

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**AVALIAÇÃO DO USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ASSOCIADAS AO
PRAZQUANTEL NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMOSE
MANSONI EXPERIMENTAL**

por

VITOR HUGO SIMÕES MIRANDA

**Belo Horizonte
2020**

TESE

DSC – IRR

V. H. S. MIRANDA

2020

VITOR HUGO SIMÕES MIRANDA

**AVALIAÇÃO DO USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ASSOCIADAS AO
PRAZIQUANTEL NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMOSE
MANSONI EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dr. Rodrigo Corrêa de Oliveira
Coorientação: Dra. Adriana Bozzi e Dra. Érica Alessandra Rocha Alves

Belo Horizonte

2020

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

M672a Miranda, Vitor Hugo Simões.
2020

Avaliação do uso de células-tronco mesenquimais associadas ao praziquantel no controle da inflamação hepática na esquistossomose mansoni experimental / Vitor Hugo Simões Miranda – Belo Horizonte, 2020.

XVII, 110 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 93-103

Tese (doutorado) – Tese para obtenção do título de Doutor em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

1. Células-tronco mesenquimais 2. Granuloma 3. Inflamação hepática I. Título. II. Oliveira, Rodrigo Corrêa (Orientação). III. Bozzi, Adriana (Coorientação). IV. Alves, Érica Alessandra Rocha (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

VITOR HUGO SIMÕES MIRANDA

**AVALIAÇÃO DO USO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS ASSOCIADAS
AO PRAZQUANTEL NO CONTROLE DA INFLAMAÇÃO HEPÁTICA
NA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências na área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Banca Examinadora:

Dr. Rodrigo Corrêa de Oliveira	IRR – FIOCRUZ MINAS (Orientador/Presidente)
Dr ^a . Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal	IRR – FIOCRUZ MINAS (Titular)
Dr ^a . Roberta Oliveira Prado	IRR – FIOCRUZ MINAS (Titular)
Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula	UNIMONTES (Titular)
Dr ^a . Amanda Maria Sena Reis	UFMG (Titular)
Dr ^a . Kelly Alves Bicalho Carvalho	IRR – FIOCRUZ MINAS (Suplente)

Tese defendida e aprovada em Belo Horizonte, 02/03/2020

Dedico ao meu amado Jesus por sua graça e misericórdia que me sustentam e capacitam para toda boa obra. A minha esposa maravilhosa e aos meus preciosos familiares por terem sonhado comigo os meus sonhos, comemorado minhas vitórias e tornado meus insucessos ao longo desta vida mais amenos.

AGRADECIMENTOS

À Jesus Cristo, minha Rocha de Salvação. Aquele que me toma pela mão direita, ajuda e sustenta todos os dias. O meu maravilhoso criador que por sua graça e misericórdia me salvou e tem permitido viver bênçãos que eu jamais havia imaginado. Tudo vêm de Ti Senhor e rendo todo o louvor, honra e glória a Ti!

À minha amada esposa Dayanne, minha melhor companhia, amiga e conselheira. Seu amor é a minha energia, meu motor. Como fico deslumbrado com a sua beleza, sabedoria, honestidade, companheirismo, carinho e cuidado. Como sou grato a Deus pela bênção de passar todos os dias ao seu lado. Obrigado por me apoiar incondicionalmente em mais essa conquista de nossa família.

Aos meus pais Eustáquio e Ildéia, meu maior exemplo de esforço, abnegação e dedicação à família.

Aos meus irmãos Thiago e Fabrício, minhas cunhadas Cristiane e Karla, e minhas sobrinhas Yasmin, Livia e Laura pela amizade e por sempre me apoiarem.

À minha família, em especial a minha avó Luiza e minha tia Idelma pelos momentos de alegria e palavras de incentivo.

À Dra. Adriana Bozzi, uma pessoa incrível e alegre que nestes 9 anos em que convivemos me ensinou com muita boa vontade e esforço. Orientou-me e ajudou a ser um estagiário, mestre e agora doutor. Ensinou-me também a nunca desistir dos meus sonhos. Você nunca desacreditou de mim e sou muito grato por isso. Mostrou-me que as dificuldades que enfrentamos na vida podem nos tornar pessoas melhores se decidirmos enxergá-las como uma oportunidade para que a nossa alma e caráter sejam moldados.

À Dra. Érica Alessandra Rocha Alves, uma das pessoas mais incríveis que já conheci. Obrigado por toda dedicação e boa vontade em ensinar e direcionar. Sua inteligência é admirável e sua perseverança uma inspiração.

Ao Dr. Rodrigo Corrêa Oliveira por todo apoio, ensinamentos e orientação. Obrigado pela oportunidade de ser aluno do ICM todos esses anos.

Ao Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier pelo exemplo, aprendizado, inspiração e colaboração.

À Dra. Jaqueline Germano de Oliveira pela colaboração e pelo exemplo de pessoa inteligente, humilde e bondosa.

Aos pesquisadores do ICM: Carlos Eduardo Calzavara, Soraya Gaze, Jacqueline Fiuzza e Rafael Assis pela colaboração e convivência agradável.

À Dra. Andréa Teixeira e Dra. Rogéria Serakides por toda a contribuição e bons conselhos dados no exame de qualificação.

Às “Meninas da Vacina” Fernanda, Estela, Ana Raquel, Heloísa, Luciane, Roberta, Stella, Simone, Cássia e Renata por toda ajuda, incentivo, conselhos, conversas e brincadeiras que deixaram os dias mais leves.

Aos meus amigos Anna Carolina, Izabella Andrade, Emerson de Castro, Jorge Ferreira, Stella Colombaroli e Priscila De Cássia Da Silva pelo companheirismo, paciência e aprendizado.

Aos colegas da Pós-Graduação, especialmente Eneida e Camila.

Às alunas de iniciação científica do ICM Michelle, Larissa, Tamiris, Bruna, Karol e Sarah. Em especial minha aluna Cibele Bozzi que com muita dedicação, profissionalismo e proatividade contribuíram para a elaboração deste trabalho.

Aos técnicos do ICM e laboratório de Anatomia Patológica: Luciana Lisboa, Vinícius Paz e Fernanda Césari.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto René Rachou e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde pela oportunidade e infraestrutura.

À Biblioteca do IRR por fornecer acesso à informação técnico-científica e pela catalogação e normalização desta tese, obrigado.

Aos funcionários do IRR que, de alguma forma, tornaram possível a realização deste trabalho, obrigado.

À Comissão de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da bolsa de doutorado.

Ao Departamento de Anatomia Patológica da FM-UFMG pela cooperação e disposição em ajudar.

Ao Laboratório de Patologia Molecular da FM-UFMG por todo apoio.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTM) ganharam atenção significativa no tratamento de diversas patologias devido a sua plasticidade, principalmente efetiva no reparo tecidual e controle da resposta inflamatória. O estudo dessas células no tratamento de enfermidades agravadas pela inflamação tem crescido ao longo dos anos. Neste trabalho investigamos o uso das CTM provenientes do tecido adiposo (CTM-TA) no controle da inflamação decorrente da esquistossomose mansoni, uma das doenças mais negligenciadas no mundo. Atualmente, o praziquantel (PZQ) é eficaz para tratar a esquistossomose. Contudo, reações granulomatosas aos ovos retidos no fígado podem persistir por meses ou anos, retardando a recuperação do paciente. Intervenções terapêuticas capazes de modular a reação granulomatosa poderiam reduzir significativas lesões hepáticas e acelerar a recuperação de órgãos acometidos pelo *S. mansoni*. Neste estudo, analisamos um protocolo terapêutico tratando camundongos C57BL/6 com uma dose única de PZQ via oral e, após 30 dias, uma dose única de CTM-TA, via intravenosa. A eficácia da terapêutica combinada foi avaliada após 8 e 15 dias da injeção de CTM-TA por meio de análises imunológicas e morfofisiológicas do fígado. Nossos experimentos mostraram após 15 dias da injeção de CTM-TA: 1- redução significativa do número e tamanho dos granulomas hepáticos; 2- baixa variabilidade celular dos granulomas; 3- redução significativa dos danos no fígado medidos pelos níveis de alanina aminotransferase (ALT). Em conjunto, os resultados confirmaram a hipótese deste estudo: “as CTM-TA associadas ao PZQ podem reduzir a reação granulomatosa promovendo melhor recuperação morfofisiológica hepática”. Assim, nosso estudo suporta o uso de CTM em associação ao PZQ para o tratamento da morbidade na esquistossomose mansoni e motivam a avaliação dessas células para novas abordagens terapêuticas em outras doenças infecciosas e parasitárias, bem como distúrbios hepáticos.

Palavra-chave: células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTM-TA), granuloma, esquistossomose mansoni, inflamação hepática.

ABSTRACT

The mesenchymal stem cells (MSC) have been considered useful to the treatment of several pathologies due to its plasticity, mainly effective on tissue repair and to control of the inflammatory response. Moreover, the role of MSC in the treatment of illnesses aggravated by exacerbated inflammation processes has been studied over the years. In this study, we investigated the use of adipose tissue derived stem cells (ASC) to control the inflammation in schistosomiasis mansoni. Nowadays, the drug praziquantel (PZQ) is effectively used to treat the schistosomiasis. However, the granulomatous reactions to the eggs retained in the liver can persist for months or years, retarding the patient's recovery. Additional therapeutic interventions able to modulate the granulomatous reaction would reduce significant liver damage and to accelerate the recovery of organs affected by *S. mansoni*. Here, we analyzed a therapeutic protocol treating C57BL/6 mice with a single oral dose of PZQ and, after 30 days, a single intravenous dose of ASC. The efficacy of this associated therapy was evaluated 8 and 15 days after the ASC injection by immunological and morphophysiological analyzes of the liver. Our experiments shown, 15 days after the ASC injection: 1- a significant reduction in the number and size of liver granulomas; 2- low cell variability of granulomas, and; 3- a significant reduction of liver damage as measured by ALT levels. Taken together, the results confirmed the hypothesis of this study: "After parasitic control, ASC combined to PZQ can reduce the granulomatous reaction, promoting a better hepatic morphophysiological recovery". Thus, our study supports the use of MSC in association with PZQ for the treatment of schistosomiasis mansoni morbidity and would stimulate the evaluation of these cells as new therapeutic strategy to treat other infectious and parasitic diseases, as well as liver disorders.

Keywords: adipose tissue derived stem cells, granuloma, schistosomiasis mansoni, hepatic inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Migração transendotelial de CTM.....	19
Figura 2	Efeitos da administração sistêmica de CTM.....	21
Figura 3	Modelo de sensor e comutador de CTM.....	22
Figura 4	Diagrama esquemático representando o procedimento de lipoaspiração e a obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo.....	23
Figura 5	Sistema porta-hepático-mesentérico infectado por <i>S. mansoni</i>	27
Figura 6	Indução das respostas Th1 e Th2 e desenvolvimento de células T reguladoras após infecção pelo <i>S. mansoni</i>	30
Figura 7	Estratégia de trabalho para o desenvolvimento do projeto.....	37
Figura 8	Diagrama dos grupos de animais convencionais.....	43
Figura 9	Diagrama dos grupos de animais SPF.....	44
Figura 10	Representação esquemática das fases e composição celular do granuloma.....	47
Figura 11	Estratégia de análise dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺	51
Figura 12	Caracterização fenotípica e funcional de células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTM-TA).....	55
Figura 13	Rastreamento de CTM tdTomato ⁺ nos pulmões.....	57
Figura 14	Rastreamento de CTM tdTomato ⁺ no fígado.....	58
Figura 15	Peso total do fígado, número de vermes recuperados e viabilidade dos ovos encontrados no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por <i>S. mansoni</i> tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo.....	60
Figura 16	Análise do número de granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por <i>S. mansoni</i> tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo.....	61
Figura 17	Análise da fase e composição celular dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por <i>S. mansoni</i> tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido	

	adiposo.....	62
Figura 18	Análise da deposição de colágeno em granuloma no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por <i>S. mansoni</i> tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo.....	63
Figura 19	Perfil de ativação dos linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no baço.....	64
Figura 20	Dosagem dos níveis séricos de citocinas em animais convencionais no tempo de 15 dias após terapêutica com CTM.....	65
Figura 21	Dosagem dos níveis séricos de citocinas em camundongos SPF nos tempos de 8 e 15 dias após terapêutica com CTM.....	67
Figura 22	Dosagem dos níveis de citocinas <i>in situ</i> (fígado) nos tempos de 8 e 15 dias após terapêutica com CTM.....	69
Figura 23	Dosagem dos níveis de óxido nítrico.....	70
Figura 24	Dosagem dos níveis séricos de albumina, bilirrubina e ALT.....	71
Figura 25	Comparação da dosagem dos níveis séricos de ALT entre animais convencionais e animais SPF.....	72
Figura 26	Comparação do número e tamanho dos granulomas entre animais convencionais e animais SPF.....	73
Figura 27	Comparação da dosagem dos níveis séricos de citocinas entre animais convencionais e SPF.....	75
Figura 28	Limiares de corte usados para segregar indivíduos de acordo com níveis baixos ou altos de citocinas séricas.....	77
Figura 29	Rede de citocinas dos camundongos convencionais e SPF.....	79
Figura 30	Resumo gráfico dos resultados preliminares da terapêutica de PZQ associado as CTM.....	81

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Anticorpos utilizados para caracterização de CTM-TA para análise por citometria de fluxo.....	40
Tabela 2	Anticorpos utilizados para marcação dos esplenócitos para análise por citometria de fluxo.....	49
Tabela 3	Kits utilizados para as análises bioquímicas do soro de camundongos.....	53
Tabela 4	Sumário dos resultados. Efeito do tratamento com CTM na esquistossomose experimental.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADM	Adrenomedulina
Alb	Albumina
ALT	Alanina aminotransferase
APC	Aloficocianina
APC-Cy7	Aloficocianina combinado ao corante de cianina
BT	Bilirrubina total
CBA	“ <i>Cytometric Bead Array</i> ”
CD	Grupo de diferenciação (do inglês: <i>cluster of differentiation</i>)
CEH	Célula estrelada hepática
CTE	Célula-tronco embrionária
CTH	Célula-tronco hematopoiética
CTLA-4	Antígeno 4 associado a linfócitos T citotóxicos (do inglês: <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4</i>)
CTM	Célula-tronco mesenquimal
CTM-TA	Célula-tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo
DC	Células dendríticas (do inglês: <i>dendritic cells</i>)
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco (do inglês: <i>Dulbecco's modified eagle medium</i>)
DO	Densidade ótica
DEVH	Doença do enxerto <i>versus</i> hospedeiro
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético (do inglês: <i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
bFGF	Fator básico para crescimento de fibroblasto (do inglês: <i>basic fibroblast growth factor</i>)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (do inglês: <i>fluorescein isothiocyanate</i>)
FSC	Fator de células-tronco (do inglês: <i>factor stem cell</i>)
FVE	Fração vascular do estroma
x g	Força centrífuga
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (do inglês: <i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>)
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos (do inglês: <i>hepatocyte growth</i>

	<i>factor</i>)
HLA	Antígeno de histocompatibilidade de linfócitos (do inglês: <i>human leukocyte antigen</i>)
IDO	Indoleamina 2,3 dioxigenase
IFN- γ	Interferon gama
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina 1 (do inglês: (<i>insulin-like growth factor 1</i>))
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase indutível (do inglês: <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
L.E.	Luiz Evangelista
LIF	Fator inibidor de leucemia (do inglês: <i>leukemia inhibiting factor</i>)
iPSC	Célula-tronco de pluripotência induzida (do inglês: <i>induced pluripotent stem cell</i>)
MCP-1	Proteína 1 quimioatrativa de monócitos (do inglês: <i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
M-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos (do inglês: <i>macrophage colony-stimulating factor</i>)
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês: <i>major histocompatibility complex</i>)
NK	" <i>Natural killer cell</i> "
NKT	" <i>Natural killer T cell</i> "
NO	Óxido nítrico (do inglês: <i>nitric oxide</i>)
OCT	" <i>Cutting Temperature compound</i> "
PBS	Salina tamponada com fosfato (do inglês: <i>phosphate buffer saline</i>)
PE	Ficoeritrina (do inglês: <i>phycoerythrin</i>)
PGE2	Prostaglandina E2
PZQ	Praziquantel
SDF 1	Fator 1 derivado das células estromais (do inglês: <i>stromal cell-derived factor 1</i>)
SEA	Antígeno solúvel de ovos (do inglês: <i>soluble egg antigen</i>)
SFB	Soro fetal bovino
SDS	Dodecil sulfato de sódio (do inglês: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SPF	Livre de patógenos específicos (do inglês: <i>specific-pathogen-free</i>)

SWAP	Substâncias antigênicas do verme adulto (do inglês: <i>soluble antigen adult worm preparation</i>)
TCR	Receptor de células T (do inglês: <i>T cell receptor</i>)
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta (do inglês: <i>transforming growth factor beta</i>)
Th1	Linfócito T auxiliar do tipo 1 (do inglês: <i>T helper 1</i>)
Th2	Linfócito T auxiliar do tipo 2 (do inglês: <i>T helper 2</i>)
Th17	Linfócito T auxiliar do tipo 17 (do inglês: <i>T helper 17</i>)
THO	Transplante hepático ortotópico
TLR	Receptor do tipo Toll (do inglês: <i>toll-like receptor</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa (do inglês: <i>tumor necrosis factor alpha</i>)
T _{REG}	Linfócito T regulador
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular (do inglês: <i>vascular endothelial growth factor</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 Aspectos gerais das células-tronco mesenquimais.....	18
1.2 Células-tronco mesenquimais e interações com o sistema imune.....	20
1.3 Potencial terapêutico das CTM	23
1.4 Aspectos gerais da esquistossomose mansoni.....	26
1.5 Resposta imune na esquistossomose mansoni	29
2 JUSTIFICATIVA	34
3 OBJETIVO GERAL	35
3.1 Objetivos Específicos.....	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1 Estratégia experimental	36
4.2 Animais	38
4.3 Extração e cultivo de CTM-TA	38
4.4 Ensaio de viabilidade	39
4.5 Caracterização fenotípica das CTM-TA	39
4.6 Diferenciação osteogênica.....	41
4.7 Diferenciação adipogênica.....	41
4.8 Diferenciação condrogênica.....	42
4.9 Infecção experimental e tratamento dos animais.....	42
4.10 Avaliação da biodistribuição das células-tronco mesenquimais tdTomato ⁺ ...	44
4.11 Análise histopatológica	45
4.12 Citometria de Fluxo	48
4.13 Detecção de citocinas	52
4.14 Análise dos níveis séricos de óxido nítrico.....	52
4.15 Análises bioquímicas	53
4.16 Análises estatísticas.....	53
5 RESULTADOS	54
5.1 As células isoladas do tecido adiposo inguinal eram células-tronco mesenquimais.....	54
5.2 Células-tronco mesenquimais tdTomato ⁺ foram encontradas nos pulmões e no fígado.....	56

5.3 O tratamento com células-tronco mesenquimais não alterou o peso, percentual de ovos viáveis do fígado e a carga parasitária em relação ao grupo praziquantel	59
5.4 O tratamento com células-tronco mesenquimais reduziu o número de granulomas hepáticos em relação ao grupo não tratado	61
5.5 O tratamento com células-tronco mesenquimais promoveu uma involução mais rápida dos granulomas.....	61
5.6 O tratamento com células-tronco mesenquimais não alterou a deposição de colágeno nos granulomas em relação ao grupo praziquantel.....	62
5.7 O tratamento com células-tronco mesenquimais aumentou a frequência de linfócitos T CD4 ⁺ /CD28 ⁺ em relação ao grupo não tratado, mas não alterou a ativação dos linfócitos T CD8 ⁺ em relação ao grupo praziquantel	63
5.8 O tratamento com células-tronco mesenquimais não alterou os níveis séricos de citocinas em relação ao grupo praziquantel.....	65
5.9 O tratamento com células-tronco mesenquimais aumentou os níveis <i>in situ</i> de IL-10 e IL-2 no tempo de 8 dias e aumentou os níveis <i>in situ</i> de IL-10 e IL-17 α no tempo de 15 dias em relação ao PZQ.....	66
5.10 O tratamento com células-tronco mesenquimais reduziu os níveis séricos de TNF- α e IL-6, no tempo de 15 dias, em relação ao grupo não tratado	68
5.11 O tratamento com células-tronco mesenquimais não alterou os níveis séricos de óxido nítrico nos tempos avaliados	70
5.12 O tratamento com células-tronco mesenquimais não alterou os níveis séricos de Alb, BT e ALT em relação ao grupo praziquantel nos tempos avaliados	70
5.13 Após o tratamento com PZQ, animais SPF apresentaram menor nível sérico de ALT quando comparado aos camundongos convencionais.....	72
5.14 Animais SPF do grupo PZQ/CTM apresentaram granulomas com maior tamanho do que os convencionais do mesmo grupo	73
5.15 Os animais SPF do grupo PZQ/CTM apresentaram níveis reduzidos de TNF- α , IL-6, IL-17- α , IL-4 e IL-10	74
5.16 Houve maior frequência de altos produtores de citocinas entre os animais saudáveis convencionais do que entre os camundongos SPF	75
6 DISCUSSÃO	82
7 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
ANEXOS	110
Anexo 1.1	110
Anexo 1.2	110

Anexo 1.3	111
------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais das células-tronco mesenquimais

Todas as células-tronco são definidas por terem duas propriedades básicas: capacidade de auto-renovação e o potencial de diferenciação em um ou mais tipos de células especializadas (CAPLAN, 1991). Elas estão presentes desde o desenvolvimento embrionário e persistem no indivíduo adulto. Classificam-se, de acordo com o seu potencial de desenvolvimento, em três grupos principais: totipotentes (capazes de dar origem a todos os tipos de células embrionárias e extra-embrionárias), pluripotentes (capazes de dar origem a todos os tipos de células do embrião propriamente dito) e multipotentes (capazes de dar origem a um subconjunto de linhagens de células), além das células oligo e unipotentes (capazes de dar origem ou repor células de um órgão e/ou tecido) (WAGERS & WEISSMAN, 2004). As células-tronco podem, ainda, ser agrupadas em células-tronco embrionárias (CTE), representadas pelas células pluripotentes, ou células-tronco adultas, que inclui as células multipotentes, oligo e unipotentes. Células-tronco adultas dividem-se em células-tronco hematopoiéticas (CTH) e células-tronco mesenquimais (CTM) (BIANCO *et al.*, 2008; YU & THOMSON, 2008). Um novo tipo de célula-tronco foi introduzido pelo homem por meio da reprogramação de células adultas terminantemente diferenciadas. A entrega de 4 fatores de transcrição (oct-4, sox-2, klf-4 e c-Myc) foram suficientes para converter fibroblastos adultos de camundongos em células pluripotentes capazes de produzir teratomas *in vivo* (TAKAHASHI & YAMANAKA, 2006). Essas células são denominadas células-tronco de pluripotência induzida (iPSC).

As CTM caracterizam-se por ser uma população de células multipotentes capazes de se diferenciar e produzir qualquer tipo celular necessário num processo de reparação (PITTENGER *et al.*, 1999). Estudos com essas células têm crescido através de pesquisas que visam o tratamento de diversas doenças, além do entendimento de sua biologia e mecanismos utilizados por elas (FRIEDENSTEIN *et al.*, 1974; CAPLAN, 1991; ZORZETTO, 2017). Este cenário deve-se, principalmente, à plasticidade funcional das CTM, podendo, também, serem utilizadas como agente regenerativo e modulador do sistema imune controlando a resposta inflamatória

(UCCELLI *et al.*, 2008). Além disto, apresentam baixa expressão do complexo de histocompatibilidade principal de classe I (MHC I) e não expressam o MHC de classe II (MHC II), sendo, portanto, caracterizadas por baixo risco de rejeição durante o transplante alogênico (BARTHOLOMEW *et al.*, 2002; CUI *et al.*, 2007).

As CTM podem ser facilmente obtidas de muitos tecidos adultos, incluindo a medula óssea (PITTENGER *et al.*, 1999), o cordão umbilical e o tecido adiposo (ZUK *et al.*, 2001; IZADPANAHA *et al.*, 2006). Caracterizam-se por apresentarem aderência ao plástico quando em cultura, morfologia fusiforme semelhante à dos fibroblastos e capacidade de diferenciação em células especializadas (UCCELLI *et al.*, 2008). Alguns critérios básicos são requeridos para a caracterização das CTM, como a expressão de alguns marcadores de superfície celular, tais como CD29, CD44 e CD71 e ausência de marcadores de células hematopoiéticas como, por exemplo, a molécula CD34 (DOMINICI, *et al.*, 2006; AQUINO, *et al.*, 2010). Além disso, devem ser capazes de diferenciar em osteoblastos, condroblastos e adipoblastos (PITTENGER *et al.*, 1999).

