SILVAA AVS, TARQUINIO DC; PACHECO D, LIMA MAL. Nódulo pulmonar esquistossomótico simulando neoplasia: relato de caso. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 36; 2003.

FURUTA GF, ATKINS FD, LEE NA, LEE JL, Changing Roles of Eosinophils in Health and Disease. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 113(1): 3–8; 2014.

GAMA DC. Aspectos epidemiológicos e laboratoriais (eosinófilos e Ige total) em portadores de *Schistosoma mansoni* e Geohelminths. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, 2010.

GBD (Global Burden of Disease). Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national life expectancy, all-cause and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet*, 388: 1459-1544; 2016.

GERKEN SE. Efeitos da Alimentação e da Densidade Populacional sobre o Crescimento, a Sobrevivência e a Fecundidade de *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo horizonte. 1977.

GOBBI F, BUONFRATE D, ANGHEBEN A, BISOFFI Z. Restaging Pulmonary Schistosomiasis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 100 (5): 1049–1051; 2019.

GOBBI F, TAMAROZZI F, BUONFRATE D, LIESHOUT LV, BISOFFI Z, BOTTIEAU E. New Insights on Acute and Chronic Schistosomiasis: Do We Need a Redefinition? *Trends in Parasitology*, 8 (36): 660- 667; 2020.

GOBERT GN, CHAI M, MCMANUS DP. Biology of the schistosome lung-stage schistosomulu. *Parasitology*, 134: 453–460; 2007

GOMES ACL, GALINDO JM, LIMA NN, SILVA EVG. Prevalence and worm burden of Schistosomiasis mansoni before and after collective treatment in Jaboatão dos Guararapes, Pernambuco, Brazil. *Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25: 243-250; 2016.

GRAHAM BB, KUMAR R. Schistosomiasis and the pulmonary vasculature. *Pulmonary Circulation*, 4 (3) 352-362; 2014.

HAMS E, AVIELLO G, FALLON PG. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Frontiers in Immunology*, 4: 1-8; 2013.

HELMY AH, ABDEL-HADY AA, EL-SHANAWANY F, HAMMAM O, ABDEL-HADY A. The pharmacological approach to reverse portal hypertension and hepatic schistosomal fibrosis in Egypt, control experimental study. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*; 35: 731-750; 2005.

HEPWORTH D. Group 3 innate Lymphoid Cells: Communications Hubs of the intestinal immune System. *Frontiers in immunology*, 1(1): 1-12; 2017.

HOULDER EL, COSTAIN AH, COOK PC, MACDONALD AS. Schistosomes in the Lung: Immunobiology and Opportunity. *Frontiers in immunology*, 19; 2021

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR MEDICAL ASSISTANCE TO TRAVELLERS (IAMAT). Be Aware of Schistosomiasis. Disponível em: [https://www.iamat.org/assets/files/Be\\_Aware\\_of\\_Schistosomiasis\\_2015.pdf](https://www.iamat.org/assets/files/Be_Aware_of_Schistosomiasis_2015.pdf). Acesso em 19 de Fevereiro de 2020.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR MEDICAL ASSISTANCE TO TRAVELLERS (IAMAT). Be Aware of Schistosomiasis. Disponível em: [https://www.iamat.org/assets/files/World%20Schistosomiasis%20Risk%20Chart\\_2015.pdf](https://www.iamat.org/assets/files/World%20Schistosomiasis%20Risk%20Chart_2015.pdf). Acesso em 19 de Fevereiro de 2020.

JAUREGUIBERRY S, PARIS L, CAUMES E. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. *Clinical Microbiology and Infection*, 16: 3; 2010.

JENKINS-HOLICK DS, KAUL TL. Schistosomiasis. *Urologic Nursing Journal*, 33 (4): 163–170; 2013.