Quando aplicadas sistemicamente as CTM possuem a característica de serem direcionadas para os locais de lesão tecidual. Esta migração parece ocorrer semelhante à dos leucócitos, embora sob o controle de receptores de quimiocinas e moléculas de adesão específicas (Figura 1).

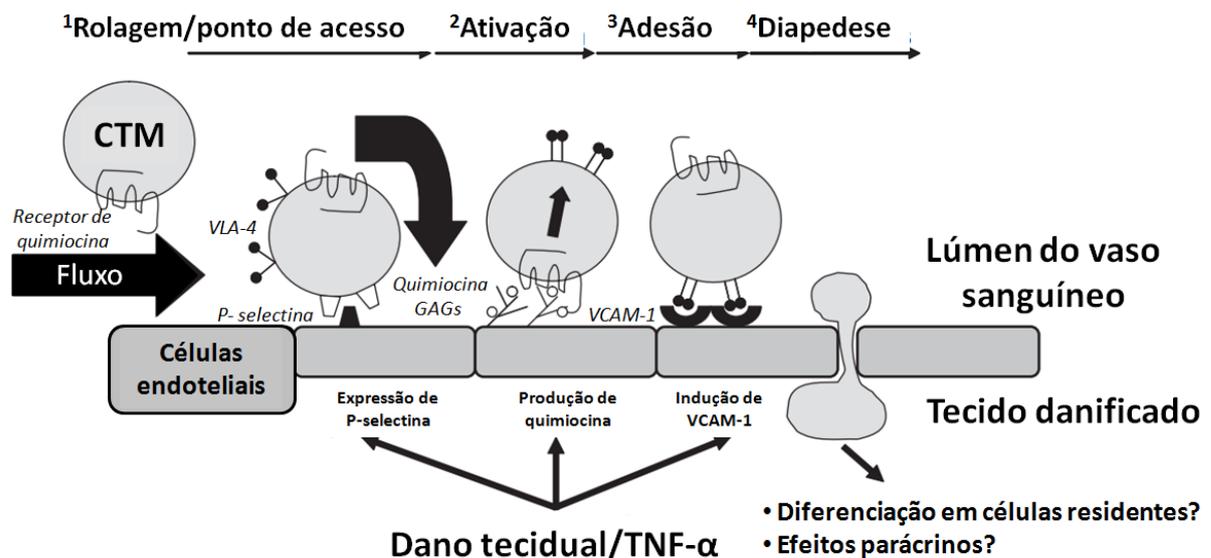


Figura 1. Migração transendotelial de CTM. O processo de migração transendotelial das CTM parece ser semelhante ao dos leucócitos, embora sob o controle de moléculas de adesão

específicas. Permitindo a migração de CTM para o tecido após administração sistêmica. Figura reproduzida e adaptada de James M. Fox *et al.* British Journal of Haematology, 2007.

1.2 Células-tronco mesenquimais e interações com o sistema imune

As CTM podem interagir com células do sistema imune inato e adaptativo, levando à modulação de várias funções efetoras. Os efeitos imunossupressores das CTM, incluindo os efeitos anti-proliferativos, anti-oxidativos, anti-inflamatórios, bem como a remodelação tecidual, são ativados principalmente por níveis elevados de interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 α/β (IL-1 α /IL-1 β) e pelo ambiente oxidativo circundante (DI NICOLA *et al.*, 2002; JONES *et al.*, 2007; KUO *et al.*, 2008; ALEXANDRE *et al.*, 2016). Muitos estudos têm se concentrado em outra propriedade desempenhada pelas CTM, o seu efeito antifibrótico (CARRIÓN & FIGUEROA, 2011). Em modelo murino foi demonstrado os efeitos terapêuticos da infusão sistêmica de CTM em modelos de dano hepático e esclerose sistêmica difusa, sendo neste último, tanto em uma abordagem preventiva quanto curativa, após o início clínico da doença. Estudos tem mostrado que as CTM apresentam um grande potencial para modular desordens do sistema imunológico, suprimir a inflamação e reduzir danos nos rins e intestino de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e doença de Crohn (CAPLAN, 2009; WEI *et al.*, 2013).

As CTM podem alterar a diferenciação e/ou ativação de muitos tipos de células imunes incluindo DC (célula dendrítica), monócito / macrófago, células B, B_{REG} (célula B reguladora), células T, T_{REG}, Th1 (célula auxiliar T, tipo 1), Th2 (célula auxiliar T, tipo 2), Th17 (célula auxiliar T, tipo 17), NK (célula *natural killer*), NKT (célula T NK), neutrófilos e mastócitos (Figura 2) (Najar M. *et al.*, 2016). Apesar das evidências *in vitro* e *in vivo* dos efeitos terapêuticos das CTM, os mecanismos pelos quais elas exercem seus efeitos imunomoduladores e reparadores ainda são pouco compreendidos.

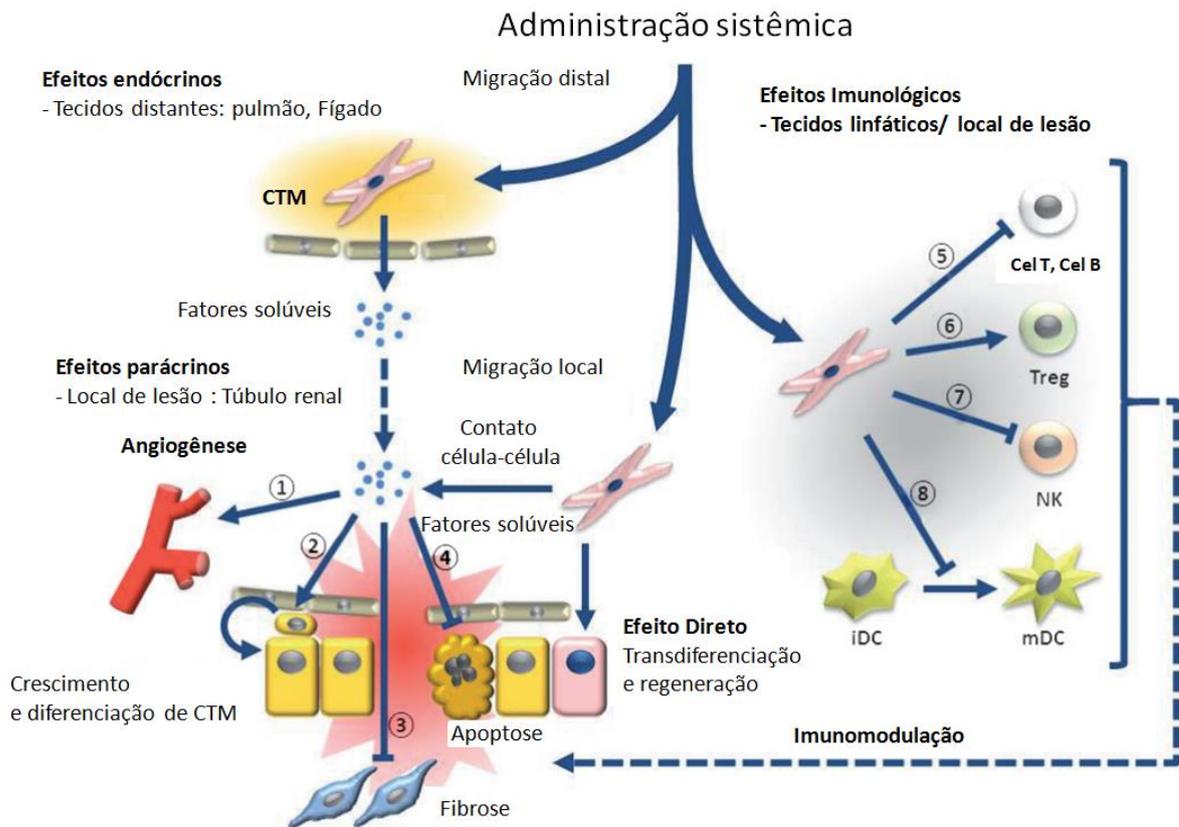


Figura 2. Efeitos da administração sistêmica de CTM. 1) Promoção da angiogênese: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1), proteína quimioatrativa de monócitos 1 (MCP-1), fator de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e interleucina 6 (IL 6). **2) Crescimento e diferenciação de células-tronco:** fator de células-tronco (FSC), fator inibidor de leucemia (LIF), fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), fator 1 derivado de estroma (SDF 1), angiopoietina 1 e ativina A. **3) Inibição de fibrose:** fator de crescimento de hepatócitos (HGF), bFGF, adrenomedulina (ADM). **4) Inibição da apoptose:** VEGF, HGF, IGF 1, fator transformador de crescimento (TGF) β , bFGF, fator estimulante de colônias de granulócitos macrófagos (GM-CSF), ativina A e trombospondina 1. Os efeitos imunológicos mediados incluem os seguintes (5 a 8). **5) Supressão de células T e B:** antígeno leucocitário humano G5 (HLA G5), HGF, óxido nítrico sintase indutível (iNOS), indoleamina 2,3 dioxigenase (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), bFGF e TGF- β . **6) Indução da diferenciação e expansão das células T reguladoras (T_{REG})** pela expressão de TGF- β . **7) Inibição de células natural killer (NK):** secreção de IDO, PGE-2 e TGF- β . **8) Inibição da maturação de células dendríticas (DC):** secreção de PGE-2. Figura reproduzida e adaptada de CARRIÓN & FIGUEROA, Stem Cell Res Ther, 2011.

Embora sejam necessários esforços adicionais para entender os papéis das CTM na modulação imunológica, o conceito básico sobre a função das CTM está se tornando claro e provavelmente envolvem múltiplas vias (WEI & XU, 2020). Em outras palavras, embora o contato direto com as células seja importante para os efeitos imunossupressores das CTM, estudos mostraram que os moduladores imunológicos expressos pelas CTM são mais críticos, incluindo IDO, PGE2, iNOS, TGF- β , IL-10, HGF, HLA -G (NAJAR *et al.*, 2016), além do óxido nítrico (NO) produzido na presença de CTM que desempenha um papel crítico na supressão da

proliferação de células T, induzindo a parada do ciclo celular ou apoptose (KAZUYA *et al.*, 2007).

As CTM podem tanto ativar quanto inibir uma resposta inflamatória. Isto dependerá do ambiente em que se encontram. Num ambiente rico em mediadores inflamatórios, principalmente TNF- α , IFN- γ e IL-1, as CTM são ativadas e começam a suprimir a inflamação. Por outro lado, num ambiente subativado, as CTM irão liberar fatores pró-inflamatórios, contribuindo para o estabelecimento da inflamação, conforme ilustrado na Figura 3 (AGGARWAL, 2005; DELAROSA *et al.*, 2012, WEI & XU, 2020).

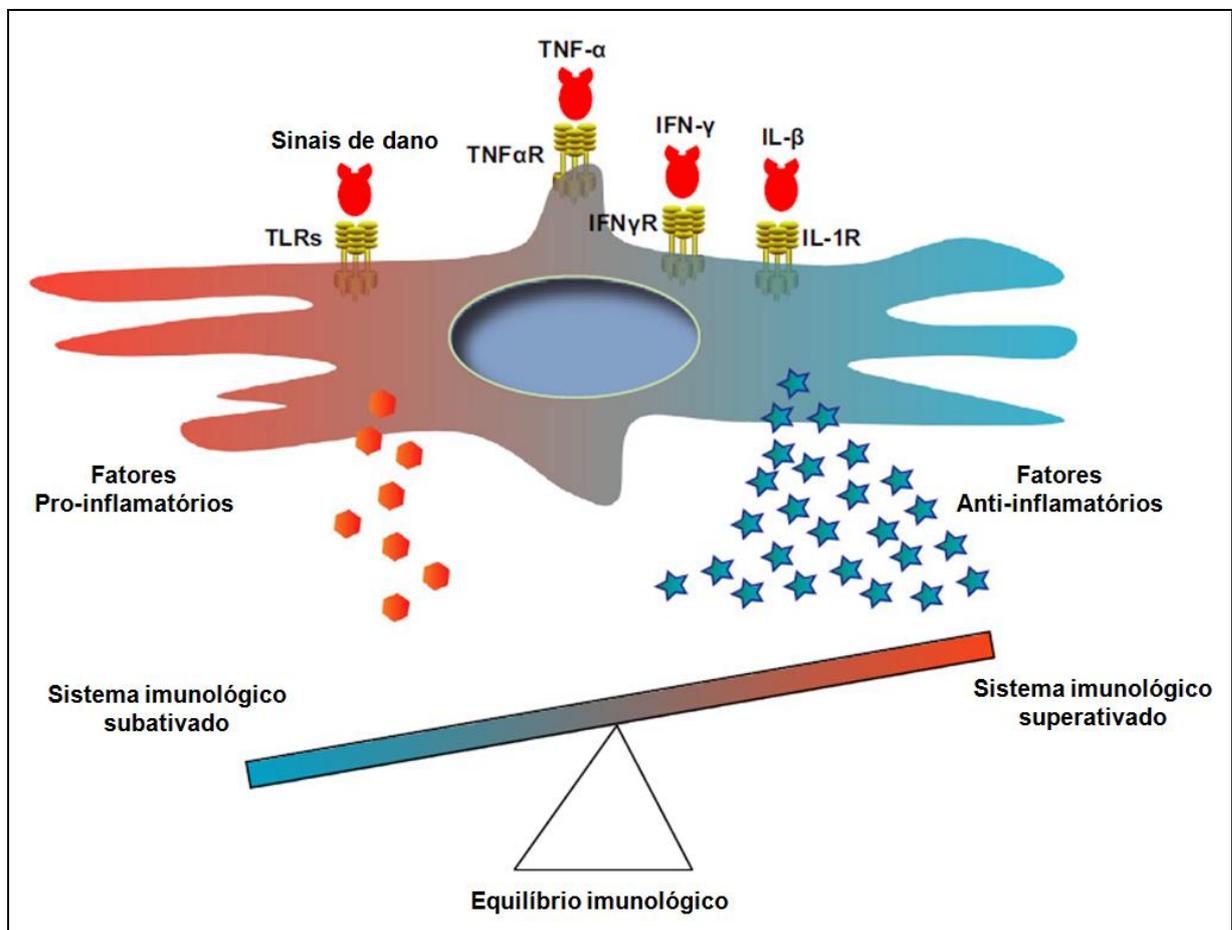


Figura 3: Modelo de sensor e comutador de CTM. As CTM podem detectar sinais de perigo através de diferentes receptores (como TLRs) e também responder a sinais pró-inflamatórios excessivos via receptores para TNF- α , IFN- γ e IL-1 β . Dependendo do tipo ou da força do sinal, as CTM secretam citocinas para promover ou suprimir as respostas imunes para manter o equilíbrio imune. Receptor de interferon gama (IFN γ R); receptor de interleucina - 1 (IL-1R); receptor tipo Toll (TLR); receptor alfa do fator de necrose tumoral (TNF α R). Figura reproduzida e adaptada de WEI & XU. Cell proliferation, 2020.

1.3 Potencial terapêutico das CTM

Estudos pré-clínicos e clínicos têm sido realizados para determinar o potencial terapêutico das CTM (VOLAREVIC *et al.*, 2014; MA *et al.*, 2015). A terapia de transplante de células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTM-TA) tem recebido muita atenção (BANAS *et al.*, 2009). A extração das CTM-TA torna-se vantajosa em comparação à outras fontes. As CTM-TA podem ser extraídas por procedimentos minimamente invasivos como, por exemplo, pela remoção e processamento do tecido adiposo subcutâneo, na qual os precursores de CTM-TA se encontram frequentemente presentes (Figura 4). Outro aspecto relevante das CTM é que os obstáculos regulatórios das aplicações clínicas para CTM são substancialmente mais baixos, estando livres de preocupações éticas e de formação de teratomas (XIN *et al.*, 2013), quando comparadas as CTE e iPSCs (YASUMA *et al.*, 2016). No caso das CTE, a sua obtenção e utilização geram uma problemática de cunho antropológico, ético, político e religioso (BARTH, 2006).

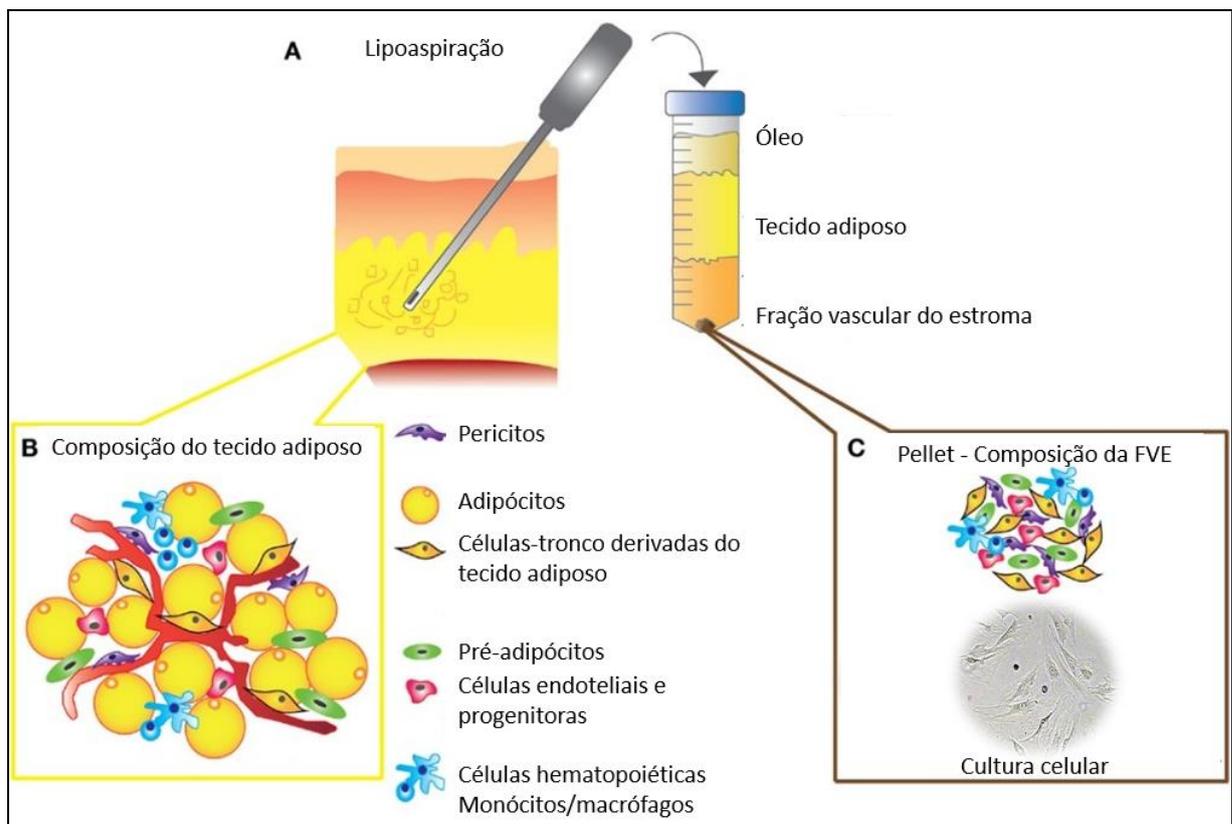


Figura 4: Diagrama esquemático representando o procedimento de lipoaspiração e a obtenção de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo: (A) lipoaspiração de gordura subcutânea, seguido de separação em camadas de óleo, tecido adiposo aspirado e sedimento da fração vascular do estroma (FVE). (B) Os componentes do tecido adiposo e os principais constituintes do sedimento da FVE estão todos presentes no tecido adiposo. (C) Após a digestão com colagenase,

incubação em meio DMEM e centrifugação, o sedimento residual pode ser plaqueado para cultura de células. Adaptado de SHUKLA *et al.*, 2015.

Com base na liberação de fatores tróficos e imunomoduladores, as CTM são comumente usadas no tratamento de lesões hepáticas agudas (PAREKKADAN *et al.*, 2007). Os fatores solúveis presentes no meio condicionado por CTM são responsáveis pelos efeitos terapêuticos locais e sistêmicos. Herrera e colaboradores (2013) relataram que as CTM também preveniram significativamente a morte em um modelo fatal de insuficiência hepática fulminante por um mecanismo parácrino.

O fígado está envolvido na regulação de vários processos fisiológicos importantes, como armazenamento de glicogênio, metabolismo lipídico, secreção de proteínas plasmáticas e desintoxicação xenobiótica (HENGSTLER *et al.*, 2005). A disfunção e a insuficiência hepática podem ter diversas etiologias uma vez que o fígado é exposto a muitos fatores, tais como drogas, álcool, predisposição genética, xenobióticos, distúrbios metabólicos, doença autoimune, parasitos e vírus, que podem causar hepatite crônica e cirrose hepática. Em alguns casos, estes levam à insuficiência orgânica, onde há inflamação crônica, fibrose e a incapacidade de regeneração. Além disso, podem promover a multiplicação descontrolada dos hepatócitos, levando ao carcinoma hepatocelular (THOMAS *et al.*, 2005). Estima-se que a fibrose hepática contribua para quase 50% da taxa de mortalidade no mundo desenvolvido (FRIEDMAN, 2003). O transplante hepático ortotópico (THO) é considerado a opção terapêutica mais adequada para pacientes com insuficiência hepática. No entanto, é severamente limitado pela escassez de órgãos, alta despesa, rejeição do transplante e a necessidade de imunossupressão a longo prazo. Isto destaca a importância de se buscar outras alternativas de intervenção em casos de insuficiência hepática (FRIEDMAN, 2003).

A terapia baseada em células tem sido proposta como uma alternativa potencial à THO (ALISON *et al.*, 2009; BONAVIDA *et al.*, 2010; GRAMIGNOLI *et al.*, 2013). Os hepatócitos primários humanos estão comercialmente disponíveis, no entanto, mantê-los em cultura *in vitro* é muito difícil, já que perdem suas funções após alguns dias de cultivo *in vitro* (AGNIESZKA *et al.*, 2008). Além disso, seu uso não resolve o problema da rejeição. Esses fatores limitam suas aplicações experimentais e excluem seu uso clínico.

A cirrose hepática, o estágio mais avançado, conota não apenas mais cicatrizes do que a fibrose isolada, mas também a distorção do parênquima hepático associada à distúrbios na arquitetura, fluxo sanguíneo alterado, risco de insuficiência hepática, regeneração de hepatócitos anormais e carcinoma hepatocelular (FRIEDMAN, 2008; FRIEDMAN *et al.*, 2013). A ativação de células estreladas hepáticas (CEH) é um evento crucial no desenvolvimento da cirrose hepática (VOLAREVIC *et al.*, 2014). Parece que os efeitos anti-fibróticos das CTM na cirrose hepática são baseados na liberação de fatores que alteram a função das CEH. O HGF é altamente expresso pelas CTM. A superexpressão de HGF promove a apoptose de CEH (HORIGUCHI *et al.*, 2009; NARMADA *et al.*, 2013). A IL-10 e o TNF- α também reduzem a proliferação de CEH e a síntese de colágeno tipo I (PAREKKADAN *et al.*, 2007; BERARDIS, *et al.*, 2014). Além disso, as CTM podem secretar IFN- γ , induzindo efeitos anti-fibróticos (ROCKEY & CHUNG, 1994). A sinalização parácrina é outra explicação possível. As CTM secretam vários fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas, das quais CCL7, VEGF e membros da família CXC estão envolvidos em respostas anti-inflamatórias, prevenção de apoptose e angiogênese (BERARDIS *et al.*, 2014).

O potencial imunossupressor e regenerativo das CTM, em combinação com a baixa imunogenicidade, abriram novos caminhos para o controle da inflamação e fibrose em várias doenças (WEI *et al.*, 2013), incluindo lesões ortopédicas, doença do enxerto *versus* hospedeiro (DEVH), doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e hepáticas (HORWITZ *et al.*, 1999; SUN *et al.*, 2007). No entanto, o efeito dessas células na resposta inflamatória associada a doenças infecciosas e parasitárias ainda não foi bem estudado. Recentemente, investigou-se a capacidade das CTM de tratar doenças parasitárias como a malária (THAKUR *et al.*, 2013) e a doença de Chagas (SOARES *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2011). No entanto, poucos estudos analisaram o efeito das células-tronco na infecção pelo *Schistosoma* (XU *et al.*, 2012; FIKRY *et al.*, 2016).

1.4 Aspectos gerais da esquistossomose mansoni

A esquistossomose é uma infecção helmíntica importante, associada à morbidade grave e com profundo impacto socioeconômico nas populações afetadas. Estima-se que mais de 240 milhões de pessoas estejam infectadas e 700 milhões de pessoas estão em risco de infecção global por esquistossomose (ZONI *et al.*, 2016). A esquistossomose é causada por seis espécies de trematódeos do gênero *Schistosoma* e a causa predominante da doença são *S. mansoni* e *S. hematobium* (WHO, 2017). O controle total desta enfermidade, entretanto, ainda é um grande desafio para os órgãos de saúde pública. Principalmente devido às seguintes razões: (a) ampla disseminação do hospedeiro intermediário; (b) escassez de condições sanitárias e programas de educação sanitária; (c) ineficácia do tratamento na redução da prevalência (reinfecções); (d) inexistência de uma vacina eficaz para prevenir a esquistossomose (COURA & AMARAL, 2004; BERRIMAN *et al.*, 2009).

A propagação e manutenção do ciclo da doença dependem de inúmeros fatores, como a existência de clima apropriado; condições sócio-econômicas precárias; indivíduos infectados eliminando ovos; existência de hospedeiros intermediários e do contato de pessoas susceptíveis com águas contendo cercárias. Considerando essas condições, a infecção pelo *S. mansoni* ocorre quando o hospedeiro definitivo entra em contato com águas infestadas por cercárias (estágios larvais do parasito), liberadas pelo hospedeiro intermediário, habitualmente caramujos do gênero *Biomphalaria*. No hospedeiro definitivo, as cercárias transformam-se em esquistossômulos (parasitos jovens), que migram em direção aos vasos sanguíneos e, através da circulação, são carreados para o sistema porta hepático, via pulmão (GORDON & GRIFFITHS, 1951; VIEIRA *et al.*, 2007). No sistema porta, os vermes jovens diferenciam-se em machos e fêmeas e acasalam-se nas veias mesentéricas inferiores (Figura 5), iniciando a postura dos ovos (cerca de 300 ovos/fêmea/dia) (ALISSON *et al.*, 1974). Os ovos que não conseguem alcançar a luz intestinal por ficarem retidos nos tecidos (MATHEW *et al.*, 1986; SILVEIRA *et al.*, 2004), principalmente fígado e intestinos (Figura 5), são os responsáveis pela formação de granulomas que, no fígado, podem ocluir, total ou parcialmente, a passagem do sangue, e juntamente com a fibrose periportal vão ocasionar as manifestações das formas mais graves da doença (KATZ & ALMEIDA, 2003; Brasil, 2014).

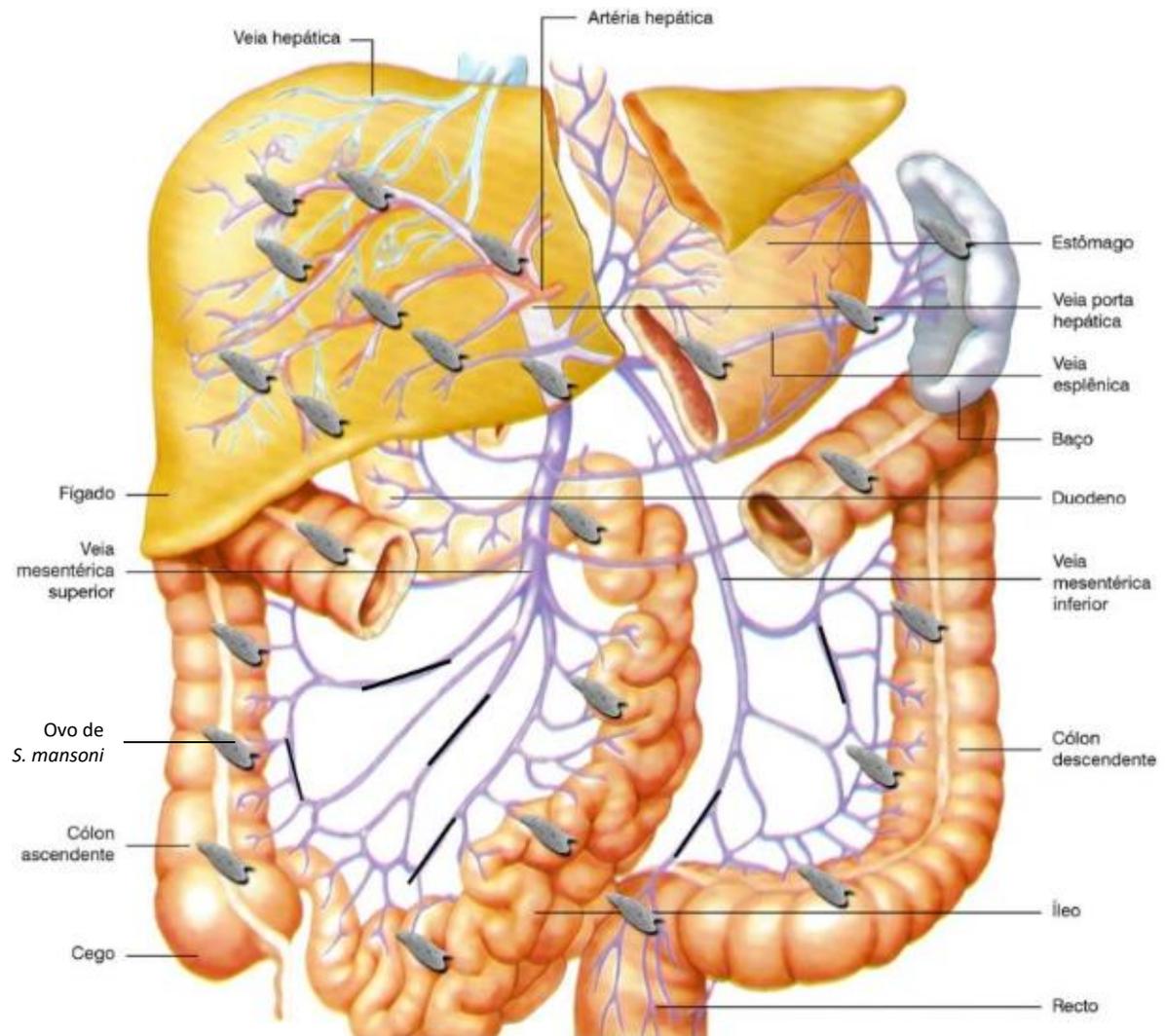


Figura 5- Sistema porta-hepático-mesentérico infectado por *S. mansoni*. Esquema mostrando a localização de vermes adultos em vasos mesentéricos (linhas pretas) e ovos de *S. mansoni* em intestino delgado e grosso, fígado e baço. Fonte: CARVALHO *et al.* *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro, editora FIOCRUZ. Cap.19, p. 578, 2008.

Embora a esquistossomose apresente um baixo índice de mortalidade, sua acentuada morbidade faz com que estes números sejam preocupantes, sendo ainda considerada um grave problema de saúde pública no país (BRASIL, 2014; WHO, 2015). A doença possui caráter insidioso, não sendo comum seu diagnóstico em seus estágios iniciais, mas sua evolução pode levar ao desenvolvimento de doenças incapacitantes para homens e mulheres em suas idades mais produtivas (ENGELS *et al.*, 2002).

No curso da infecção pelo *S. mansoni*, indivíduos infectados podem apresentar duas fases distintas da doença: a fase aguda e a fase crônica, as quais diferem entre si em relação às características clínicas e imunológicas (ATTA *et al.*, 1981).

A fase aguda é o estágio inicial da doença que pode ser caracterizada por mal-estar, febre, tosse, emagrecimento, dor abdominal e diarreia. A resposta imune nessa fase é marcada pela produção de altos níveis de IL-1, IL-6 e TNF- α em pacientes recém infectados. O quadro leucocitário periférico tem sido amplamente estudado, sendo frequente a eosinofilia em pacientes esquistossomóticos nesta fase (ATTA *et al* 1981; DE JESUS *et al.*, 2002).

Na fase crônica, distintas manifestações clínicas podem se desenvolver, sendo as mesmas relacionadas à gravidade da doença. Na maioria dos indivíduos residentes nas áreas endêmicas, a doença se apresenta assintomática, sendo esta considerada a forma intestinal da doença. Nos indivíduos não assintomáticos, a doença se caracteriza pelo aparecimento de episódios de fraqueza, fadiga, dor abdominal e diarreia. Uma pequena percentagem da população, porém, desenvolve formas clínicas mais graves da doença, as quais são denominadas como hepatointestinais ou hepatoesplênicas. Os indivíduos portadores destas formas clínicas mais graves apresentam hepatomegalia ou hepatoesplenomegalia, com variados graus de fibrose periportal, hipertensão portal e consequente desenvolvimento de varizes esofágicas (PRATA & BINA, 1968). Como regra geral, são encontrados níveis elevados de enzimas hepáticas, como alanina aminotransferase (ALT), indicando lesão nos hepatócitos (BOROS, 1989; BRASIL, 2014).

A gravidade da doença depende da interação entre o hospedeiro e o parasito. Em relação ao *S. mansoni*, são importantes a cepa, a intensidade e o número de infecções. Do lado do hospedeiro participam a constituição genética, se o órgão foi previamente lesado, infecções associadas e, sobretudo, o perfil de resposta imune contra o *S. mansoni*, sendo este o fator mais importante na determinação da evolução das formas anatomoclínicas (PEARCE & MACDONALDS, 2002).

1.5 Resposta imune na esquistossomose mansoni

Na esquistossomose mansoni a resposta imune severa contra os ovos de *S. mansoni* promove à formação de granulomas, principalmente nos tecidos do fígado e intestino, resultando em fibrose grave e hipertensão portal (HATZ *et al.*, 1998; HAMS *et al.*, 2013). A inflamação granulomatosa depende de linfócitos T CD4⁺, macrófagos (PARRA *et al.*, 1992), eosinófilos e fibras colágenas (PEARCE & MACDONALD, 2002). A liberação de antígenos solúveis dos ovos (SEA) induz a produção de citocinas Th2 reguladoras. Isso resulta na modulação da resposta Th1 e na diminuição do tamanho do granuloma na maioria dos indivíduos. Este fenômeno é essencial para o controle da morbidade e a citocina IL-10 é de fundamental importância na geração das condições de função homeostática protetora do hospedeiro na esquistossomose (HOFFMANN *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2004; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2008) (Figura 6). Em outras palavras, existe um balanço na expressão de citocinas Th1 e Th2. No começo da infecção, a resposta Th1 é predominante, com produção de IFN- γ , IL-2, IL-1, IL-6. Após o desenvolvimento do parasito em verme adulto e o começo da produção de ovos, a resposta Th1 começa a declinar, enquanto a resposta Th2 (produção de IL-4, IL-13 e IL-5) aumenta (PEARCE & MACDONALD, 2002; BURKE *et al.*, 2009).

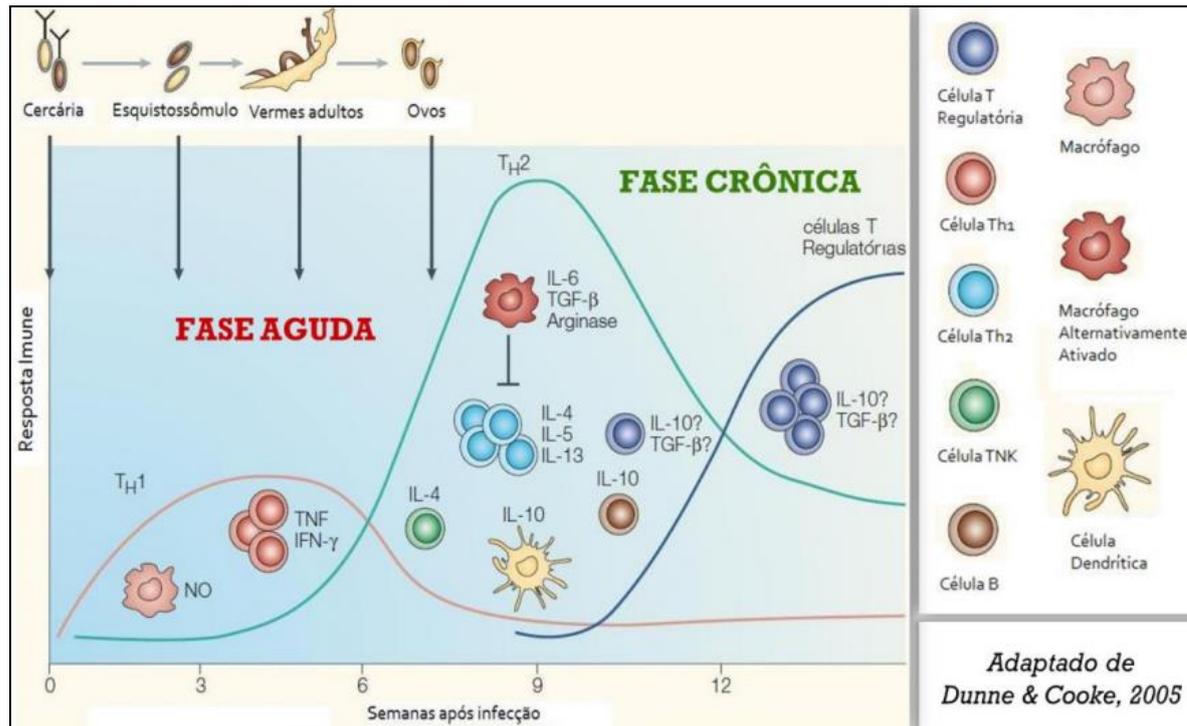


Figura 6 - Indução das respostas Th1 e Th2 e desenvolvimento de células T reguladoras após infecção pelo *S. mansoni*. Após a infecção pelo *S. mansoni*, a resposta imune inicial que se desenvolve é uma resposta da célula Th1. À medida que o verme se desenvolve e os ovos são depositados, as células T natural killer (NKT) são ativadas, as células dendríticas produzem mais IL-10 e menos IL-12, e uma resposta de células Th2 se desenvolve. Os linfócitos B também produzem IL-10, em resposta a antígenos derivados de ovos e antígenos derivados de vermes. Além disso, populações de macrófagos alternativamente ativados e células T reguladoras também se desenvolvem. Interferon γ (IFN- γ); NO; fator de crescimento transformador β (TGF- β); fator de necrose tumoral (TNF).

As formas mais graves da fase aguda da esquistossomose são caracterizadas por reações granulomatosas inflamatórias ao redor dos ovos nos tecidos do hospedeiro, com um ambiente composto por citocinas pró-inflamatórias, enquanto as formas menos graves da doença correspondem a uma inflamação hepática reduzida e um ambiente composto por citocinas anti-inflamatórias (SMITH *et al.*, 2009). Falhas no desenvolvimento de uma resposta Tipo 2 efetiva pode resultar em uma reação granulomatosa exacerbada, provocada, principalmente, por células dos Tipos 1 e 17 (ANTHONY *et al.*, 2007).

As células da resposta Tipo 17 representam um subtipo celular TCD4⁺, caracterizado por células produtoras de IL-17, considerada como mediadora de processos inflamatórios crônicos (CUA *et al.*, 2003; ANTHONY *et al.*, 2007). Rutitzky *et al.* (2005) demonstraram que camundongos isogênicos da linhagem CBA, que

desenvolvem patologia exacerbada naturalmente, apresentam altos níveis de IL-17, podendo ser reduzida através de anticorpos anti-IL-17.

Outro subtipo de células T são as células T_{REG}. Estudos mostram que infecções por nematódeos podem induzir expansão natural dessa população celular (SUMMERS *et al.*, 2003; SAUNDERS *et al.*, 2007), sugerindo um papel modulador das células T_{REG} em processos inflamatórios (BELKAID & ROUSE, 2005; ANTHONY *et al.*, 2007). Alguns estudos têm sugerido que as células T_{REG}, mediadas por IL-10, desempenham função na supressão da resposta do Tipo 1 contra SEA (HESSE *et al.*, 2004; FREEMAN *et al.*, 2005). Entretanto, achados mais recentes indicam que estas células poderiam exercer seu papel através de um mecanismo, ainda desconhecido, porém, independente de IL-10 (MCKEE & PEARCE, 2004; BAUMGART *et al.*, 2006; TAYLOR *et al.*, 2006).

Segundo Liew (1995), o NO pode se tornar um mediador importante no equilíbrio das citocinas envolvidas na resposta do Tipo 1 e do Tipo 2 na esquistossomose. As células do Tipo 1 produzem IFN- γ , que induz NO, enquanto células do Tipo 2 produzem IL-10 e IL-4 que podem inibir a transcrição da enzima NO indutível (iNOS). O NO também pode ser produzido por células do Tipo 1 e sua proliferação pode ser inibida por suas elevadas concentrações. Assim, além de ser um mediador da interação das respostas do Tipo 1 e 2, o NO pode ser uma importante molécula reguladora (PEARCE *et al.*, 1995). Oliveira e colaboradores (1998, 1999) correlacionaram a presença de NO com a reação granulomatosa *in vivo* e *in vitro* estimulada com SEA e substâncias antigênicas do verme adulto (SWAP) e observaram uma diminuição da proliferação celular, sugerindo um possível papel regulador do NO na formação do granuloma. O NO parece ter um papel central na regulação da reação granulomatosa na esquistossomose humana (OLIVEIRA, 2000).

O granuloma é caracterizado por ser uma reação inflamatória local, constituída por uma variedade de células mononucleares fagocíticas e outros tipos celulares, dispostos de forma organizada (LENZI *et al.*, 1998). Estudos mostram as diferentes fases do granuloma, bem como suas características, sendo dois os estágios do granuloma: o estágio pré-granulomatoso e o estágio granulomatoso. O estágio pré-granulomatoso, é caracterizado pelo preparo do espaço, ao redor do ovo do parasito, para o estabelecimento e organização da reação granulomatosa, com destruição focal das paredes dos vasos envolvidos e/ou parênquima adjacente e

presença abundante de eosinófilos e macrófagos. Tal estágio pode ser subdividido em estágio pré-granulomatoso de reatividade fraca ou inicial e estágio pré-granulomatoso exsudativo. O estágio granulomatoso é subdividido em três fases: exsudativo-produtivo, produtivo e involucional (involucional com dissociação das fibras colágenas; involucional com camada de colágeno espessa; involucional com camada de colágeno fina; e involucional com pigmento macrofágico). Ao longo da evolução do granuloma, através destas fases, células, tais como, macrófago, neutrófilos, eosinófilos, mastócitos, fibroblastos, células epitelióides, células gigantes e linfócitos, se dispõem ao redor do ovo em diferentes zonas, envoltas por uma matriz extracelular rica em fibras colágenas, as quais, no início estão dispostas em malha e que, com o desenvolvimento do granuloma se dispõem de forma concêntrica. No estágio involucional ocorre a degradação da matriz extracelular (LENZI *et al.*, 1998).

1.6 Tratamento convencional para a esquistossomose mansoni

Intervenções para controle da esquistossomose têm variado ao longo do tempo. Devido ao baixo custo, segurança e alta eficácia, PZQ tem sido usado como tratamento padrão-ouro para a esquistossomose e a administração em massa de medicamentos, tornou-se o pilar dos programas nacionais de controle (CRELLEN *et al.*, 2016). O mecanismo de ação do PZQ não está totalmente esclarecido. Porém, alguns efeitos relacionados à sua ação sobre o parasito, tais como, contração muscular, deformações no tegumento e alterações metabólicas são bem documentados. Acredita-se que todos esses efeitos estejam direta ou indiretamente relacionados ao aumento do influxo de cálcio nos tecidos (STELMA *et al.*, 1995), provocado após exposição do verme à droga. Atualmente, o Ministério da Saúde utiliza o PZQ produzido pelo Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/Fiocruz), que é apresentado em comprimidos de 600 mg, administrados por via oral. O Ministério recomenda uma dose única de 50 mg/kg de peso corporal para adolescentes acima de 15 anos e adultos e 60 mg/kg para crianças de até 15 anos (BRASIL, 2010).

Outra droga que pode ser utilizada no combate à infecção esquistossomótica é a oxamniquina. Entretanto, essa droga atua somente sobre formas jovens do *S. mansoni* (OLDS & DASARATHY, 2000; FENWICK *et al.*, 2003), possuindo uma eficácia semelhante ao PZQ. Contudo, seus efeitos colaterais são mais

pronunciados e já existem trabalhos na literatura demonstrando resistência a esse medicamento (LAMBERTUCCI *et al.*, 2000; SACONATO & ATALLAH, 2000).

Outra alternativa de tratamento são os derivados da artemisinina, compostos ativos contra parasitos da malária e vermes imaturos do *S. mansoni* (XIAO *et al.*, 2002). Entretanto, o uso desses compostos, em áreas endêmicas para a malária, não é recomendado devido ao risco dos parasitos da malária tornarem-se resistentes a essa droga (GRYSEELS *et al.*, 2006).

O tratamento quimioterápico contra o parasito *S. mansoni* é eficaz e contribui para regressão da doença hepatoesplênica, porém deixa, muitas vezes, lesões irreversíveis e persistentes (DIETZE & PRATA, 1986; COUTINHO & DOMINGUES, 1987). Até o momento, não existem estratégias terapêuticas disponíveis para o controle da reação granulomatosa e da forma hepatoesplênica, dependendo do comprometimento do fígado e baço, as alterações induzidas pela doença grave, podem necessitar de acompanhamento sistemático por muitos anos, após o sucesso do tratamento com PZQ (COUTINHO *et al.*, 1987).

Dentre os diversos estudos que o nosso grupo vem desenvolvendo na área da esquistossomose, destaca-se a avaliação do tratamento com PZQ associado às CTM-TA. Neste estudo, observamos uma redução significativa no tamanho dos granulomas hepáticos e nos níveis de ALT em camundongos infectados pelo *S. mansoni* e tratados com PZQ e CTM-TA.

Considerando que as CTM apresentam propriedades imunossupressoras e regenerativas, hipotetizamos que estas células podem ser usadas para controlar a reação granulomatosa na infecção por *S. mansoni* e promover a rápida recuperação morfofisiológica do paciente. Neste estudo, avaliamos um protocolo de terapia associada (PZQ/CTM) para camundongos C57BL/6 cronicamente infectados com *S. mansoni*, analisando a redução em tamanho e número do granuloma, bem como os mecanismos utilizados por estas células. Esses resultados podem trazer nova estratégia para o tratamento da morbidade provocada pela esquistossomose e encorajar novas abordagens terapêuticas usando CTM para controlar a inflamação similar em outras doenças que acometem o fígado.

2 JUSTIFICATIVA

A pesquisa com células-tronco tem sido um dos campos mais crescentes de investigação, o qual tem levado ao entendimento do desenvolvimento celular e descoberta de terapêuticas alternativas para doenças de importância em saúde pública. As CTM apresentam baixa imunogenicidade, potencial de reparo tecidual e, quando em ambientes inflamatórios, possuem atividade imunossupressora. Essas características tornam as CTM excelentes candidatas ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, associadas ou não a outros fármacos, para o tratamento de doenças com o perfil inflamatório desencadeado por diferentes agentes patológicos. Os mecanismos associados à modulação da resposta inflamatória pelas CTM têm sido objeto de intenso estudo em modelos de doenças auto-imunes e pós-transplantes, principalmente. Poucos estudos avaliam a função dessas células no controle da inflamação de outras etiologias, como as doenças infecciosas e parasitárias. Neste contexto, objetivamos o estudo das CTM no controle da inflamação no modelo da esquistossomose experimental, avaliando um protocolo de terapêutica associada ao PZQ. Os resultados deste estudo contribuem para: 1- potencializar o uso das CTM no controle da resposta inflamatória; 2- proporcionar o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para doenças infecciosas e parasitárias utilizando CTM combinada com outros fármacos; 3- propor um novo tratamento para doenças inflamatórias crônicas, como a esquistossomose, com minimização do dano hepático causado pelo desenvolvimento de granulomas; 4- contribuir para um melhor entendimento dos mecanismos imunológicos e de biodistribuição das CTM.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o uso de células-tronco mesenquimais associadas ao praziquantel no controle da resposta inflamatória hepática no modelo murino de esquistossomose mansoni.

3.1 Objetivos Específicos

- Obter e caracterizar fenotípica e funcionalmente as células-tronco mesenquimais derivadas tecido adiposo inguinal de camundongos C57BL/6 não infectados;
- Verificar a presença das células-tronco mesenquimais tdTomato⁺ nos pulmões e fígado de camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni*, após a terapêutica combinada;
- Avaliar o desenvolvimento de granulomas hepáticos e a deposição de colágeno de camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni*, após a terapêutica combinada;
- Analisar o perfil de ativação de células T hepáticas e esplênicas em camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni*, após a terapêutica combinada;
- Dosar marcadores de inflamação (IL-10, IL-17 α , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-4, IL-2 e NO) em camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni*, após a terapêutica combinada;
- Analisar indicadores de dano hepático, alanina aminotransferase (ALT), bilirrubina total (BT) e albumina (Alb) dos camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni*, após a terapêutica combinada;
- Comparar os modelos experimentais de camundongos C57BL/6 convencionais e *specific pathogen-free* (SPF) infectados com *S. mansoni*, após a terapêutica combinada, no tempo de 15 dias.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Estratégia experimental

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Imunologia Celular e Molecular do Instituto René Rachou/FIOCRUZ-MG. A figura 7 demonstra o esquema metodológico empregado para o desenvolvimento deste trabalho.