JOHNSTON RB, ORANGE JS, FELDWELG AM. An overview of the innate immune system. Disponível em: [https://www.uptodate.com/contents/an-overview-of-the-innate-immune-system?search=an-overview-of-the-innate-immune-&source=search\\_result&selectedTitle=1~150&usage\\_type=default&display\\_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/an-overview-of-the-innate-immune-system?search=an-overview-of-the-innate-immune-&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1). Acesso em 20 de Setembro de 2020.

JUNIOR DM, ARAÚJO JAP, CATELAN TTT, SOUZA AWS, CRUVINEL WM, ANDRADE LEC, SILVA NP. Fundamentos da resposta imunológica mediada por linfócitos T e B. *Rev Bras Reumatol*, 50 (5): 552-80; 2010.

KOLOSIONEK E, KING J, ROLLINSON D, SCHERMULY RT, GRIMMINGER F, GRAHAM BB, MORREL N, BUTROUS G. Schistosomiasis causes remodeling of pulmonary vessels in the lung in a heterogeneous localized manner: Detailed study. *Pulmonary Circulation*, 3(2): 356–362; 2013.

KNAFL D, GERGES C, KING CH, HUMBERT M, BUSTINDUY AL. Schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension: a systematic review. *The European Respiratory Journal*, 29: 1-12 ; 2020.

KUMAR R, MICKAEL C, CHABON J, GEBREAB L, RUTEBEMBERWA A, GARCIA ARG, KOYANAGI DE, SANDERS L, GANDJEVAA, KEARNS MT, BARTHEL L, JANSSEN WJ, MAUAD T, BANDEIRA A, SCHMIDT E, TUDER R, GRAHAM BB. The

Causal Role of IL-4 and IL-13 in *Schistosoma mansoni* Pulmonary Hypertension, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 192 (8): 998 - 1008; 2015.

KUNST H, MACK D, KON OM, BANERJEE AK, CHIODINI P, GRANTS A. Parasitic infections of the lung: a guide for the respiratory physician. *Thorax*, 66:528 – 536; 2011.

KNAFL D, GERGER C, KING CH, HUMBERT M, BUSTINDUY AL. Schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension: a systematic review. *European Respiratory Ver.*, 29 (155): 1-12; 2020.

KUMAR V, ABBAS AK, ASTER, JC. Robbins patologia básica. 10 ªed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018.

LAMBERTUCCI JR. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 105(4): 422-435; 2010.

NELWAN LM. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. *Current Therapeutic Research* 91: 5–9; 2019.

LIBERIO SA, PEREIRA AL, DUTRA RP, REIS AS, ARAÚJO MJ, MATTAR NS, SILVA LA, RIBEIRO MN, NASCIMENTO FR, GUERRA RN, MONTEIRO-NETO V. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Compl. Alternative Med.* 11 (1):108; 2011.

LINS RAB, CAVALCANTI CBL, ARAÚJO-FILHO JLSA, MELO-JUNIOR MR, CHAVES MECC. A distribuição dos eosinófilos nas diferentes fases de evolução do granuloma hepático em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 41(2): 173-178; 2008.

LOPES AJ, NORONHA AJ, MAFORT TT. Mecanismos de defesa do aparelho respiratório. *Brazilian journal of health and biomedical sciences*, 9 (2): 10-16; 2010.

LUNA LG. Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. 3 ed. New York: McGraw-Hill, 1968.

MACHADO PRL, CARVALHO L, ARAUJO MIAS, CARVALHO EM. Mecanismos de resposta imune às infecções. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 79(6): 647-664; 2004.

MACMANUS DP, DUNNE DW, SACKO M, UTZINGER J, VENNERVALD B, ZHOU XN. Schistosomiasis. *Nature Reviews*, 4(13): 1-19; 2018.

MARTINS FL, CARVALHO FLO, COSTA DM, RODRIGUES WPR, FRAGA FV, PARIS LRP, JUNIOR LRG, BUENO DMP, DAVID ML. Fatores de risco e possíveis causas de esquistossomose. *Revista Saúde em Foco*, 11: 396-404; 2019.