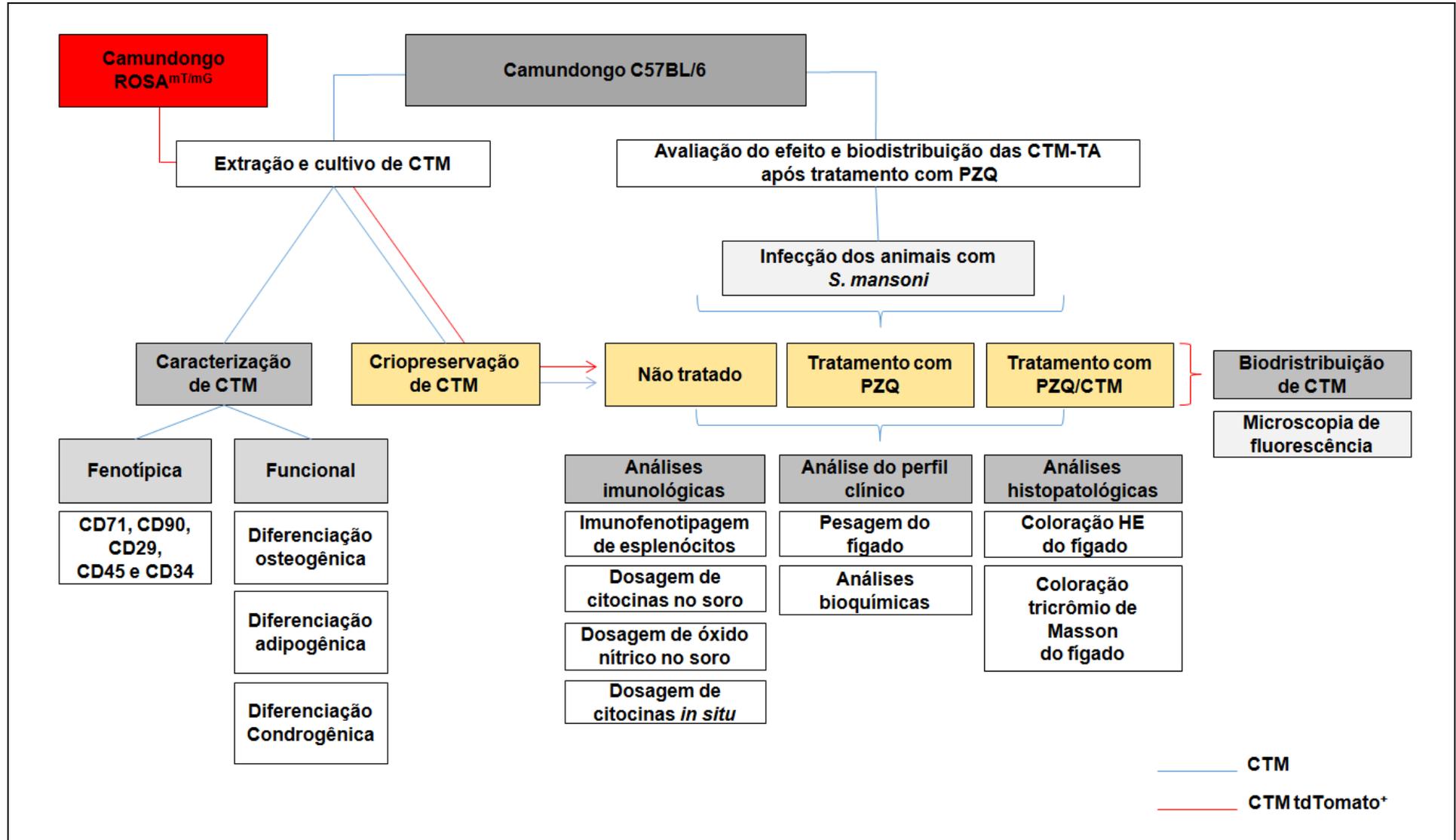


Figura 7: Estratégia de trabalho para o desenvolvimento do projeto.

4.2 Animais

No estudo foram utilizados camundongos C57BL/6 convencional e SPF (macho ou fêmea) e camundongos ROSA^{mT/mG} (todas as células apresentam fluorescência em sua membrana plasmática proveniente da expressão da proteína tdTomato⁺) (MUZUMDAR *et al.*, 2007) com 6 a 10 semanas de idade, oriundos do biotério de criação do Instituto René Rachou. O protocolo experimental utilizado neste estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, Fiocruz sob o número: LW-10/17. Os camundongos foram mantidos no Biotério de experimentação em um regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, 20°C a 25°C, em gaiolas com ração e água a vontade. Estes animais foram utilizados para extração de CTM-TA e avaliação da terapêutica combinada (camundongos C57BL/6), e rastreamento celular (ROSA^{mT/mG}). Os animais SPF foram alojados em racks ventiladas, dentro de mini isoladores com ração e água autoclavadas a vontade.

4.3 Extração e cultivo de CTM-TA

As CTM-TA foram isoladas a partir do tecido adiposo inguinal de camundongos C57BL/6 com seis a oito semanas de idade (GRONTHOS. *et al.*, 2001). O tecido adiposo foi coletado em tubo de centrifuga, tipo Falcon de 50mL, mantido em gelo, contendo Meio Eagle modificado por Dulbecco alta glicose (DMEM alta glicose) (Gibco, MA, EUA), pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco), filtrado em ambiente estéril, utilizando membrana de 0,22µm (Millipore). Em seguida, o tecido adiposo removido foi lavado com PBS 0,15 M e digerido enzimaticamente com 0,15% de colagenase tipo II (Life Technologies, Califórnia, EUA) em PBS 0,15 M, a 37°C e por uma hora. Posteriormente, a fração vascular do estroma foi isolada por centrifugação a 252 xg por 10 min e a 4°C, e o *pellet* foi ressuspenso em meio DMEM suplementado com 10% SFB (Gibco), gentamicina 60 g/L (CAHILL *et al.*, 2007), 25 g/L de anfotericina B, 100 U/mL de penicilina, 100 g/mL de estreptomina (Gibco). Logo após, as células foram transferidas em frascos de cultura celular de poliestireno com 75 mm³ (TTP; Schaffhausen, Suíça) e foram incubadas a 37°C, em ambiente com 5% de CO₂, durante 24 horas. Terminado o período de incubação, as células não aderentes foram removidas das garrafas descartando o sobrenadante e as células aderidas

foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e incubadas a 37°C, em ambiente com 5% de CO₂. Estas células aderidas foram distribuídas em garrafas de cultura, obedecendo a razão de 1 garrafa inicial para 2 garrafas finais. Esse tratamento permitiu a expansão da população e, conseqüentemente, sua purificação, sendo repetido por no máximo três vezes, a fim de evitar a senescência das células, que ocasiona a redução da capacidade proliferativa. Para o congelamento celular, 1x10⁶ células-tronco foram ressuspendidas, em 600µL de solução A, composta por DMEM suplementado com 20% SFB, e 400 µL da solução B, composta por DMEM suplementado com 20% SFB e 10% de DMSO (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). A seguir, os criotubos foram acondicionados em recipiente de congelamento Nalgene® Mr. Frosty (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA) foram armazenados em freezer a -80°C por 48 horas e, posteriormente, transferidos para caixas de armazenamento de criotubos e mantidas a -80°C. Uma parte foi utilizada para os ensaios de caracterização fenotípica e funcional das células-tronco e outra parte para o tratamento dos animais infectados com *S. mansoni* tratados com praziquantel.

4.4 Ensaio de viabilidade

Para analisar a viabilidade das CTM-TA, foi utilizado o teste de redução de brometo (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MTT). Resumidamente, as células (2x10⁵ por poço) foram semeadas, em triplicata, em placa de 24 poços e cultivadas em meio basal DMEM a 37°C, em 5% de CO₂, por 24 horas. Em alguns poços foi adicionada estaurosporina (100 nM) (Sigma) como um indicador de morte das CTM-TA. Terminado o tempo de incubação, as CTM foram incubadas com MTT (Sigma) por 2 horas, a 37°C e em ambiente umidificado em 5% de CO₂ que foi seguida da incubação por 12 horas com 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS) em HCl 1N para solubilizar os cristais de formazan. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (Spectramax 340PC, Molecular Devices, Califórnia, EUA) em comprimento de onda de 595 nm.

4.5 Caracterização fenotípica das CTM-TA

As células aderentes foram removidas das garrafas de cultura com 0,25% de tripsina/EDTA (Sigma). A seguir, as CTM foram centrifugadas durante 5 minutos a

379 xg e ressuspensas em PBS 0,15 M. Alíquotas contendo 5×10^5 foram incubadas durante 30 min e a 4°C com os anticorpos descritos na tabela 1. Logo após as células foram lavadas duas vezes em PBS 0,15 M e fixadas em formaldeído a 2% e os dados foram adquiridos utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Immunocytometry System, Califórnia, EUA). Um total de 30.000 eventos foi adquirido usando o software CELL QUEST. As frequências celulares dos marcadores de superfície foram determinadas utilizando o software FlowJo v9.9.3 (FlowJo, Oregon, EUA).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para caracterização de CTM-TA para análise por citometria de fluxo

Anticorpo-Fluoróforo	Marca	Diluição	Clone	Número de catálogo	Conc. final (µg/mL)	Função e célula em que está expressa
CD34-PE	BD	1:100	RAM34	551387	2	Fator de adesão celular. Células-tronco hematopoiéticas.
CD45-APC	BD	1:100	30-F11	559864	2	Auxilia na ativação de leucócitos.
CD71-FITC	BD	1:100	C2	553266	5	Controla a captação de ferro durante a proliferação celular. Células em proliferação, reticulócitos e precursores eritóides.
CD29-FITC	BD	1:100	Ha2/5	555005	5	Adesão e ativação, embriogênese. Leucócitos, DC, plaquetas, mastócitos, fibroblastos e células endoteliais.
CD90-PerCP	BD	1:100	OX-7	557266	2	Sinalização, adesão. Linfócito T, NK, monócito, CTH, neurônio, fibroblasto.

4.6 Diferenciação osteogênica

Para induzir a diferenciação osteogênica, 1×10^5 células/poço foram cultivadas a 37°C em 5% de CO_2 por 14 e 21 dias em meio basal suplementado com 0,02 M β -glicerofosfato (Sigma), 5,67 M de ácido ascórbico (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 10 nM de dexametasona (Sigma). Logo após, as células foram fixadas em etanol a 70%, e foi utilizada a coloração Von Kossa. As células foram incubadas com nitrato de prata a 5% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e expostas à luz ultravioleta por uma hora. Em seguida, as células foram lavadas com água destilada, tiosulfato de sódio a 5% (Cinética Química Ltda, Brasil), contrastadas com eosina por 40 segundos e lavadas com água destilada. As células foram analisadas pelo microscópio Axio Observer A1 (Zeiss, Göttingen, Alemanha), utilizando aumento de 100X, 400X e 1000X. A presença de nódulos de mineralização de coloração enegrecida na matriz extracelular indicava diferenciação osteogênica. Imagens foram capturadas utilizando a câmera AxioCam MRc (Zeiss).

4.7 Diferenciação adipogênica

Para induzir a diferenciação adipogênica, 2×10^5 células foram semeadas em placas de 6 poços (TPP) e cultivadas a 37°C em 5% CO_2 por 14 e 21 dias em meio basal suplementado com 0,5 mM isobutil-metilxantina (Sigma), 200 μM de indometacina (Sigma-Aldrich), 1 μM de dexametasona (Aché, São Paulo, Brasil) e 10 μM de insulina (Eli Lilly and Company, Indiana, EUA). A diferenciação adipogênica foi analisada pela coloração com Oil Red O (Thermo Scientific), um indicador do acúmulo de lipídios intracelulares, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, as células foram lavadas com PBS 0,15 M e fixadas em formalina a 10% durante uma hora. A seguir, foram lavadas com isopropanol a 60% e coradas com solução Oil Red O (Thermo Scientific) em 60% de isopropanol durante cinco minutos. Logo após, as células foram lavadas com água deionizada e coradas com hematoxilina por um minuto. As células foram analisadas utilizando o microscópio Axio Observer A1 (Zeiss) com aumento de 100x, 400x e 1000x. A presença de organelas arredondadas de coloração púrpura no citoplasma das células indicava diferenciação adipogênica. Imagens foram capturadas usando a câmera AxioCam MRc (Zeiss).

4.8 Diferenciação condrogênica

Para induzir a diferenciação condrogênica, 5×10^5 células foram centrifugadas a 800 xg, por 5 minutos e a 4°C em um tubo de polipropileno com fundo cônico de 15mL. Em seguida, o precipitado contendo as células foi cultivado a 37°C, em 5% CO₂ e por 14 e 21 dias em meio condrogênico (Stem Pro Chondrogenesis Differentiation - Life Technologies, Califórnia, EUA) suplementado com 10% de SFB. No fim de cada tempo de cultivo, o sedimento celular formado foi recolhido para coloração dos proteoglicanos e glicosaminoglicanos com Alcian Blue. Para a realização desta coloração, o sedimento celular foi embebido em parafina utilizando o processador automático de tecidos (Modelo PT 05, LUPETEC, São Paulo, Brasil). Logo após, foram obtidos cortes de 4 µm utilizando um micrótomo rotativo de parafina (MRP 09, LUPETEC). Em seguida, as secções obtidas foram coradas com Alcian Blue 8GX a 1% em ácido acético, pH 2,5 (Sigma-Aldrich) durante trinta minutos e, posteriormente, com hematoxilina durante um minuto. A presença de proteoglicanos e glicosaminoglicanos na matriz extracelular indicava diferenciação condrogênica. Imagens foram capturadas utilizando a câmera AxioCam MRc (Zeiss).

4.9 Infecção experimental e tratamento dos animais

Camundongos C57BL/6 machos com seis a oito semanas de idade foram infectados com cercárias de *S. mansoni* obtidas de caramujos *Biomphalaria glabrata*, previamente infectados com miracídios da cepa L.E., de Belo Horizonte, Brasil. Os camundongos (oito por grupo) foram expostos a 45 ± 5 cercárias através de injeção subcutânea realizada no dorso dos animais (PELLEGRINO & KATZ, 1968). Após 45 dias, os camundongos foram divididos em quatro grupos de acordo com o tratamento: a) não infectados (grupo NI); b) - não tratados (grupo NT); c) - tratados oralmente com PBS 0,15M e com células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTM-TA) (3×10^5 em 50 µL/camundongo) após 30 dias do tratamento com PBS, injetadas pela veia lateral da cauda em dose única (grupo CTM); d) - tratado oralmente por gavagem com PZQ (400 mg/kg) diluído em água Mili-Q (OLIVEIRA & KUSEL, 2006) após 30 dias receberam injeção de PBS 0,15 M pela veia caudal (grupo PZQ); e e) - tratados oralmente com PZQ, e com CTM-TA (3×10^5 em 50µL / camundongo) após 30 dias de tratamento com PZQ, injetados pela veia caudal, dose única (grupo PZQ/CTM). Após 8 e/ou 15 dias de tratamento com CTM, os camundongos foram

submetidos à eutanásia e amostras de sangue, baço e fígado foram coletados para análise. A carga parasitária foi determinada pela contagem dos vermes adultos recuperados após a perfusão da circulação sanguínea com solução isotônica (PELLEGRINO & SIQUEIRA, 1956). Para sua realização, foi feita a exposição das vísceras e a veia porta foi seccionada, próximo à penetração no fígado. Com o auxílio de uma agulha acoplada a um pipetador automático foi injetada solução salina 0,85% com heparina (0,016%) na aorta torácica, permitindo assim, a perfusão das veias mesentéricas e a recuperação dos vermes adultos existentes. Os parasitos foram coletados em copos de 200 mL e lavados com o auxílio de uma peneira em água corrente. A seguir, os vermes adultos foram transferidos para placas de Petri contendo água para contagem com auxílio de uma lupa. A Figura 8 e 9 demonstram o esquema metodológico empregado no trabalho.

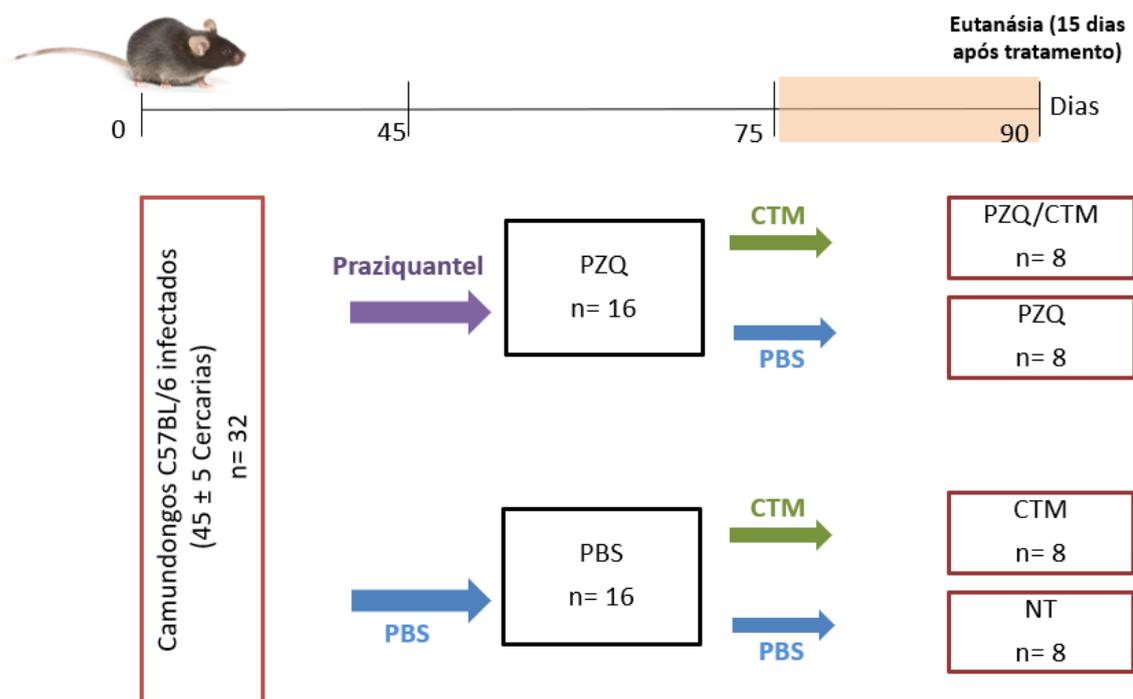


Figura 8: Diagrama dos grupos de animais convencionais. Camundongos C57BL/6 convencionais foram infectados por ± 45 cercárias de *S. mansoni*. Após 45 dias da infecção alguns grupos receberam o tratamento com PZQ e os outros grupos foram tratados apenas com PBS. Após 30 dias do tratamento quimioterápico alguns grupos receberam tratamento com CTM-TA. A eutanásia dos animais foi realizada com 15 dias após a injeção de CTM ou PBS. Além dos grupos de camundongos infectados, utilizamos como controle camundongos C57BL/6 não infectados seguindo os mesmos períodos e tratamentos do grupo não tratado. Este grupo será utilizado como parâmetro de normalidade para os resultados obtidos nos grupos experimentais.

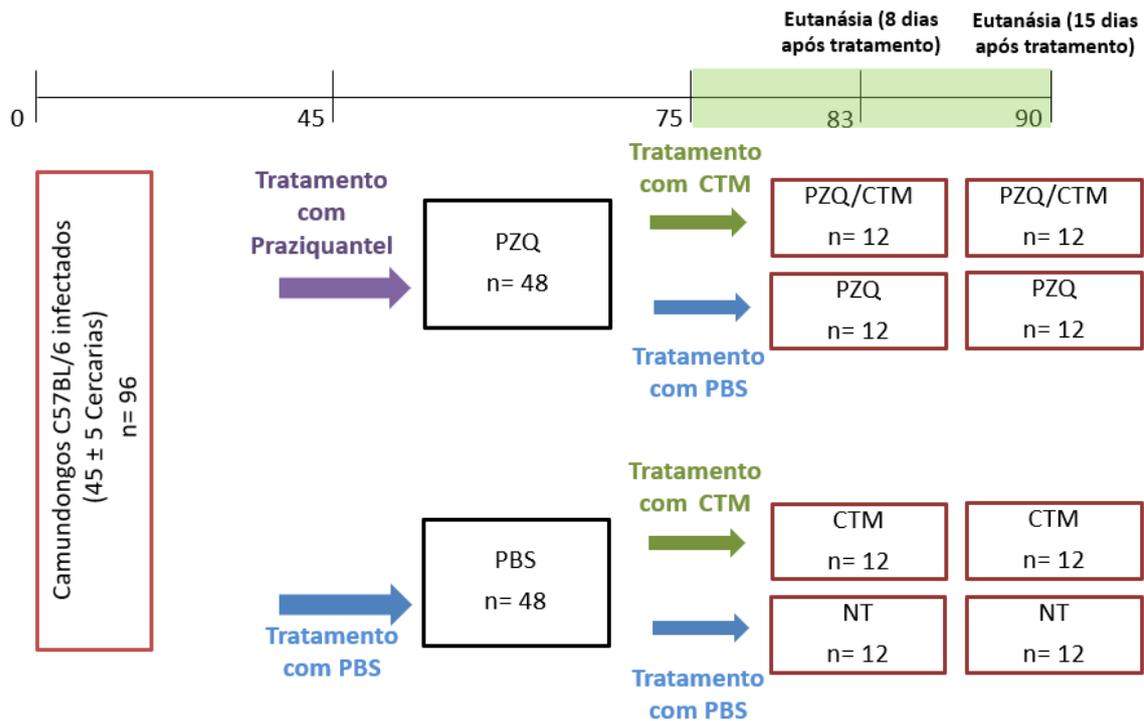


Figura 9: Diagrama dos grupos de animais SPF. Camundongos C57BL/6 SPF foram infectados por \pm 45 cercárias de *S. mansoni*. Após 45 dias da infecção alguns grupos receberam o tratamento com PZQ e os outros grupos foram tratados apenas com PBS. Após 30 dias do tratamento quimioterápico alguns grupos receberam tratamento com CTM-TA. A eutanásia dos animais foi realizada com 8 dias e 15 dias após a injeção de CTM ou PBS. Além dos grupos de camundongos infectados, utilizamos como controle camundongos C57BL/6 não infectados seguindo os mesmos períodos e tratamentos do grupo não tratado. Este grupo será utilizado como parâmetro de normalidade para os resultados obtidos nos grupos experimentais.

4.10 Avaliação da biodistribuição das células-tronco mesenquimais tdTomato⁺

Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo expressando a proteína fluorescente vermelha tdTomato⁺ foram obtidas como descrito no tópico 4.3 a partir de camundongos ROSA^{mT/mG}. No dia do tratamento, as células foram descongeladas e 3×10^5 CTM-TA tdTomato⁺ foram injetadas pela veia lateral da cauda em camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni* e tratados com praziquantel. Após o período de 1 dia, 8 dias e 15 dias, os animais foram submetidos a eutanásia e o fígado e os pulmões foram coletados. Estes órgãos foram fixados em paraformaldeído 4% overnight a 2°C e imersos em solução de sacarose a 30% durante 48 horas a 2°C. Logo em seguida, os órgãos foram embebidos em Tissue Tek, Optimal Cutting Temperature compound (OCT) (Sakura, CA, EUA) e congelados a -80°C. Posteriormente, secções de 20 μ m foram obtidas utilizando o criostato LEICA CM1850 (Leica). As secções teciduais foram coradas com DAPI

(Invitrogen, Califórnia, EUA) durante 5 minutos e analisadas utilizando o microscópio Axio Observer A1 (Zeiss) com aumento de 100x, 400x e 1000x. Imagens foram capturadas usando a câmera AxioCam MRc (Zeiss) e analisadas utilizando o software ImageJ v1.48.