MCMANUS DP, BERGQUIST R, CAIL P, RANASINGHEL S, TEBEJE BM, YOU H. Schistosomiasis—from immunopathology to vaccines. *Seminars in Immunopathology*, 42 (3):355-371; 2020.

MALEK, EA. Snail hosts of Schistomiasis and other snail transmitted diseases in Tropical América: a manual. Scientific Publication, 478; 1985.

MARTINS FL, CARVALHO FLO, COSTA DM, RODRIGUES WP, FRAGA FV, PARIS LRP, JUNIOR LRG, BUENO DMP, DAVID ML. Fatores de riscos e possíveis causas da esquistossomose. *Revista Saúde em Foco*, 11: 296-404; 2019.

MAUAD T, POZZANB G, LANC T, OVERBEEK MJ, SOUZA R, JARDIM C, DOLHNIKOFF M, MELLOA G, PIRES-NETO RC, BERNARDI FDC, GRUNBERG K. Immunopathological aspects of schistosomiasis-associated pulmonar arterial hypertension. *Journal of Infection*, 68 (1): 90-98; 2014.

MELO AGS, MELO JJ, JERALDO VLS, MELO CM. Esquistossomose mansônica em famílias de trabalhadores da pesca de área endêmica de Alagoas. *Anna Nery School Journal*, 23; 2019.

MENDES DM, CAMARGO MF, AUN VV, FERNANDES MFM, AUND WT, MELLO JF. Eosinofilia. *A Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.*, 23(2):84-91; 2000.

MENDES RJA. Análise temporal e espacial da esquistossomose mansoni no estado do Maranhão no período de 2007 a 2016. 78f. (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão, 2019.

MICKAEL CS, GRAHAM BB. The Role of Type 2 Inflammation in Schistosoma-Induced Pulmonary Hypertension. *Frontiers in Immunology*, 10 (27): 1-7; 2019.

MIRANDA GS, RODRIGUES JGM, LIRA MGS, NOGUEIRA RA, GOMES GCC, SILVA-SOUZA N. Monitoring positivity for *Schistosoma mansoni* in rodents *Holochilus* sp. naturally infected. *Ciência Animal Brasileira*, 16 (3): 456–463; 2015.

MORAES VS, SHOLLENBERGER LM, SIQUEIRA LMV, BORGES WC, HARN DA, QUEIROZ E GRENFELL RF, RABELLO ALT, COELHO MZ. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas? *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, 114: 1-12; 2019.

MURITZ A, LEVI-SCHAFFER F. Eosinophils: ‘new’ roles for ‘old’ cells. *Allergy*, 59: 268–275; 2004.

NELWAN ML. Schistosomiasis: Life Cycle, Diagnosis, and Control. *Current Therapeutic Research*. 91: 5 -9; 2019.

NIEMANN T, MARTI HP, DUHNSEN SH, BONGARTZ G. Pulmonary Schistosomiasis – Imaging Features. *Thoracic Radiology*, 4(9): 37-43; 2010.

NOYA O, KATZ N, POINTIER JP, THERON A, DE NOYA BA. Schistosomiasis in America. In *Neglected Tropical Diseases-Latin America and the Caribbean*, 11-43. Springer; 2015.

OLIVEIRA VG. Participação de eosinófilos na evolução da infecção experimental por *S. mansoni* em camundongos. 89ff. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2016.

PAPAMATHEAKIS DG, MOCUMBI AOH, KIM NH, MANDEL J. Schistosomiasis-associated pulmonary hypertension. *Pulmonary Circulation*, 4 (4): 596-611; 2014.

PEARCE EJ; KANE CM, SUN J, TAYLOR JJ, MCKEE AS, CERVI L. Th2 response polarization during infection with the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. *Immunological Reviews*, 201: 117-126; 2004.

PEARCE EJ, MACDONALD AS. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature Reviews Immunology*, 2: 499-511; 2002.