4.11 Análise histopatológica

Os tecidos hepáticos foram fixados em formaldeído tamponado a 10%, embebidos em parafina utilizando o processador automático de tecidos (LUPETEC® Modelo PT 05). Secções histológicas de 4 µm foram obtidas utilizando o micrótomo rotativo de parafina (MRP 09, LUPETEC). Em seguida, os tecidos foram corados com hematoxilina e eosina (HE) ou tricrômico de Masson. Os cortes histológicos foram analisados utilizando o microscópio Eclipse e600 (Nikon, New York, EUA) com aumento de 100x, 400x e 1000x. Foram realizadas as seguintes análises: a) quantificação do percentual de ovos viáveis; b) determinação do número de granulomas; c) caracterização da fase do granuloma; d) avaliação da composição celular dos granulomas; e e) deposição de colágeno nos granulomas. Para determinação do percentual de ovos viáveis foram contados no mínimo cinco campos em quatro lobos do fígado. Para a determinação do número de granulomas também foram contados cinco campos em quatro lobos do fígado para todos os grupos de estudo e o total obtido foi utilizado para expressar os resultados. Já para a caracterização da fase do granuloma, bem como a avaliação da composição celular dos granulomas, também foram contados no mínimo cinco campos em quatro lobos do fígado para todos os grupos de estudo utilizando os critérios apresentados na figura 10 (LENZI *et al.*, 1998; AMARAL *et al.*, 2017) e para expressar os resultados o valor obtido foi convertido em percentual. As imagens foram capturadas com a câmera AxioCam MRc (Zeiss). Já a porcentagem de deposição de colágeno no fígado foi determinada em um total de 10 granulomas não coalescentes escolhidos aleatoriamente, para cada amostra. Para a realização desta análise foi realizada a captura de imagens dos granulomas utilizando a câmera digital modelo D3200 (Nikon, Tailândia) adaptado a um microscópio DM1000 LED (Leica, Wetziar, Alemanha), com aumento de 200x. A seguir, o software Image J v1.48 (Disponível em: <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>) foi utilizado para a análise das imagens

obtidas. Durante a análise no ImageJ, foi utilizada uma gráticula com 96 pontos equidistantes no campo da imagem histológica e os pontos com presença da coloração pelo tricrômio de Masson foram contabilizados para a determinação do percentual da área do granuloma que correspondia a deposição de colágeno.

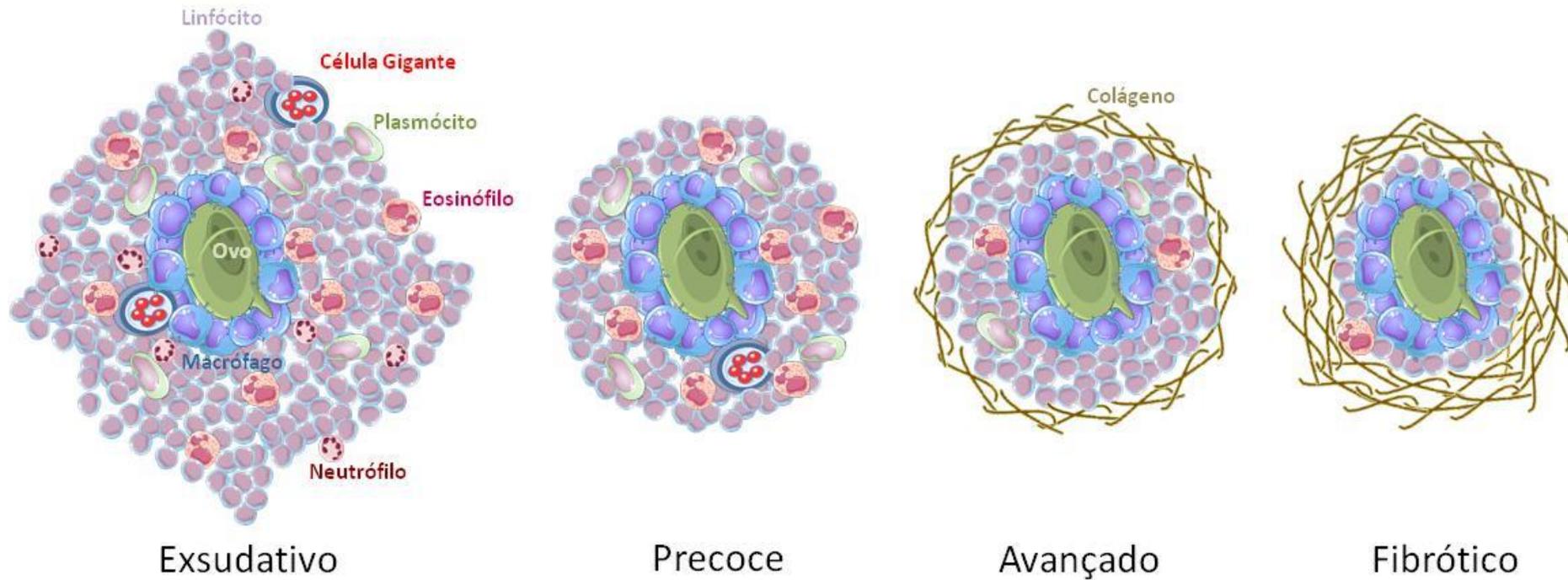


Figura 10: Representação esquemática das fases e composição celular do granuloma. Exsudativo: caracteriza-se pelo preparo do espaço ao redor do ovo do parasito, para o estabelecimento e organização da reação granulomatosa, com destruição focal da parede vascular envolvida e / ou parênquima adjacente e presença abundante de linfócitos, eosinófilos, macrófagos e outras células imunológicas como plasmócitos, neutrófilos e células gigantes. Precoce: involucional com dissociação de fibras colágenas. Avançado: involucional com camada fina de colágeno. Fibrótico: involucional com camada espessa de colágeno.

4.12 Citometria de Fluxo

Para analisar a resposta inflamatória localizada e sistêmica, foram obtidos leucócitos do fígado e do baço dos animais para análise por citometria de fluxo. Para obtenção dos leucócitos do fígado, o lobo medial direito foi fragmentado utilizando tesoura estéril em tubo cônico contendo 10 mL de colagenase do tipo II 0,15% (Life Technologies) diluído em meio RPMI 1640 (Gibco). O tecido foi incubado a 37°C e homogeneizado periodicamente durante uma hora. O material digerido foi transferido para um tubo de 50 mL, o volume foi ajustado para 30 mL com meio RPMI e centrifugado a 300 xg, por 5 minutos, a 4°C. A seguir, o precipitado foi ressuspenso em 30 mL de meio RPMI e centrifugado novamente a 60 xg, por 3 minutos e a 4°C. O sobrenadante contendo os leucócitos foi recolhido e filtrado com “*cell strainer*” 70 µm (BD) em novo tubo de 50 mL. Após uma nova centrifugação a 300 xg, por 5 minutos e a 4°C, o sobrenadante foi descartado até a marca de 10 mL e transferido para um tubo de 15 mL. Em seguida, as células foram centrifugadas a 300 xg, por 5 minutos e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e os eritrócitos contaminantes foram removidos por lise hipotônica em água destilada e a isotonicidade foi restaurada pela adição de PBS 1,5 M. Logo após, foi feita outra filtragem com cell strainer 70 µm (BD) e as células foram transferidas para um novo tubo de 15 mL. As células foram centrifugadas a 300 xg, por 5 minutos e a 4°C e criopreservadas a -80°C utilizando uma metodologia semelhante à que foi descrita no tópico 4.3, substituindo o meio DMEM (Gibco) por RPMI 1640 (Gibco). Com os leucócitos do fígado criopreservados pretende-se avaliar a frequência de linfócitos T (Th1, Th2 e Th17) e B, célula natural killer, eosinófilos, neutrófilos, monócitos, macrófagos, além dos níveis intracelulares de ROS e RNS (SHAWN *et al.*, 2012). Já a obtenção dos leucócitos esplênicos foi efetuada macerando o baço em meio RPMI 1640 contendo 40 µg/mL de gentamicina. As suspensões de células foram passadas uma vez através de um filtro de 70 µm (BD Biosciences) e transferidas para um tubo estéril de 50 mL. Os eritrócitos contaminantes foram removidos por lise hipotônica em água destilada e a isotonicidade foi restaurada pela adição de PBS 1,5 M. As células foram sedimentadas a 350 xg durante 10 minutos e depois ressuspenso em 1 mL de meio RPMI 1640 contendo 40 µg/mL de gentamicina. Em seguida, as células foram contadas em solução de Turk (1:20) utilizando uma câmara de

Neubauer. Em seguida, os esplenócitos dos camundongos foram semeados em placas de 96 poços com fundo em U (BD) (1×10^6 células/poço) e incubados por 30 minutos, protegidos da luz e a 4°C, com os anticorpos citados na tabela 2.

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para marcação dos esplenócitos para análise por citometria de fluxo

Anticorpo-Fluoróforo	Marca	Diluição	Clone	Número de catálogo	Conc. final ($\mu\text{g/mL}$)	Função e célula em que está expresso
Anti-CD3 FITC	BD	1:400	145-2C11	553062	1,25	Co-receptores de células T que juntamente com as cadeias ζ e o TCR formam o complexo TCR. Linfócitos T.
Anti-CD4 PerCP	BD	1:400	RM4-5	553052	0,5	Co-receptor de linfócitos T CD4 que juntamente com o TCR se liga ao MHC II. Linfócitos T CD4 e monócitos.
Anti-CD8 PerCP	BD	1:400	53-6.7	553036	0,5	Co-receptor de linfócitos T CD8 T que juntamente com o TCR se liga ao MHC I Linfócitos T CD8 e células NK.
Anti-CD28 APC	eBiosciense	1:400	37.51	1702818 2	0,5	Co-estímulo. Células T, timo, plasma, NK.
Anti-CD69 PE	BD	1:400	H1.2F3	553237	0,5	Ativação, co-estímulo, sinalização. Leucócitos, NK, Langerhans
Anti-CTLA4 APC	eBiosciense	1:400	UC10-4B9	1715228 2	0,5	Regulação negativa do linfócito T ativado. Linfócitos T e B ativados

Após a marcação, as células foram fixadas com formaldeído a 2% em PBS 0,15 M, pH 7,0 e armazenadas no refrigerador até a aquisição dos dados. Um mínimo de 30.000 eventos foi adquirido usando o citômetro FACSCalibur (BD Biosciences) e os dados foram analisados utilizando o software FlowJo 10.1 (FlowJo, Oregon, EUA). A estratégia de análise utilizada para avaliação dos esplenócitos encontra-se na figura 11.

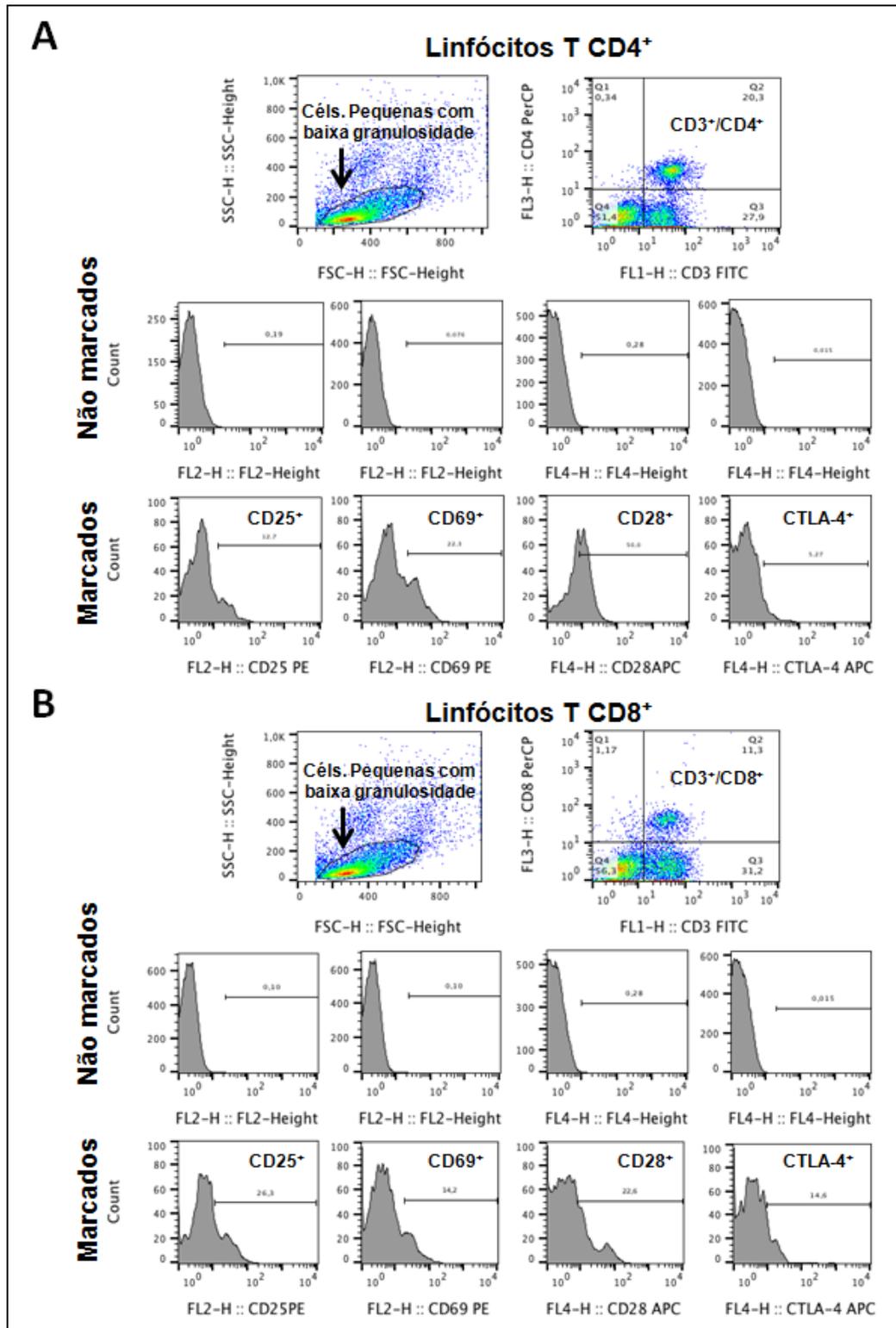


Figura 11: Estratégia de análise dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. Inicialmente, em um gráfico SSC-H versus FSC-H foi selecionada a população de tamanho pequeno e baixa granulosidade (A). A seguir, os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foram selecionados em duas etapas. Com o gráfico de CD3 versus CD4 foram selecionados os linfócitos T CD4⁺, foram obtidos histogramas para determinação da frequência de células expressando CD25, CD28, CTLA-4 ou CD69 (B). Posteriormente, CD3 versus CD8 foram selecionados os linfócitos T CD8⁺, gerando os histogramas para determinação da frequência de células expressando CD25, CD28, CTLA-4 ou CD69.

4.13 Detecção de citocinas

Os níveis de citocinas foram analisados no soro dos camundongos e no fragmento do fígado coletado. Para a dosagem *in situ*, um lobo do fígado foi pesado em balança analítica e transferido para um tubo de 1,5 mL (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) contendo 500 µL de inibidor de protease cOmplete Mini EDTA-free (Roche, Basileia, Suíça). Os lobos foram macerados imediatamente utilizando um macerador automático Pellet Pestle® Motor (Thomas scientific, NJ, EUA) e armazenados a -80°C para posterior análise por citometria de fluxo. Já as amostras de soro foram obtidas de sangue, centrifugado 350 xg por 5 minutos, que foi coletado após a secção do plexo braquial. Todas as amostras de soro foram armazenadas a -80°C até serem testadas individualmente para citocinas. As amostras foram descongeladas e centrifugadas (amostras *in situ*) a 1811 xg por 15 minutos a 4°C, os níveis de IL-10, IL-17α, TNF-α, IFN-γ, IL-6, IL-4 e IL-2 foram quantificados usando o BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Bioscience, San Diego, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Os dados foram adquiridos usando o citômetro de fluxo FACSverse (BD) e a análise do CBA foi realizada no software CellQuest (BD), com os resultados representados em pg / mL. Os dados das amostras de soro foram adquiridos usando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD) e analisados usando o software BD Cytometric Bead Array Analysis (BD).

4.14 Análise dos níveis séricos de óxido nítrico

Os níveis de NO foram avaliados indiretamente pela quantificação de nitrito (NO_2^-) no soro dos animais. Resumidamente, o soro foi desproteinizado como descrito por Cicinelli *et al*, 1999. Logo em seguida, 100 µL de cada amostra foram incubados com volumes iguais de reagente de Griess (sulfanilamida a 1% e dihidroclorato de n-(1-naftil) etilenodiamina a 0,1% em H_3PO_4 a 2,5%). A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (Spectramax 340PC, Molecular Devices, Califórnia, EUA) em comprimento de onda de 540 nm. Nitrito de sódio (NaNO_2) em água destilada foi usado como padrão. Os resultados foram expressos em µM.

4.15 Análises bioquímicas

Com os soros obtidos dos camundongos foram analisados os níveis séricos de bilirrubina total (BT), albumina (Alb) e alanina aminotransferase (ALT). Os níveis séricos de BT, Alb e ATL foram mensurados utilizando os kits comerciais e métodos listados na tabela 3. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro (Spectramax 340PC, Molecular Devices, Califórnia, EUA).

Tabela 3 - Kits utilizados para as análises bioquímicas do soro de camundongos

Exame	Kit	Marca	Método
Bilirrubina (mg/dL)	K005	Bioclin	Roy modificado
Albumina (g/dL)	K040	Bioclin	Verde de bromocresol
Alanina aminotransferase (U/mL)	K035	Bioclin	Reitmamm e Frankel

4.16 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas empregando-se o software Prism 5.0 (Graphpad, La Jolla, California USA). Para comparação entre dois grupos foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para comparação entre mais do que dois grupos foi empregado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn. As diferenças entre as variáveis foram consideradas significativas quando a probabilidade bi-caudal da sua ocorrência devido ao acaso (erro tipo I) foi menor que 5% ($P < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 As células isoladas do tecido adiposo inguinal eram células-tronco mesenquimais

Neste estudo, as CTM foram isoladas do tecido adiposo. A aderência em frascos de cultura é uma estratégia para isolar e purificar estas células. As CTM-TA proliferaram de forma homogênea, apresentando uma monocamada composta por células aderentes, formando colônias com morfologia semelhante à dos fibroblastos (Figura 12A). Ao realizarmos o ensaio do MTT, verificamos que as CTM-TA em terceira passagem apresentavam alta viabilidade (Figura 12B).

Antes do uso das CTM nos ensaios terapêuticos, as CTM foram caracterizadas fenotípica e funcionalmente pela expressão diferencial de marcadores celulares hematopoiéticos e mesenquimais, e sua capacidade de se diferenciar em outras linhagens celulares. Encontramos um número reduzido de células expressando os marcadores hematopoiéticos CD34 (2,12%) e CD45 (1,81%) e número significativo de células expressando os marcadores celulares não hematopoiéticos CD29 (74,2%), CD71 (42,6%) e CD90 (55,1%) (Figura 12C), indicando que as células recuperadas eram CTM, já que essas células se caracterizam pela baixa expressão de marcadores hematopoiéticos e alta expressão de marcadores não hematopoiéticos.

A população de CTM-TA foi ainda analisada pela sua capacidade de se diferenciar em osteoblastos, adipoblastos e condroblastos. Para promover a diferenciação nas diferentes linhagens, as CTM-TA foram cultivadas com meios de cultura contendo indutores de diferenciação para cada linhagem celular, durante 14 e 21 dias. A diferenciação osteogênica foi confirmada pela visualização dos nódulos de mineralização na matriz extracelular, evidenciados pela coloração de Von Kossa (Figuras 12D). Já as CTM-TA cultivadas com meio de cultura contendo indutores adipogênicos mostraram corpúsculos lipídicos intracelulares evidenciados pela coloração com Oil Red O (Figuras 12D). Além disso, as CTM-TA também se diferenciaram em condroblastos quando cultivadas com o meio condrogênico Stem Pro Chondrogenesis Differentiation (Life Technologies) e a diferenciação foi constatada pela visualização de proteoglicanos e glicosaminoglicanos após

coloração com Alcian Blue (Figura 12D). Estes resultados confirmaram que as células utilizadas neste estudo eram de fato células-tronco mesenquimais.

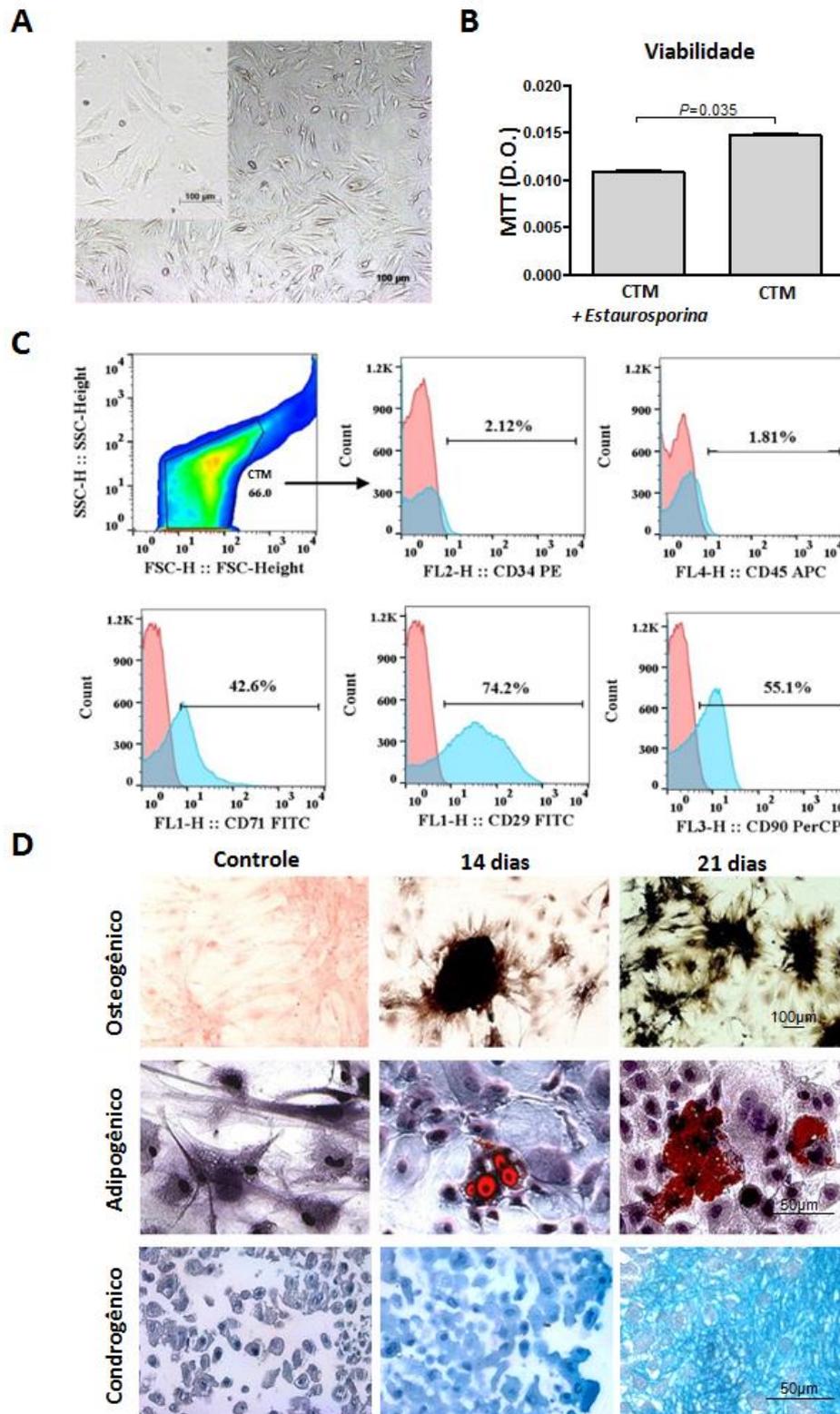


Figura 12. Caracterização fenotípica e funcional de células-tronco derivadas do tecido adiposo (CTM-TA). (A) CTM-TA na 3ª passagem de cultura apresentando morfologia semelhante a fibroblastos. (B) Viabilidade de CTM-TA avaliada pelo ensaio de MTT. (C) Histogramas para marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais. (D) Caracterização funcional, capacidade

das CTM-TA de se diferenciarem em osteoblastos, adipoblastos e condroblastos após 14 e 21 dias de cultura com o respectivo meio indutor de diferenciação.

5.2 Células-tronco mesenquimais tdTomato⁺ foram encontradas nos pulmões e no fígado

Para confirmar a presença de CTM no fígado após sua injeção via intravenosa, utilizamos células expressando em sua membrana plasmática a proteína tdTomato⁺ de fluorescência vermelha. Após um, oito e quinze dias da injeção intravenosa de CTM tdTomato⁺, analisamos secções do fígado e pulmões dos camundongos. Após um e oito dias da injeção de CTM tdTomato⁺, as células foram detectadas nos pulmões (Figura 13). Já no período de quinze dias após a injeção intravenosa, células tdTomato⁺ foram observadas apenas no fígado (Figura 14).

PULMÕES

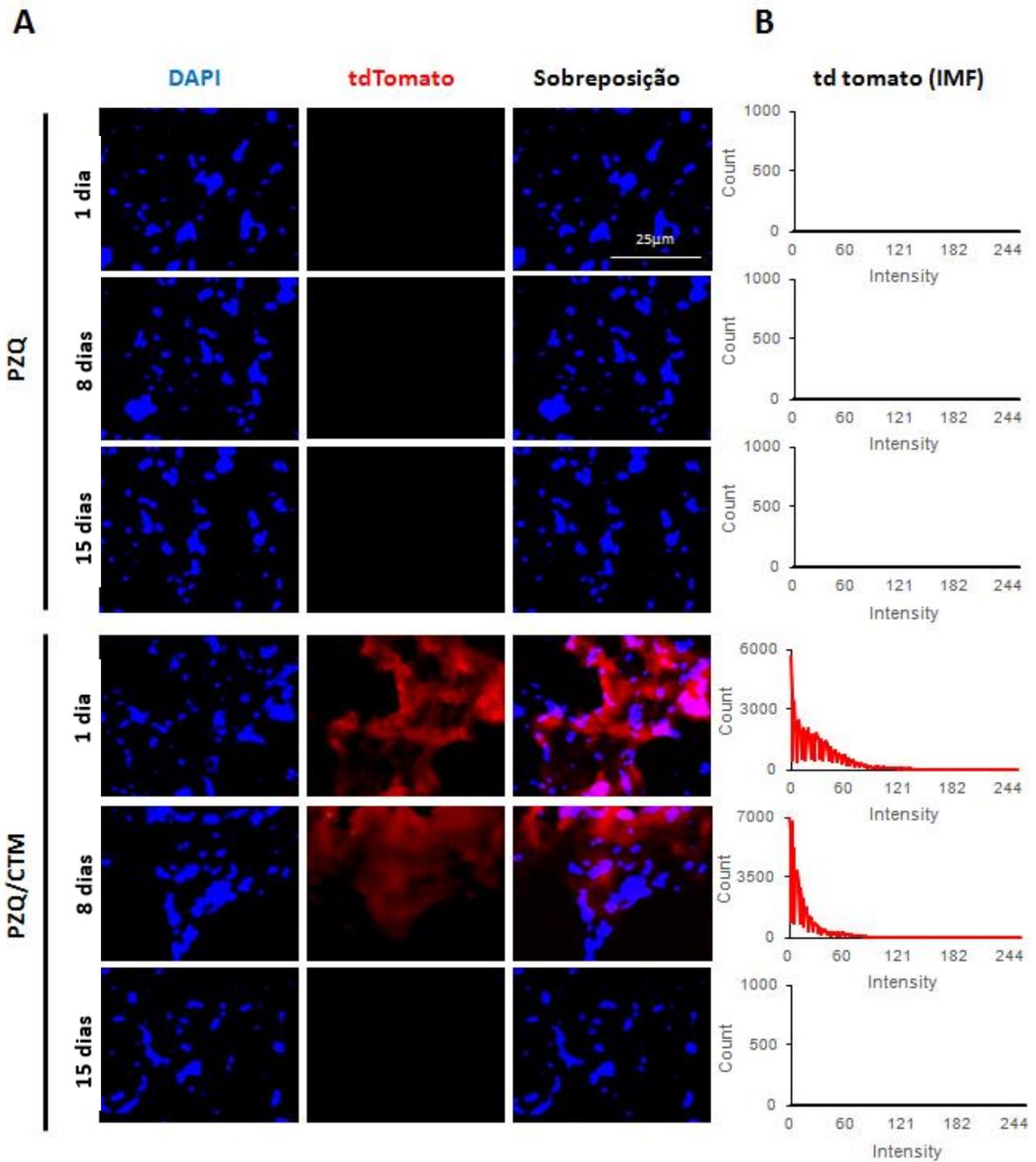


Figura 13. Rastreamento de CTM tdTomato⁺ nos pulmões. Camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* tratados com PZQ/CTM. Os camundongos receberam injeção de CTM, expressando a proteína fluorescente vermelha tdTomato. Após um, oito e quinze dias, os camundongos foram submetidos à eutanásia e os pulmões foram coletados. Os órgãos foram congelados e crio-seções foram coradas com DAPI. Imagens de 1388x1040 pixels foram capturadas utilizando microscópio de fluorescência acoplado à câmera digital. Em (A) e (B): Imagens e histogramas obtidos após análise de imagem do pulmão mostrando ausência de fluorescência vermelha no grupo tratado com PZQ. Imagens (A) e histogramas (B) obtidos após análise de imagem do pulmão mostrando fluorescência vermelha nos dias um e oito após injeção de CTM tdTomato⁺.

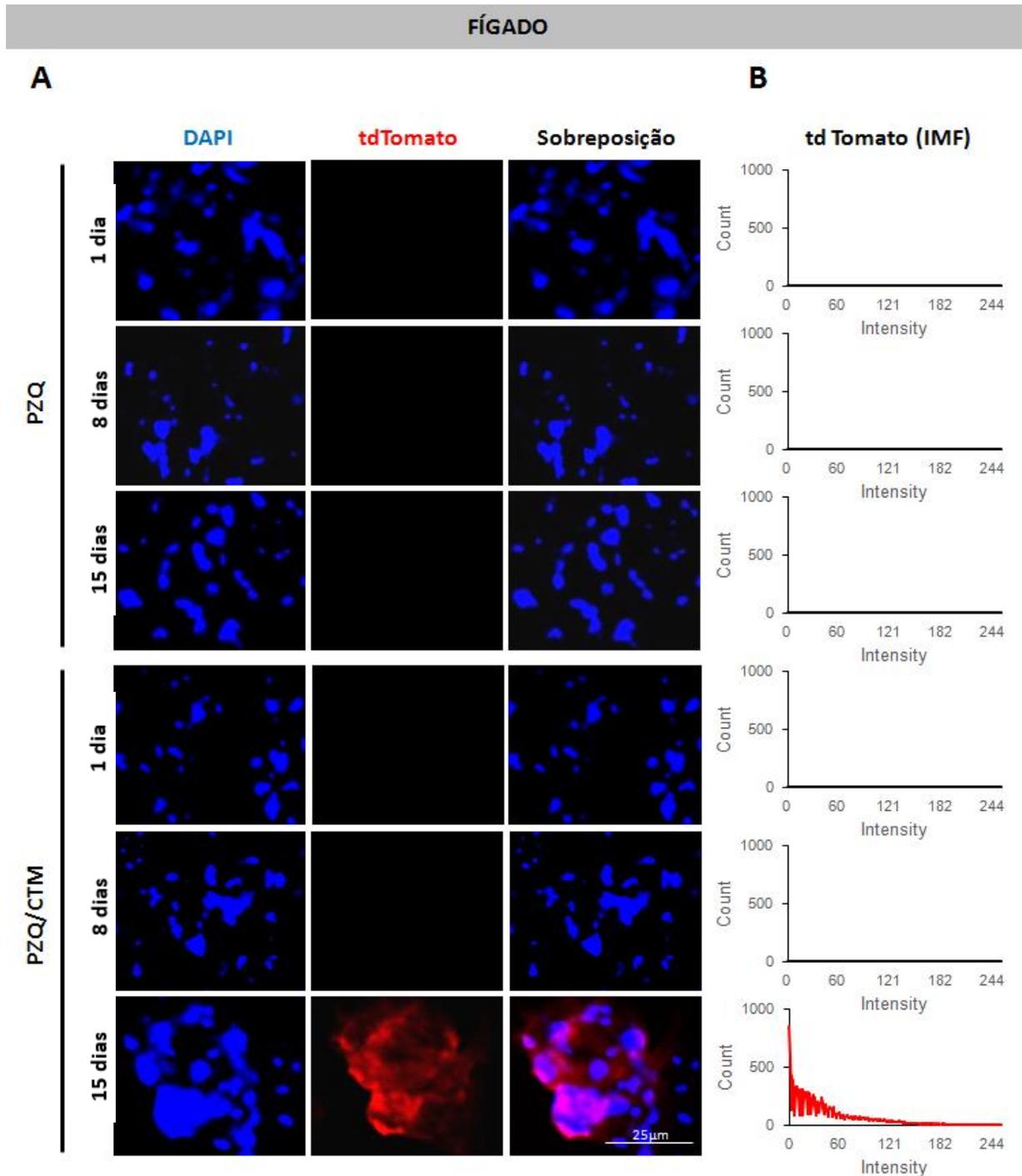


Figura 14. Rastreamento de CTM tdTomato⁺ no fígado. Camundongos C57BL/6 infectados pelo *S. mansoni* tratados com PZQ/CTM. Os camundongos receberam injeção de CTM, expressando a proteína fluorescente vermelha tdTomato. Após um, oito e quinze dias, os animais foram submetidos à eutanásia e o fígado foi coletado. Os órgãos foram congelados e crio-seções foram coradas com DAPI. Imagens de 1388 x 1040 pixels foram capturadas utilizando microscópio de fluorescência acoplado à câmera digital. Imagens (A) e histogramas (B) obtidos após análise de imagem do fígado mostrando fluorescência vermelha apenas no 15º dia após a injeção de células-tronco derivadas de tecido adiposo.

5.3 O tratamento com células-tronco mesenquimais não alterou o peso, percentual de ovos viáveis do fígado e a carga parasitária em relação ao grupo praziquantel

A esquistossomose crônica é caracterizada por reação granulomatosa com consequência patológica na função de vários órgãos, principalmente no fígado, que pode apresentar hepatomegalia. Ao analisarmos o peso total do fígado, carga parasitária e o número de ovos viáveis, vimos que todos estes parâmetros foram significativamente menores após o tratamento com PZQ, seja em terapêutica combinada ou não, quando comparado ao grupo não tratado (Figura 15). Em nosso estudo, o grupo tratado apenas com CTM apresentou resultados semelhantes ao grupo não tratado, visto que estas células não apresentam atividade anti-helmíntica. A postura contínua de ovos pela fêmea adulta de *S. mansoni*, promove a formação de novos granulomas e lesões. Portanto, decidimos não expressar na forma de gráficos os resultados relacionados a este grupo.

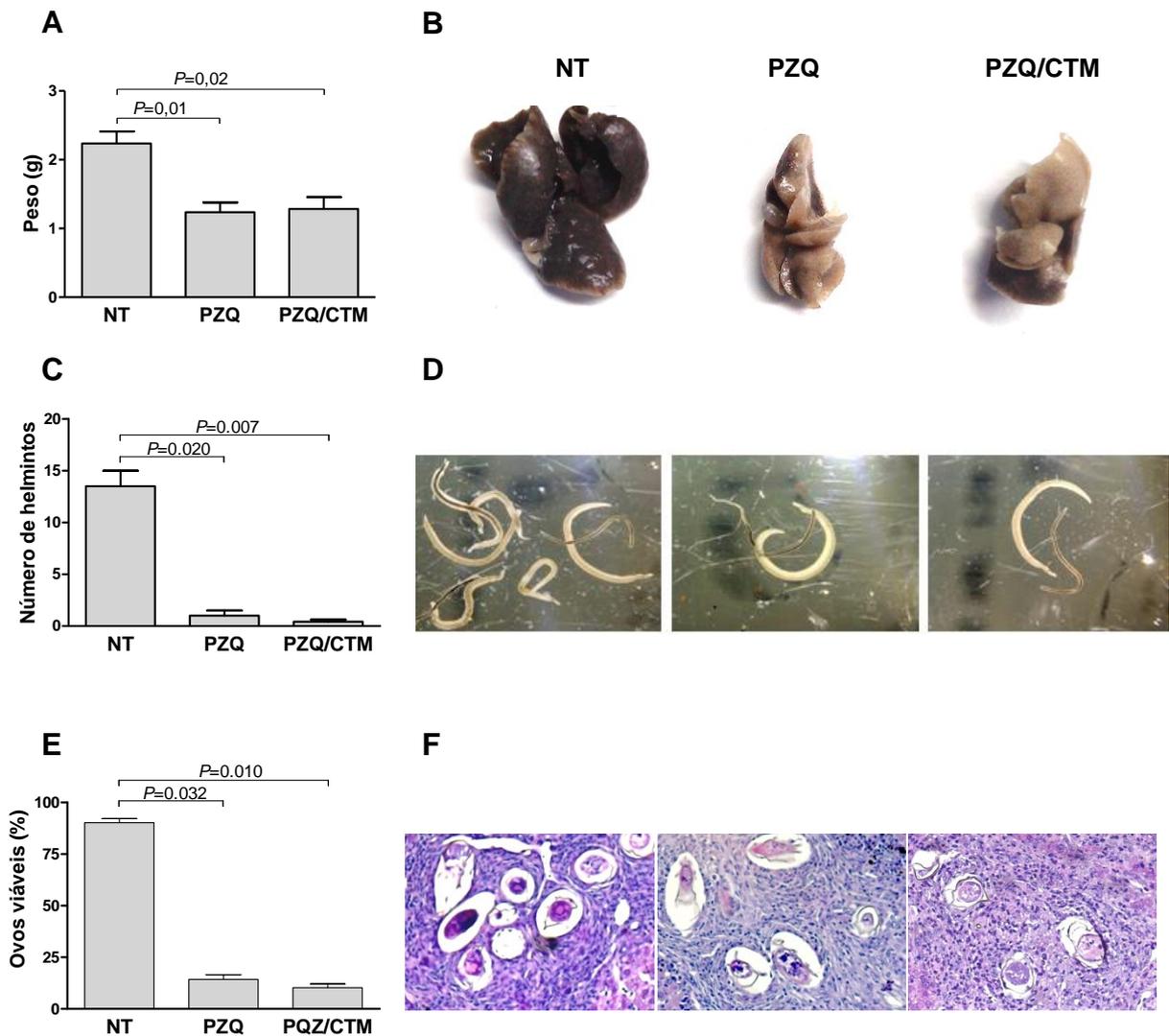


Figura 15. Peso total do fígado, número de vermes recuperados e viabilidade dos ovos encontrados no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni* tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo. (A) Peso do fígado. (B) Imagens representativas do fígado dos animais. (C) Número de helmintos recuperados de vasos mesentéricos (D) Imagens representativas dos vermes adultos recuperados. (E) Percentual de ovos viáveis. (F) Imagens representativas dos ovos viáveis e inviáveis após coloração com hematoxilina & eosina. Aumento de 100x. Ovos viáveis apresentavam núcleos hiper-crômicos. Ovos Inviáveis apresentavam poucos núcleos corados com hematoxilina. (A), (C) e (E) Dados representam médias \pm desvio padrão. NT= grupo não tratado. PZQ=grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = Praziquantel mais grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo.

5.4 O tratamento com células-tronco mesenquimais reduziu o número de granulomas hepáticos em relação ao grupo não tratado

Analizamos o número de granulomas em cortes histológicos do fígado corados com H.E. e verificamos que o número de granulomas foi significativamente reduzido ($P=0,004$) apenas após o tratamento com CTM (Figura 16).

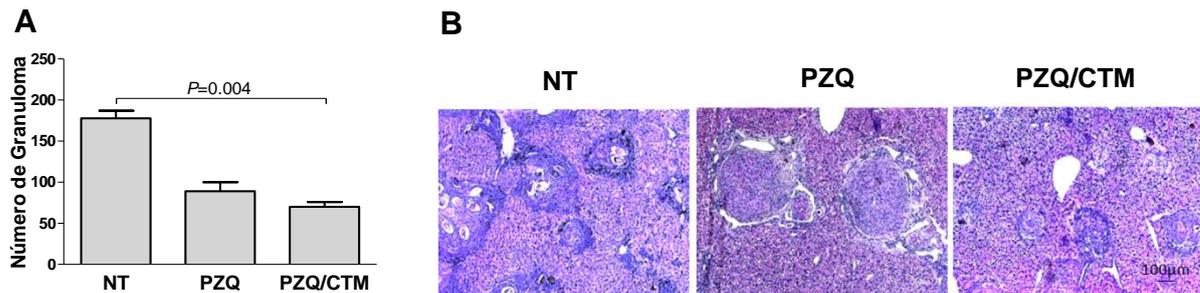


Figura 16. Análise do número de granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni* tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo. (A) Número de granulomas em cinco campos. Dados representam médias \pm desvio padrão. (B) Imagens representativas da quantidade de granulomas nos diferentes grupos de estudo após coloração com hematoxilina & eosina. Aumento de 40x. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = Praziquantel mais grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo.

5.5 O tratamento com células-tronco mesenquimais promoveu uma involução mais rápida dos granulomas

A formação do granuloma ocorre partindo de uma fase inicial desordenada e, pouco a pouco, forma-se um esqueleto randômico entremeado em padrões específicos. Os granulomas podem ser classificados em diferentes fases de acordo com sua composição celular. Em nosso estudo, o grupo NT apresentou a maior parte dos granulomas na fase exsudativa, ricos em linfócitos, macrófagos, eosinófilos, plasmócitos, células gigantes multinucleadas, além de neutrófilos (Figura 17). Já o grupo PZQ apresentou a maior parte dos granulomas na fase precoce, isto é, ricos em linfócitos, macrófagos, eosinófilos, plasmócitos e células gigantes multinucleadas (Figura 17). O grupo PZQ/CTM apresentou a maior parte dos granulomas na fase avançada, ricos em linfócitos, macrófagos, eosinófilos e plasmócitos (Figura 17). Além disso, este grupo também foi o que apresentou um número significativo de granulomas na fase fibrótica, ricos em linfócitos, macrófagos

e eosinófilos, em relação aos demais grupos. Estes resultados sugerem que o tratamento com PZQ/CTM leva a uma rápida resolução dos granulomas decorrentes da infecção com *S. mansoni*.

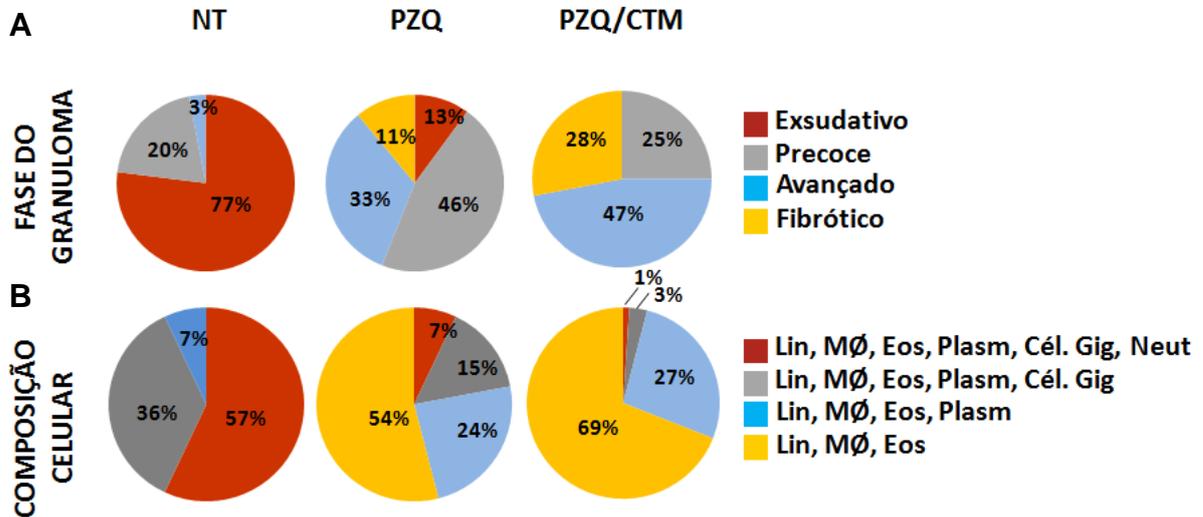


Figura 17. Análise da fase e composição celular dos granulomas no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni* tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo. (A) Fase dos granulomas. (B) Composição celular dos granulomas. Dados representam médias \pm desvio padrão. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = Praziquantel mais grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo. Lin = linfócitos, MΦ = monócitos, Eos = eosinófilos, Plasm = plasmócitos, Cel. Gig = células gigantes, Neut = neutrófilos.

5.6 O tratamento com células-tronco mesenquimais não alterou a deposição de colágeno nos granulomas em relação ao grupo praziquantel

O aumento da deposição de colágeno nos tecidos pode indicar um mecanismo de reparo após lesões exacerbadas. Portanto, quantificamos o colágeno nos grupos após os tratamentos recebidos. Os grupos PZQ ($P=0.007$) e PZQ/CTM apresentaram uma redução ($P<0.0001$) no depósito de colágeno quando comparados ao grupo NT (Figura 18). Não encontramos diferenças significativas ao compararmos os grupos PZQ e PZQ/CTM.

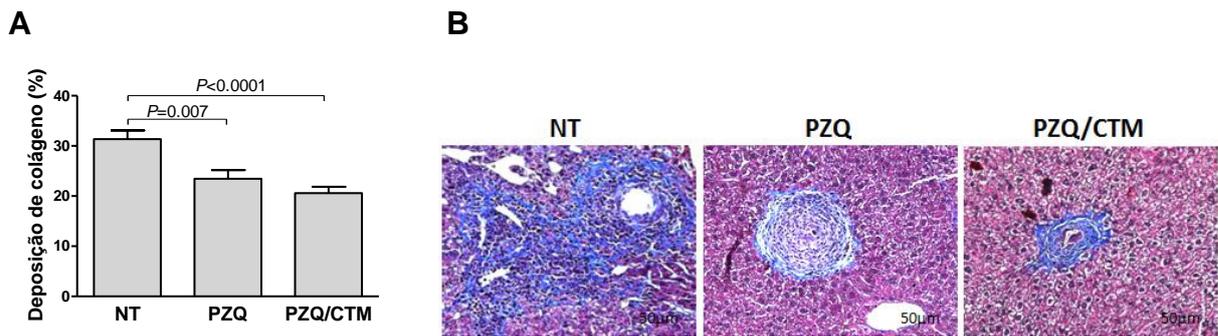


Figura 18. Análise da deposição de colágeno em granuloma no fígado de camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni* tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo. (A) Percentual da área do granuloma constituída por colágeno. Dados representam médias \pm desvio padrão. (B) Imagens representativas de granulomas nos diferentes grupos de estudo após coloração com Tricrômio de Masson. Aumento de 100x. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = Praziquantel mais grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo.

5.7 O tratamento com células-tronco mesenquimais aumentou a frequência de linfócitos T CD4⁺/CD28⁺ em relação ao grupo não tratado, mas não alterou a ativação dos linfócitos T CD8⁺ em relação ao grupo praziquantel

Para avaliar se o tratamento com CTM influenciava no estado de ativação dos linfócitos T, avaliamos a frequência de linfócitos TCD4⁺ e CD8⁺ expressando CD25, CD69, CD28 e CTLA-4 no baço de camundongos C57BL/6 com esquistossomose crônica, tratados com PZQ associado ou não com CTM. Observamos que o tratamento com PZQ induziu um aumento significativo da expressão de CD69 e CTLA-4 nos linfócitos TCD4⁺ que permaneceu após o tratamento com CTM. Neste grupo (PZQ/CTM), também foi significativa a expressão de CD28 (Figura 19A). Similar aos linfócitos TCD4⁺, as células TCD8⁺ também apresentaram um aumento significativo da expressão de CD69 e CTLA-4 após os tratamentos com PZQ e PZQ/CTM. Porém, houve uma redução significativa na expressão de CD25 nas células TCD8⁺ após os tratamentos recebidos (Figura 19B), sendo que nas células TCD4⁺ não observamos alteração significativa na expressão dessa molécula (Figura 19A). Diferente dos linfócitos TCD4⁺, a expressão de CD28⁺ foi significativa apenas no tratamento com PZQ quando comparado ao grupo NT (Figura 19B). De forma geral, os tratamentos potencializaram a expressão de marcadores de ativação nos linfócitos T, principalmente nas células TCD4⁺.