REIMERT CM, FITZSIMMONS CM, JOSEPH S, MWATHA JK, JONES FM, KIMANI G, HOFFMANN KF, BOOTH M, KABATEREINE NB, DUNNE DW, VENNERVALD BJ. Atividade de eosinófilos em infecções por *Schistosoma mansoni* in vivo e in vitro em relação ao perfil de citocinas plasmáticas Pré e Pós-tratamento com Praziquantel. *Clinical e vaccine immunology*, 13(5): 584-593; 2006.

PELLEGRINO J, KATZ N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *Advances in Parasitology*, 6: 233-90; 1968.

PORDEUS LC, AGUIAR LR, QUININO LRM, BARBOSA CS. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. *A Revista Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 17(3):163-175; 2008.

RAMOS JA. Ações da dexametasona nas fases aguda e crônica da infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 em camundongos isogênicos e não isogênicos. 143ff. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

RASO P, ANDRADE FILHO JS. Esquistossomose mansoni: formas hepatoesplênica, cardiovascular e miliar crônica associadas. *Revista médica de Minas Gerais*, 24: 404-408; 2014.

RAVIN KA, LOY M. The Eosinophil in Infection. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*. 50:214–227; 2016.

REDPATH SA, VAN DER WERF N, MACDONALD AS, MAIZELS RM, TAYLOR MD. *Schistosoma mansoni* Larvae Do Not Expand or Activate Foxp3+ Regulatory T Cells during Their Migratory Phase. 1. *American Society for Microbiology Journals*, 83 (10); 3881-3889, 2015.

ROCHA TJM, CALHEIROS CML, SANTOS MCS, WANDERLEY FS, LIMA MVM. Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 7: 27-32; 2016.

RODRIGUES GC, LACERDA DC, GUSMAO ES, COLARES FA, MOTA VT. Forma pseudoneoplásica de esquistossomose pulmonar crônica sem hipertensão pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, 35(5): 484-488; 2009.

RODRIGUES JGM. Avaliação do efeito anti-esquistossomótico e imunomodulador de *Dysphania ambrosioides* (L.) MOSYAKIN & CLEMANTS em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907. 112ff. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, 2019.

- RODRIGUES JGM, ALBUQUERQUE PSV, NASCIMENTO JR, CAMPOS JAV, GODINHO ASS, ARAUJO SJ, BRITO JM, JESUS CM, MIRANDA GS, REZENDE MC, NEGRÃO-CORREA DA, ROCHA CQ, SILVA LA, GUERRA RNM, NASCIMENTO FRF. The immunomodulatory activity of *Chenopodium ambrosioides* reduces the parasite burden and hepatic granulomatous inflammation in *Schistosoma mansoni*-infection. *Journal of Ethnopharmacology*, 264: 1-14; 2021.
- ROFFBRAND AV, MOSS PHA. Fundamentos em hematologia. 6º ed. Rio Grande do Sul: Artmed; 2013.
- ROITT IM, DELVES PJ, MARTIN SJ, BURTON DR, IVAN M. ROITT. Fundamentos de imunologia. 13ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018.
- RUTITZKY LI, LOPES DA ROSA JR, STADECKER MJ. Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *Journal of Immunology*, 175: 3920–3926; 2005.
- RUTITZKY LI, STADECKER MJ. Exacerbated egg-induced immunopathology in murine *Schistosoma mansoni* infection is primarily mediated by IL-17 and restrained by IFN-gamma. *European Journal of Immunology*, 41: 2677–2687; 2011.
- SCHWARTZ E. Pulmonary schistosomiasis. *Clinics in chest medicine*, 23 (2): 433–443; 2002.
- SCHWARTZ C, FALLON PG. *Schistosoma* “Eggs-Itting” the Host: Granuloma Formation and Egg Excretion. *Frontiers in Immunology*, 9: 1-16; 2018.
- SHEBEL H, ELSAYES K, ELGUINDY Y. Genitourinary Schistosomiasis: Life Cycle and Radiologic-Pathologic Findings. *Radiographics*, 32(4): 1031-1046; 2012.
- SCUTTI J. Fundamentos da imunologia. 1ª ed. São Paulo: Editora Rideel, 2016.
- SHIELS J, Cwiklinski K, ALVARADO R, THIVIERGE K, COTTON S, SANTANA BG, TO J, DONNELLY S, TAGGART C, WELDON S, DALTON JP. *Schistosoma mansoni* immunomodulatory molecule Sm16/SPO-1/SmSLP is a member of the trematode-specific helminth defence molecules (HDMs). *Plos Neglected Tropical Diseases*; 9; 2020.
- SILVA CR. Dicionário ilustrado de saúde. 6ª ed. São Paulo: YEN – YENDIS, 2011.
- SILVA LF, NUNES BEBR, LEAL TC, PAIVA JPS, LEMOS AMS, ARAÚJO LMM, ARAÚJO MDP, MACHADO MF, FRAGA CAC, DE SOUZA CDF. Schistosomiasis mansoni in the northeast region of Brazil: temporal modeling of positivity, hospitalization, and mortality rates. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 52: 1-6; 2019.
- SIMÕES LF, BASTOSA LDB, CAMARGO EAF, NEVES MF, LINHARES AX, MAGALHÃES LA, MAGALHÃES Z. Host-parasite relationship between *Biomphalaria* amazônica and *Schistosoma mansoni*. *Brazilian Journal of Biology*, 77: 340-346; 2017.
- SIMON HU, YOUSEFI S, GERMIC N, ARNOLD IC, HACZHU A, KARAULOV AV, SIMEN D, ROSENBERG HF. The Cellular Functions of Eosinophils: Collegium Internationale Allergologicum (CIA) Update 2020. *Int Arch Allergy Immunol*. 181:11–23; 2020.

SMITHERS SR, TERRY RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology*, 55(4): 695-700; 1965.

SMITS HH, HAMMAD H, NIMWEGEN MV, SOULLIE T, WILLART MA, LIEVERS E, KADOUCHE J, KOOL M, OOSTERHOUD JK, DEELDER AM, LAMBRECHT B N, YAZDANBAKHSH M. Protective effect of *Schistosoma mansoni* infection on allergic airway inflammation depends on the intensity and chronicity of infection. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (4): 932-940; 2007

SOUZA FPCS, VITORINO RR, COSTA AP, FARIA JUNIOR FC, SANTANA LA, GOMES AP. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. *Revista Brasileira de Clínica Médica*, 9(4): 300-307; 2011.

THANCHOMNANG T, INTAPAN P, SRI-AROON P, LULITANOND V, JANWAN P, SANPOOL O, MALEEWONG W. Molecular detection of *Schistosoma japonicum* in infected snails and mouse faeces using a real-time PCR assay with FRET hybridisation probes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106: 831-836; 2011.

VIDAL MRFS, BARBOSA Jr AA, ANDRADE ZA. Experimental pulmonary schistosomiasis: Lack of morphological evidence of modulation in schistosomal pulmonary granulomas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35 (5): 423-429; 1993.

VEIGA-BORGEAUD T, LEMOS-NETO RC, PETER F, BASTOS OC. Constatações sobre a importância dos roedores silvestres (*Holochilus brasiliensis nanus*. Thomas, 1981) na epidemiologia da esquistossomose própria da Pré-Amazônia. *Caderno de Pesquisa*, 2 (1): 86-99; 1986.

VERONESI R, FOCACCIA R. Tratado de infectologia. 5ª ed. São Paulo: Atheneu; 2015.

WANG L, WU X, LI X, ZHENG X, WANG F, QI Z, HUANG M, ZOU Y. Imported Schistosomiasis: A New Public Health Challenge for China. *Frontiers in Medicine*, 7: 1-9; 2020.

WEERAKOON KGAD, GOBERT GNG, CAI P, MACMANUS DP. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, 28 (4): 939-967; 2015.

WEISSLER JC. Eosinophilic Lung Disease. *The American Journal of the Medical Sciences*. 17: 1-25; 2017.