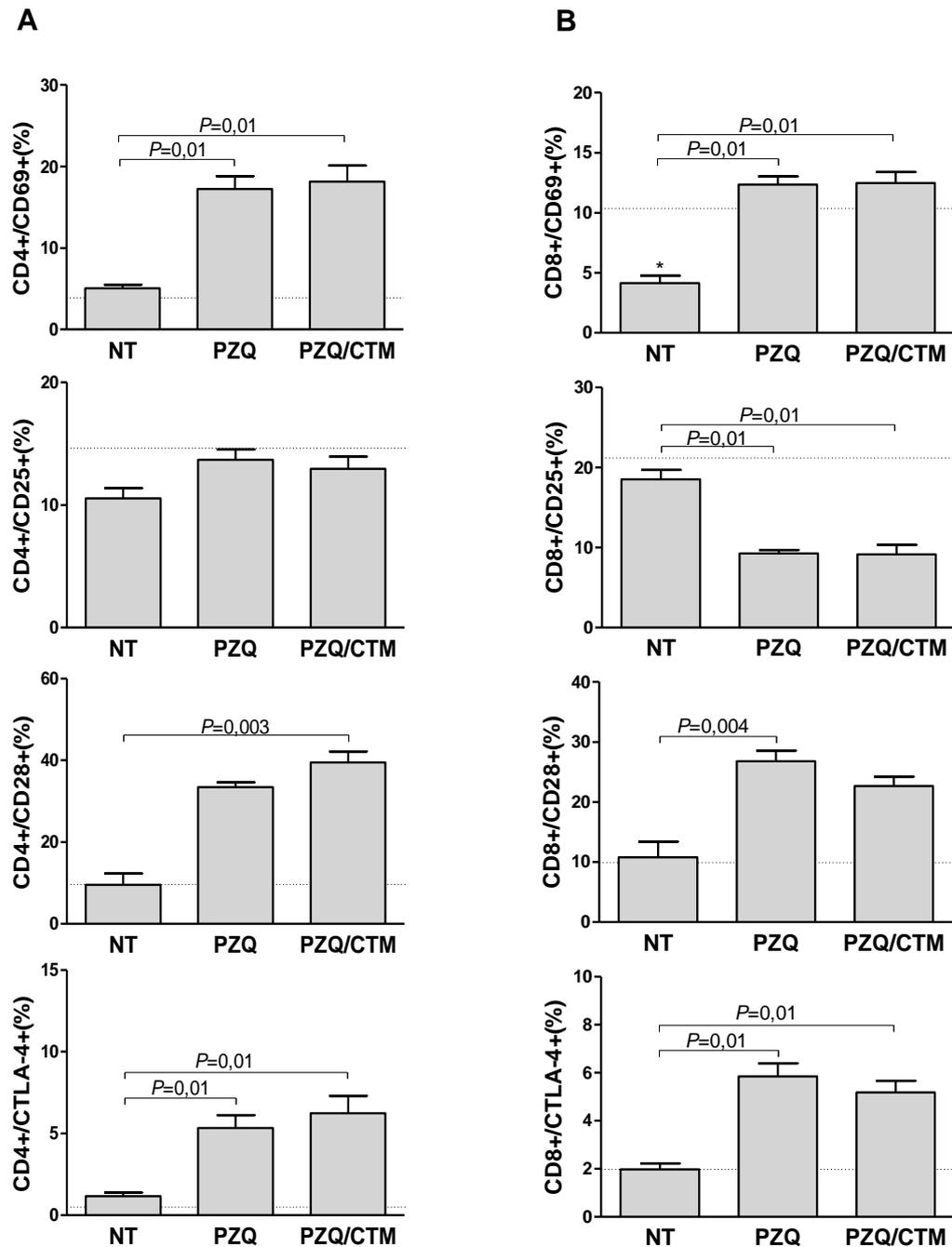


Figura 19: Perfil de ativação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no baço. Camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni* tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo. Linfócitos T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) expressando CD69, CD25, CD28 e CTLA-4. Dados representam médias \pm desvio padrão. A linha pontilhada representa o valor médio do grupo saudável. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = Praziquantel mais grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo. (*) Indica uma diferença significativa entre os grupos saudável e não tratado.

5.8 O tratamento com células-tronco mesenquimais não alterou os níveis séricos de citocinas em relação ao grupo praziquantel

Para analisar se o tratamento com CTM alterava a produção de citocinas, analisamos após 15 dias do tratamento com CTM os níveis séricos de IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-6 e IL-4. Observamos que todas as citocinas, exceto IL-17 α , apresentaram níveis significativamente menores nos grupos tratados com PZQ ou PZQ/CTM, quando comparados ao grupo NT. Ambos os tratamentos, PZQ e PZQ/CTM, levaram a um reestabelecimento dos níveis séricos de citocinas que foram semelhantes aos níveis do grupo NI (Figura 20).

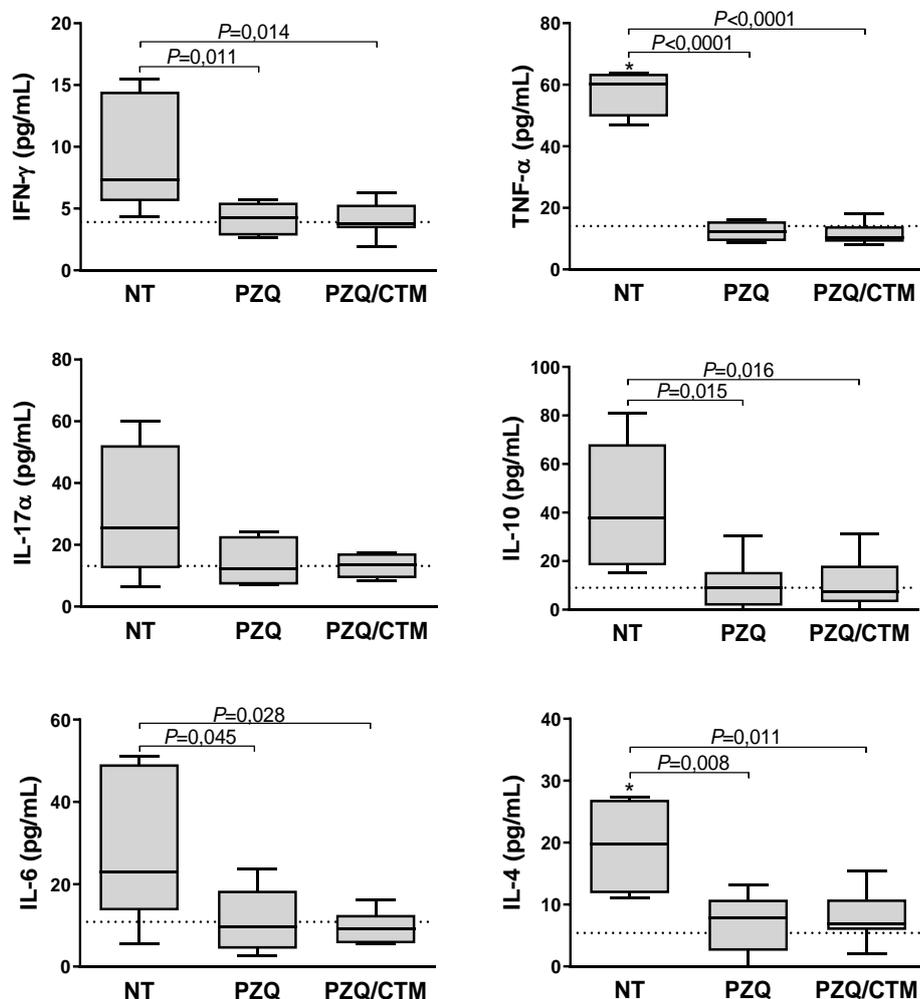


Figura 20: Dosagem dos níveis séricos de citocinas em animais convencionais no tempo de 15 dias após terapêutica com CTM. Camundongos C57BL/6 convencionais infectados por *S. mansoni* tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo. Dados representam medianas \pm desvio padrão. A linha pontilhada representa o valor da mediana do grupo saudável. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = Praziquantel

mais grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo. (*) Indica uma diferença significativa entre os grupos saudável e não tratado.

5.9 O tratamento com células-tronco mesenquimais aumentou os níveis *in situ* de IL-10 e IL-2 no tempo de 8 dias e aumentou os níveis *in situ* de IL-10 e IL-17 α no tempo de 15 dias em relação ao PZQ

Os resultados apresentados na figura 20 mostraram que as CTM-TA não alteraram o perfil de citocinas sistêmica, como observado no tratamento com PZQ. De acordo com a literatura, esperávamos observar um efeito significativo nos níveis de citocinas decorrente do tratamento com CTM. Desta forma, algumas questões foram levantadas para a análise de citocinas: 1- animais SPF seriam mais adequados para analisar o efeito das CTM nos biomarcadores de inflamação (citocinas e NO) e dano hepático (ALT, Alb e bilirrubina)? 2- a dosagem dos níveis das citocinas *in situ* (fígado) revelariam diferenças significativas decorrente do tratamento com CTM? 3- a análise anterior ao tempo de 15 dias após a injeção das CTM seria melhor para a dosagem das citocinas? Sendo assim, para responder a essas questões avaliamos biomarcadores de inflamação e dano hepático em camundongos SPF, sendo as citocinas analisadas *in situ* (fígado) e sistêmico, nos tempos de 8 e 15 dias após a injeção de CTM.

A figura 21 refere-se às análises das citocinas sistêmicas em camundongos SPF, após 8 e 15 dias da injeção de CTM. Os tratamentos não alteraram os níveis de citocinas no tempo de 8 dias. Somente no tempo de 15 dias, o tratamento com CTM interferiu nos níveis de IL-6 e TNF- α , reduzindo-os significativamente, quando comparado ao grupo NT (Figura 21).

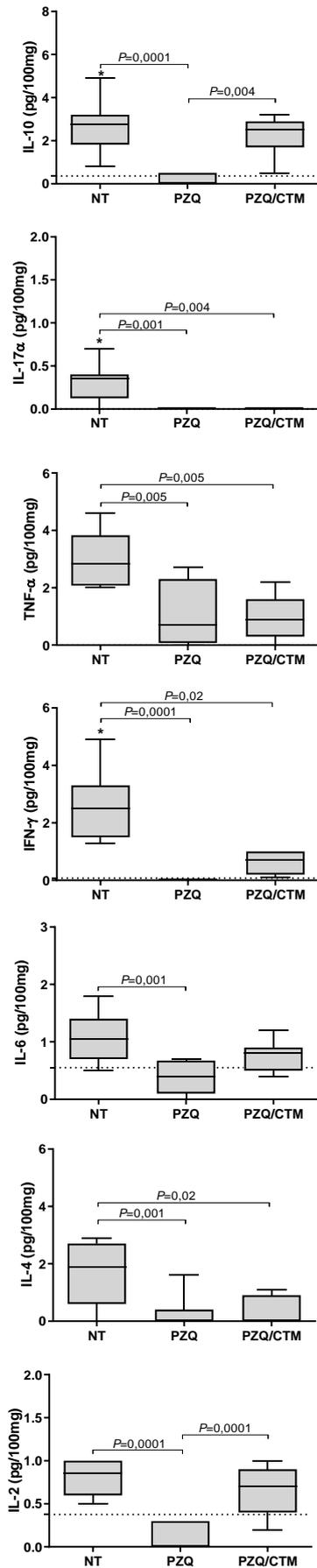
Figura 21: Dosagem dos níveis séricos de citocinas em camundongos SPF nos tempos de 8 e 15 dias após terapêutica com CTM. Camundongos C57BL/6 SFP infectados por *S. mansoni* tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo. Dados representam medianas \pm desvio padrão. A linha pontilhada representa o valor da mediana do grupo saudável. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = Praziquantel mais grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo. (*) Indica uma diferença significativa entre os grupos saudável e não tratado.

5.10 O tratamento com células-tronco mesenquimais reduziu os níveis séricos de TNF- α e IL-6, no tempo de 15 dias, em relação ao grupo não tratado

A figura 22 refere-se às análises das citocinas *in situ* em camundongos SPF, após 8 e 15 dias da injeção de CTM. O tratamento com PZQ reduziu significativamente os níveis de IL-2 e IL-10, analisados no tempo de 8 dias, quando comparado ao grupo NT (Figura 22). Porém, o tratamento com PZQ/CTM reverteu esses níveis significativamente em relação ao grupo PZQ, reestabelecendo-os aos níveis do grupo NT. Ambos os tratamentos diminuíram significativamente os níveis de IL-17 α , TNF- α , IFN- γ e IL-4 no tempo de 8 dias, quando comparados ao grupo NT. Ainda no tempo de 8 dias, os níveis da citocina IL-6 diminuíram significativamente no grupo PZQ, quando comparado ao grupo NT.

No tempo de 15 dias, observamos que ambos os tratamentos (PZQ e PZQ/CTM) reduziram significativamente os níveis das citocinas IFN- γ e IL-4, quando comparados ao grupo NT. O tratamento com PZQ/CTM elevou significativamente os níveis de IL-10 quando comparado ao grupo tratado somente com PZQ (Figura 22). O mesmo resultado foi observado para a citocina IL-17 α que apresentava níveis significativamente reduzidos no grupo PZQ quando comparado ao grupo NT. Similar ao tempo de 8 dias, os níveis de IL-6 diminuíram significativamente no tratamento com PZQ, comparado ao grupo NT (Figura 22). De forma geral, as análises *in situ* revelaram que o tratamento com CTM induziram um aumento significativo com relação ao grupo PZQ de IL-2 e IL-10 após 8 dias de sua injeção, sendo que os níveis de IL-10 permaneceram significativos após 15 dias. Além disso, nesse mesmo tempo, os níveis de IL-17 α também foram induzidos significativamente pelas CTM.

8 dias



15 Dias

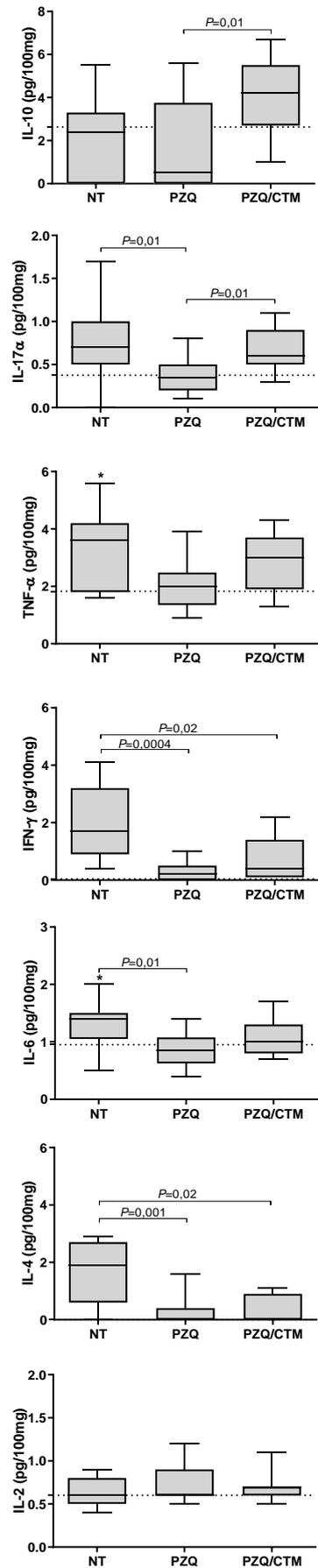


Figura 22: Dosagem dos níveis de citocinas *in situ* (fígado) nos tempos de 8 e 15 dias após terapêutica com CTM. Camundongos C57BL/6 SFP infectados por *S. mansoni* tratados com praziquantel associado a células-tronco derivadas do tecido adiposo. Dados representam medianas \pm desvio padrão. A linha pontilhada representa o valor da mediana do grupo saudável. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = Praziquantel mais grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo. (*) Indica uma diferença significativa entre os grupos saudável e não tratado.

5.11 O tratamento com células-tronco mesenquimais não alterou os níveis séricos de óxido nítrico nos tempos avaliados

Os níveis de NO foram avaliados pela reação de Griess. Camundongos infectados por *S. mansoni* não apresentaram diferenças nos níveis de NO quando comparados aos animais saudáveis (Figura 23). Após os tratamentos com PZQ isolado ou associado com CTM-TA, os níveis séricos médios de NO também não apresentaram diferenças significativas quando comparados os diferentes tempos de tratamento e quando comparados ao grupo não tratado.

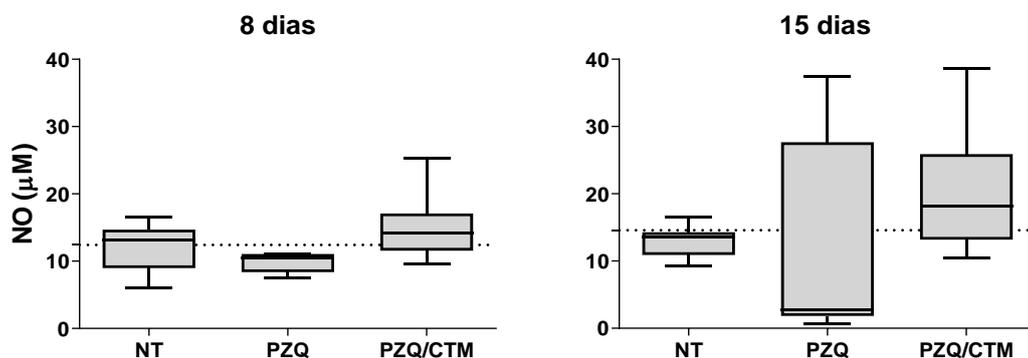


Figura 23. Dosagem dos níveis de óxido nítrico. Soro de camundongos C57BL/6 SFP infectados por *S. mansoni* tratados com PZQ ou PZQ/CTM. Dados representam a mediana \pm desvio padrão. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo.

5.12 O tratamento com células-tronco mesenquimais não alterou os níveis séricos de Alb, BT e ALT em relação ao grupo praziquantel nos tempos avaliados

Em ambos os tempos analisados, não observamos alterações significativas dos níveis de albumina, tanto no grupo NT quanto nos grupos tratados (PZQ e PZQ/CTM) (Figura 24A). O mesmo resultado foi encontrado para a dosagem de

bilirrubina, com exceção do grupo NT que apresentou níveis significativamente elevados dessa proteína no tempo de 15 dias, comparado ao grupo NI (Figura 24B). Os níveis de ALT diminuíram significativamente após os tratamentos recebidos (PZQ e PZQ/CTM), tanto no tempo de 8 quanto no de 15 dias, comparados ao grupo NT. Além disso, o grupo NT apresentou aumento significativo dos níveis de ALT em comparação ao grupo NI (Figura 24C).

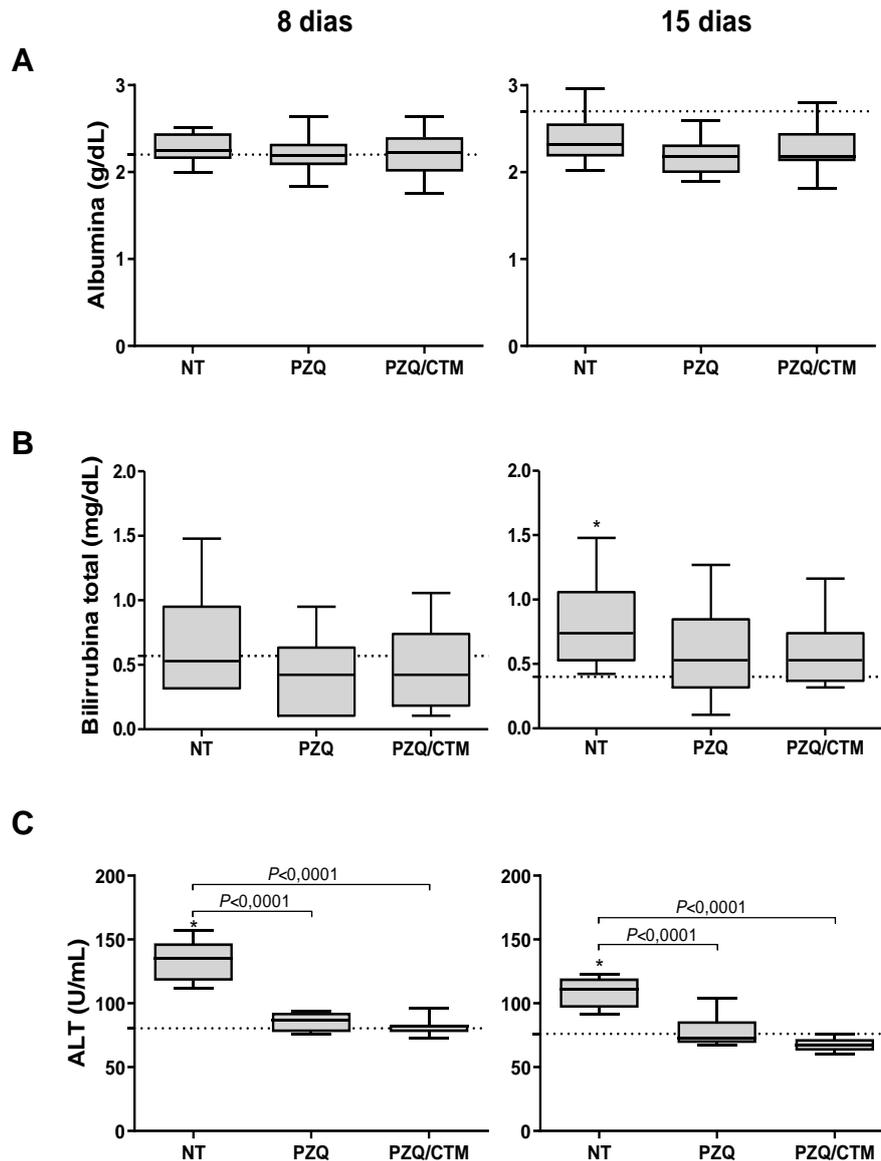


Figura 24. Dosagem dos níveis séricos de albumina, bilirrubina e ALT. Soro de camundongos C57BL/6 infectados por *S. mansoni* tratados com PZQ ou PZQ/CTM. (A) concentração de albumina nos tempos de 8 e 15 dias. (B) Concentração de bilirrubina total nos tempos de 8 e 15 dias. (C) Concentração de ALT nos tempos de 8 e 15 dias. Dados representam a mediana \pm desvio padrão. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo. (*) Indica uma diferença significativa entre os grupos saudável e não tratado.

5.13 Após o tratamento com PZQ, animais SPF apresentaram menor nível sérico de ALT quando comparado aos camundongos convencionais

Os níveis de ALT foram similares entre os animais convencionais (Anexo 1.1) e SPF, em todos os grupos estudados, exceto no grupo PZQ onde o tratamento aumentou significativamente os níveis de ALT dos animais convencionais comparado aos animais SPF (Figura 25).

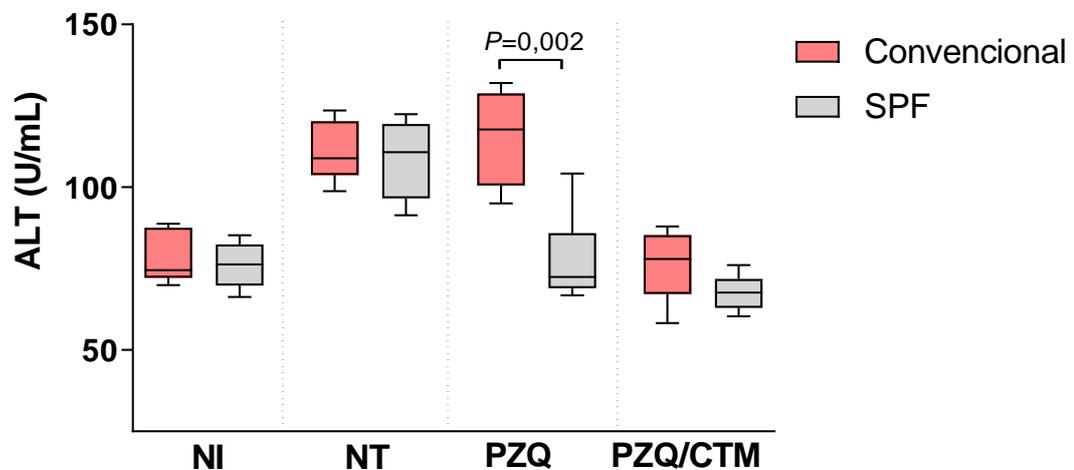


Figura 25. Comparação da dosagem dos níveis séricos de ALT entre animais convencionais e animais SPF. Soro de camundongos C57BL/6 convencional ou SPF infectados por *S. mansoni* tratados com PZQ ou PZQ/CTM no tempo 15 dias. Dados representam a mediana \pm desvio padrão. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = grupo tratado com PZQ associado às células-tronco derivadas do tecido adiposo.

5.14 Animais SPF do grupo PZQ/CTM apresentaram granulomas com maior tamanho do que os convencionais do mesmo grupo

O número de granulomas foi similar entre os animais convencionais e SPF, em todos os grupos estudados. Já em relação ao tamanho dos granulomas o grupo PZQ/CTM dos animais SPF apresentou tamanho significativamente maior quando comparado ao mesmo grupo dos animais convencionais (Figura 26B).