WELLER PF, MAHONEY DH, ROSMARIN AG. Eosinophil biology and causes of eosinophilia. Disponível em: <https://www.uptodate.com/contents/eosinophil-biology-and-causes-of-eosinophilia>. Acesso em 23 de Setembro de 2020

WEN X, HE L, CHI Y, ZHOU S, HOELLWARTH J, ZHANG C, ZHU J, WU C, DHESI S, WANG X, LIU F, SU C. Dynamics of Th17 cells and their role in *Schistosoma japonicum* infection in C57BL/6 mice. *PLoS Negl Trop Dis*, 5 (11): 1-13; 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 16 de Fevereiro de 2020.

YOUSELF AF, ISHAQ MS. Chronic Pulmonary Granulomatous Schistosomiasis with an Atypical Presentation. *E-Cronicon Pulmonology and Respiratory Medicine*, 8 (3): 227-231; 2019.

ZHANG P, MUTAPI F. IgE: a key Antibody in *Schistosoma* Infection. *Electronic Journal of Biology*, 2 (1): 11-14; 2006.

ZHENG B, MILLER H, GONG Q, LIU C. T Lymphocyte-Mediated Liver Immunopathology of Schistosomiasis. *Frontiers in Immunology*, 11 (61): 1-13; 2020.

## ANEXOS

## ANEXO A - Declaração do comitê de Ética

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                      |                                                                                     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | <p align="center"><b>UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO</b><br/> <b>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA</b><br/> <b>CIAEP: 02.0341.2019</b></p> |  |
| <p align="right">Comissão de Ética no Uso de Animais</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                      |                                                                                     |
| <p align="center"><b>CERTIFICADO</b> <span style="float: right;">*09/2020*</span></p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |                                                                                                                                                      |                                                                                     |
| <p>Certificamos que a proposta intitulada: <b>"INVESTIGAÇÃO PARASITOLÓGICA E IMUNOLÓGICA EM CAMUNDONGOS INFECTADOS POR <i>Schistosoma mansoni</i> SAMBON, 1907"</b>, Processo n. 23115.002254/2020-18, sob a responsabilidade do <b>Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento</b>, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado <b>APROVADO</b> pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão, na reunião realizada em 21/02/2020.</p> |                                                                                                                                                      |                                                                                     |
| <p>We certify that the proposal: <b>"PARASITOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL INVESTIGATION IN INFECTED MICE BY <i>Schistosoma mansoni</i> SAMBON, 1907"</b>, Process n. 23115.002254/2020-18, under the responsibility of <b>Prof. Dr. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento</b>, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, sub phylum Vertebrata (except humans beings) for scientific research purposes (or teaching) - is in accordance with Law No. 11,794, of October 8, 2008, Decree No. 6.899, of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was <b>APPROVED</b> by the Ethics Committee on Animals Use of the Federal University of Maranhão (CEUA - UFMA), in meeting of 02/21/2020.</p>                                         |                                                                                                                                                      |                                                                                     |
| <p align="center"><b>Finalidade da Proposta:</b> Pesquisa      <b>Área:</b> Ciências da Saúde</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                      |                                                                                     |
| <p align="center"><b>Vigência da Proposta:</b> 01/08/2020 à 01/08/2024.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                      |                                                                                     |
| <b>Origem</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão                                                                                                 |                                                                                     |
| <b>Espécie</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>Camundongos</b><br><i>Mus musculus</i>                                                                                                            | <b>Sexo</b> Macho<br><b>Idade</b> 60 a 90 dias<br><b>Peso</b> 20-25g                |
|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                      | <b>Amostra</b><br><br><b>316</b>                                                    |
| <p><b>Linhagem/Raça:</b> Swiss</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |                                                                                                                                                      |                                                                                     |
| <p><b>Local do experimento:</b> Biotério Setorial da Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS/UFMA.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |                                                                                                                                                      |                                                                                     |
| <p align="right">São Luís, 28 de abril de 2020.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                      |                                                                                     |
| <p align="center"> <br/> <b>Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho</b><br/>         Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais - CEUA/UFMA       </p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |                                                                                                                                                      |                                                                                     |