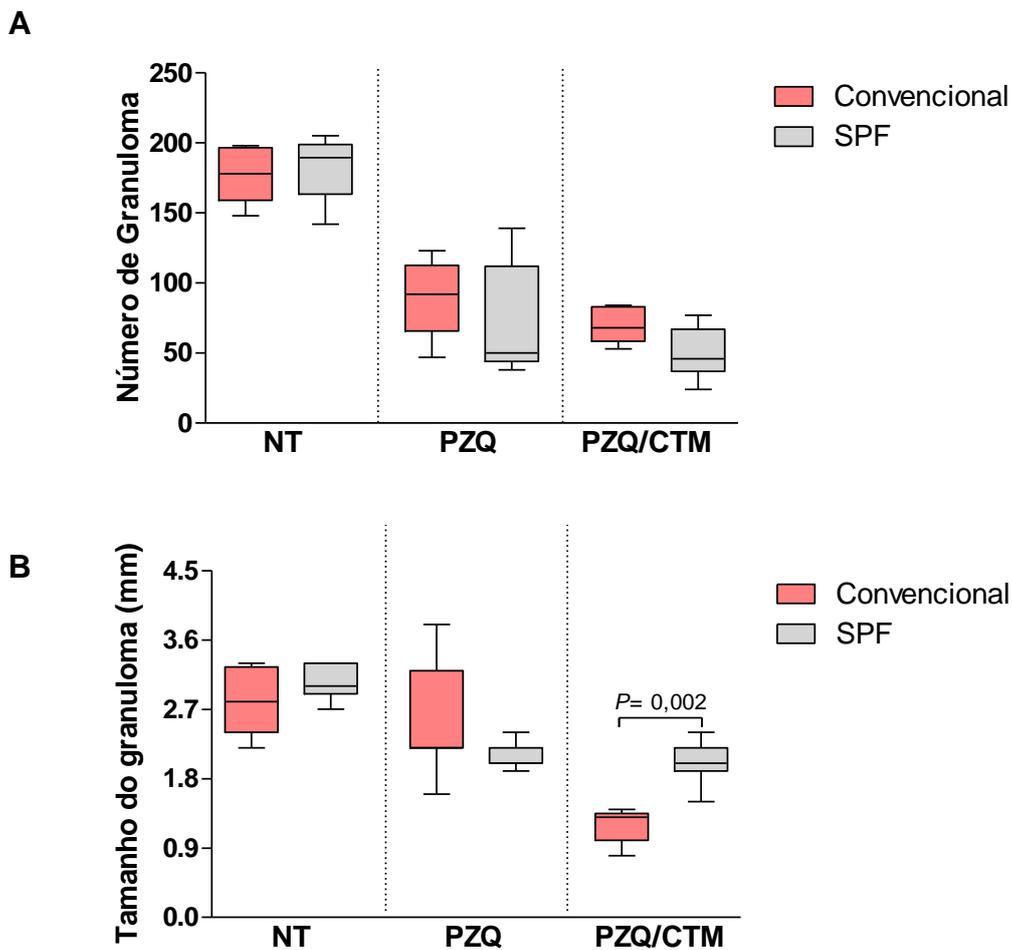


Figura 26. Comparação do número e tamanho dos granulomas entre animais convencionais e animais SPF. Fígado de camundongos C57BL/6 convencional ou SPF infectados por *S. mansoni* tratados com PZQ ou PZQ/CTM no tempo 15 dias. (A) Número de granulomas em cinco campos. (B) Tamanho dos granulomas em micrômetros. Os dados estão apresentados como mediana, quartis e extremos. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = grupo tratado com PZQ associado às células-tronco derivadas do tecido adiposo.

5.15 Os animais SPF do grupo PZQ/CTM apresentaram níveis reduzidos de TNF- α , IL-6, IL-17- α , IL-4 e IL-10

Os animais SPF, tratados com CTM, apresentaram níveis significativamente menores de todas as citocinas estudadas, comparado aos animais convencionais, exceto para IFN- γ , que não apresentou diferença significativa (Figura 27). Os animais convencionais e SPF, tratados somente com PZQ, não apresentaram diferenças significativas dos níveis de citocinas, quando comparados. O mesmo ocorreu para o grupo NT, exceto para a citocina TNF- α onde os níveis foram menores nos animais SPF (Figura 27). O grupo de camundongos SPF NI apresentou resultado semelhante ao grupo tratado com PZQ/CTM, exceto para a citocina IL-10 e IL-2, onde não observamos diferenças significativas entre os animais SPF e convencionais (Figura 27).

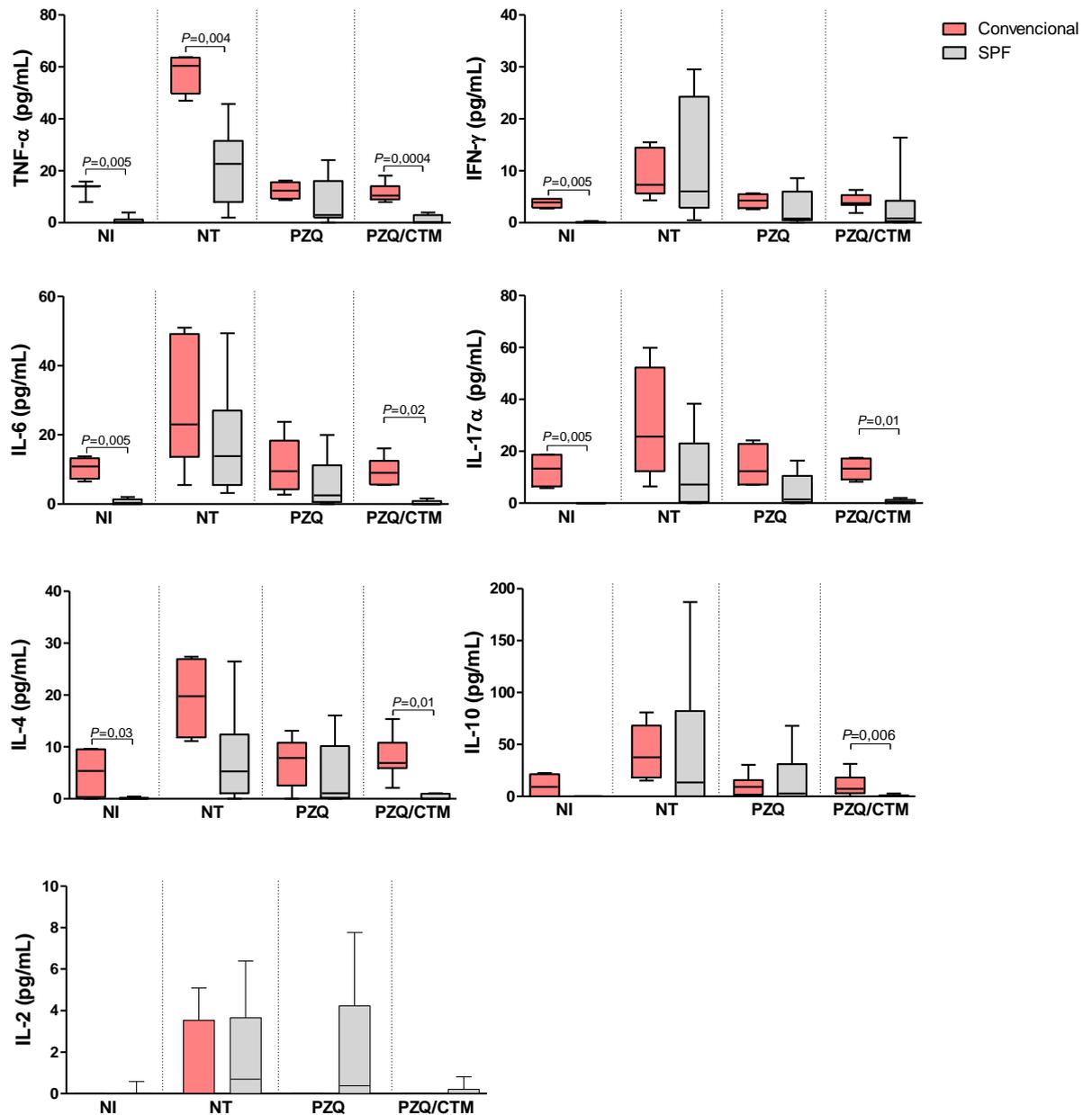


Figura 27. Comparação da dosagem dos níveis séricos de citocinas entre animais convencionais e SPF. Camundongos C57BL/6 convencional ou SPF infectados por *S. mansoni* tratados com PZQ associado à CTM-TA no tempo de 15 dias. Dados representam medianas \pm desvio padrão. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = Praziquantel mais grupo tratado com células-tronco derivadas do tecido adiposo.

5.16 Houve maior frequência de altos produtores de citocinas entre os animais saudáveis convencionais do que entre os camundongos SPF

Para verificar o perfil de citocinas em animais SPF e convencionais, verificou-se a frequência de animais “altos produtores” e “baixos produtores” de citocinas em

cada grupo estudado. Para tanto, foi calculado o ponto de corte de cada citocina a partir da mediana global de todos os grupos (NI, NT, PZQ e PZQ/CTM). Os animais que apresentavam níveis de citocinas acima da mediana foram classificados como “altos produtores” e os animais que apresentavam níveis de citocinas abaixo da mediana foram classificados como “baixos produtores” (GUIMARAES *et al.*, 2015; LUIZA-SILVA *et al.*, 2011) (Figura 28).

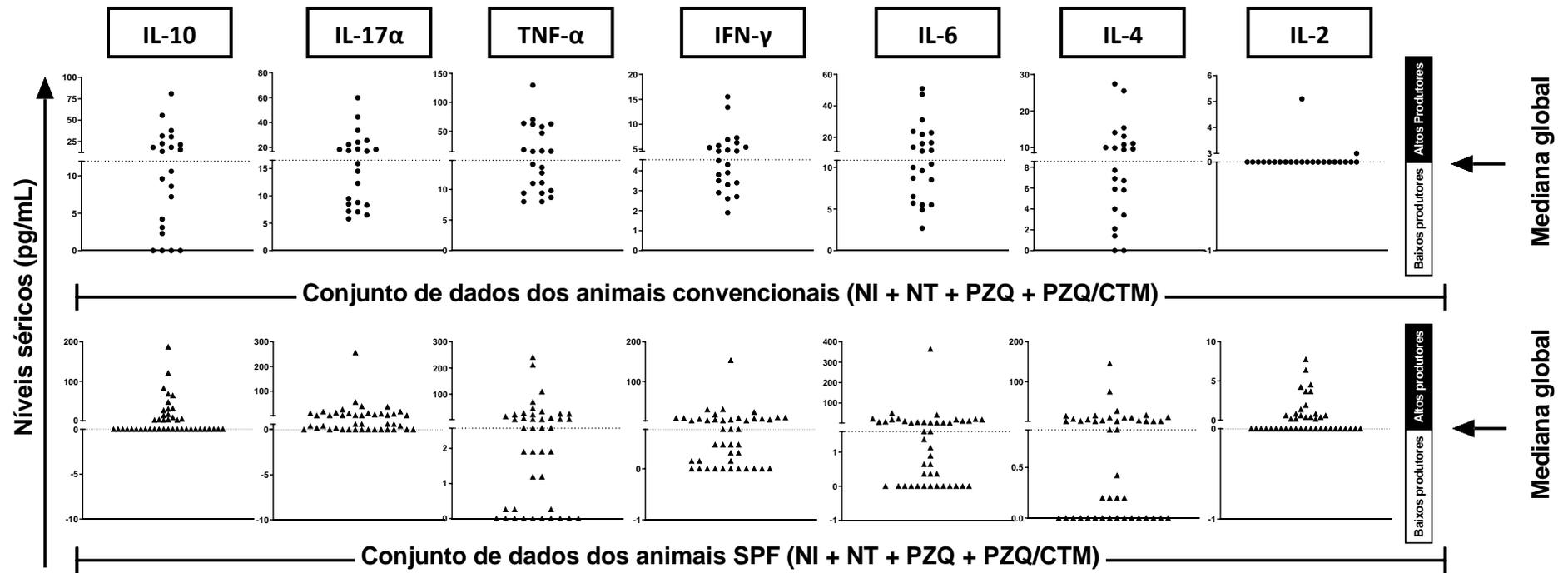


Figura 28. Produção total de citocinas nos grupos estudados. Gráficos de dispersão mostrando os níveis séricos de citocinas de camundongos convencionais (●) e camundongos SPF (▲) de todos os grupos estudados (NI, NT, PZQ e PZQ/CTM). A mediana global de cada citocina está representada pela linha pontilhada, segregando animais “altos produtores” e “baixos produtores” de citocinas.

Uma vez estabelecido o ponto de corte para cada citocina, calculamos a porcentagem de altos produtores para cada grupo e representamos no gráfico de radar como estratégia de comparação entre grupos de animais convencionais e SPF (Figura 29). Observamos que os camundongos SPF do grupo NI tinham menos de 50% de frequência de altos produtores de citocinas para todas as citocinas estudadas. Já os animais convencionais deste mesmo grupo apresentaram frequência superior a 50% de altos produtores das citocinas IL-10, IL-17 α , TNF α , IFN- γ , IL-6 e IL-4.

O grupo NI dos animais SPF não apresentou altos produtores de citocinas ao contrário dos animais convencionais que tiveram frequência superior a 50% na produção das citocinas IL-10, IL-17 α , TNF α , IFN- γ , IL-6 e IL-4. Tanto os animais convencionais quanto SPF do grupo NT classificaram-se como altos produtores de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias, exceto para a citocina IL-2 nos animais convencionais. Após o tratamento com PZQ, o perfil de produtores de citocinas alterou entre os animais convencionais e SPF. Foi observada ausência de altos produtores de citocinas nos animais convencionais enquanto todos os animais SPF classificaram-se como altos produtores. O tratamento com CTM mudou o perfil de citocinas dos animais SPF que apresentaram animais altos produtores somente para as citocinas IL-17 α e IFN- γ . Já os animais convencionais permaneceram com o mesmo perfil para todas as citocinas analisadas, como observado no tratamento com PZQ (Figura 29).

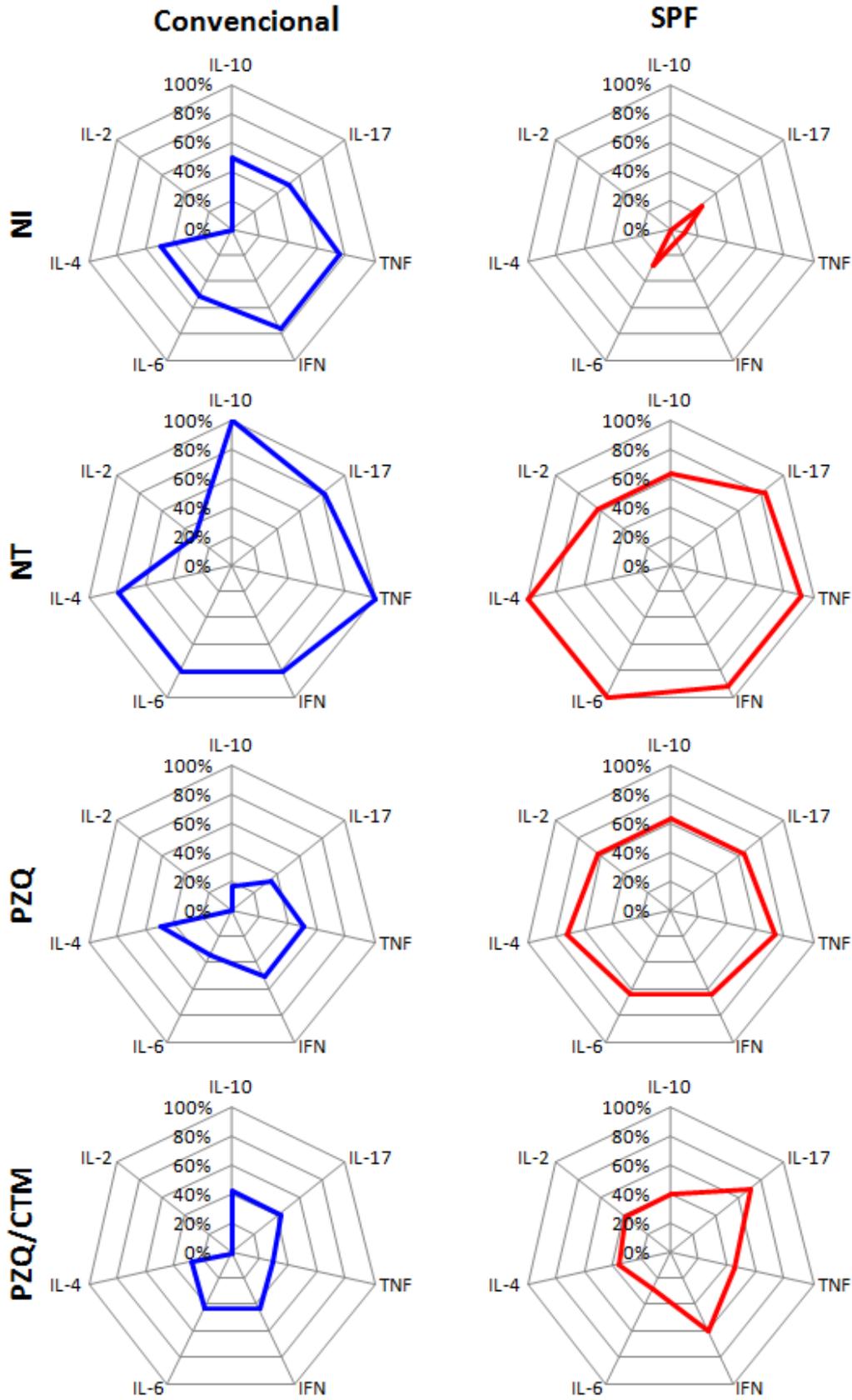


Figura 29. Rede de citocinas dos camundongos convencionais e SPF. Os gráficos de radar resumem a porcentagem de altos produtores de cada grupo estudado de animais convencionais e SFP. Quando a frequência de grandes produtores foi superior a 50% (em uma escala de 0 a 100%).

Tabela 4. Sumário dos resultados. Efeito do tratamento com CTM na esquistossomose experimental

Parâmetro	Convencional		SPF	
Peso do fígado, número de helmintos e viabilidade dos ovos	Não alterou		Não analisado	
Número e tamanho de granulomas	↓ número e tamanho		Não alterou	
Fase e composição do granuloma	↑ granulomas avançados e fibróticos ↓ diversidade celular		Não analisado	
Deposição de colágeno	Não alterou		Não analisado	
Fenótipo dos esplenócitos	↑ LTCD4 ⁺ /CD28 ⁺		Não analisado	
Citocinas	Séricas	Não alterou	Séricas	7 dias Não alterou
				15 dias ↓ TNF- α e IL-6
			<i>In situ</i>	7 dias ↑ IL-10 e IL-2
				15 dias ↑ IL-10 e IL-17 α
Óxido nítrico	Não analisado		Não alterou	
Parâmetros bioquímicos	↓ ALT		Não alterou	

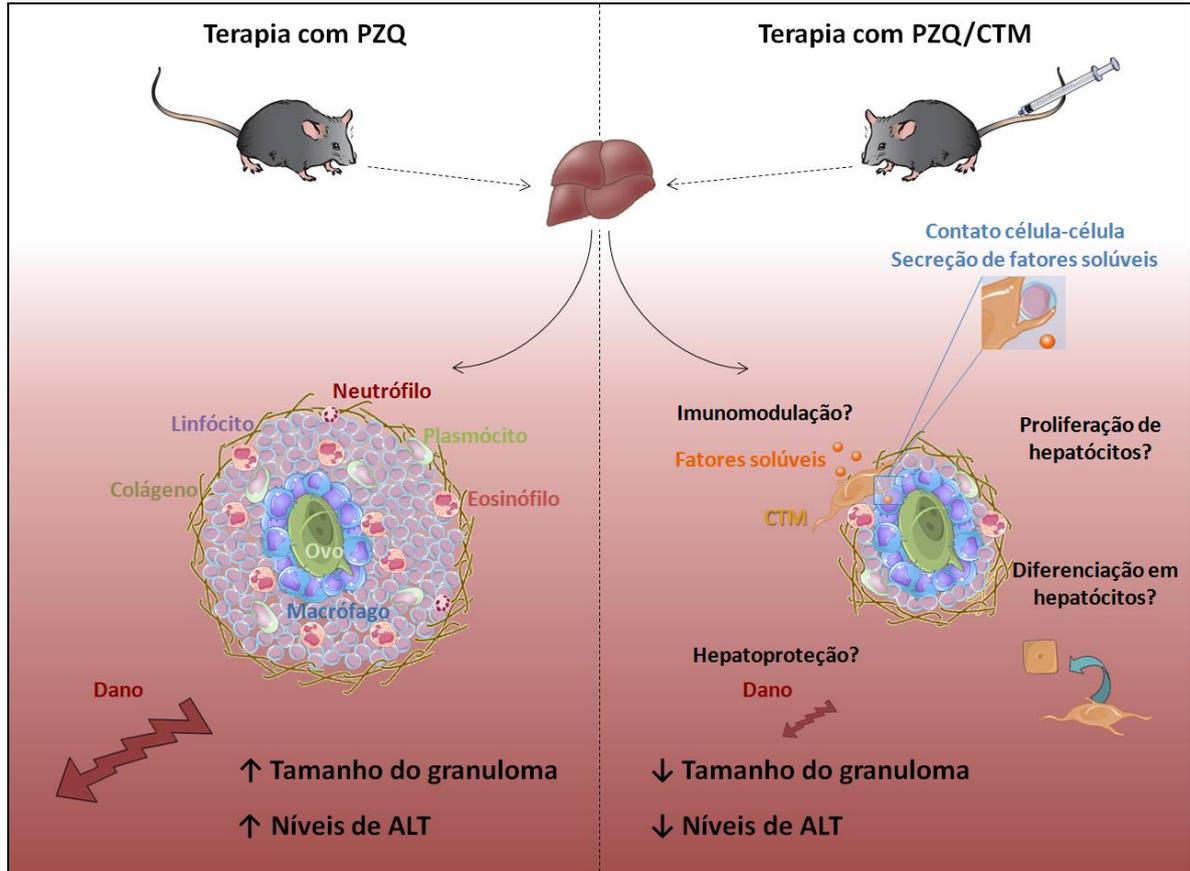


Figura 30. Resumo gráfico dos resultados preliminares da terapêutica de PZQ associado as CTM. Diferença entre o tratamento convencional para esquistossomose mansoni usando PZQ e o tratamento proposto de uma terapia combinada PZQ/CTM. Houve uma diminuição significativa no tamanho do granuloma no fígado de camundongos que receberam o tratamento associado em comparação com os animais que receberam apenas PZQ. Além disso, foi observada uma diminuição nos níveis séricos de ALT, indicando redução do dano tecidual. Além disso, nossos resultados mostraram que após 15 dias de injeção de CTM, estas foram encontrados no fígado. Porém o mecanismo usado pelas CTM para executar tais funções ainda permanece incompreendido. A complexidade da formação e progressão da reação granulomatosa, em parte, é a razão pela qual uma terapia anti-inflamatória robusta ainda não foi desenvolvida. Pode ser que uma única via anti-inflamatória seja simplesmente incapaz de superar tais doenças complexas. Portanto, os efeitos presumidos das CTM em conjunto, como imunomodulação, hepatoproteção, estimulação da proliferação de células hepáticas e até mesmo a diferenciação de CTM em hepatócitos, podem ser a resposta ao fenômeno observado (MIRANDA *et al.*, 2016).

6 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, objetivamos avaliar a influência das CTM sobre a inflamação hepática no modelo da infecção pelo *S. mansoni*. Para isso, inicialmente obtivemos as CTM a partir do tecido adiposo. A cultura foi realizada com sucesso, uma vez que se obteve uma população de células com características morfológicas semelhantes à fibroblastos, aderentes à superfície plástica e formação de colônias, como descrito na literatura para as CTM (CAPLAN *et al.*, 1991; PITTENGER *et al.*, 1999; ARRIETA *et al.*, 2011). Além disso, as células se mostraram resistentes ao processo de criopreservação e mantiveram um fenótipo estável quando cultivadas até a terceira passagem *in vitro*, como observado por Basciano e colaboradores, (2011).

Para confirmação que a população celular era composta por CTM, realizamos ensaios de caracterização fenotípica e funcional, seguindo os critérios padronizados pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (DOMINICI *et al.*, 2006). Com base nos resultados encontrados foi possível confirmar que as células deste estudo eram CTM, já que após expansão celular verificamos maior percentual de células expressando marcadores de CTM (CD29, CD71 e CD90) e apenas 2% expressavam marcadores de CTH (ZUK *et al.*, 2002; DOMINICI *et al.*, 2006; SUNG *et al.*, 2008). Os ensaios de caracterização funcional confirmaram a multipotencialidade das CTM, uma vez que as células foram capazes de se diferenciar em linhagens celulares especializadas como a osteogênica, adipogênica e condrogênica, característica de CTM, como descrito na literatura (PITTENGER *et al.*, 1999; ZUK *et al.*, 2002; DOMINICI *et al.*, 2006; DA SILVA *et al.*, 2009).

As CTM podem migrar para muitos tecidos após a administração intravenosa, preferencialmente para os locais de lesões, provavelmente atraídas por fatores de inflamação (WANG *et al.*, 2014). A presença de CTM nos tecidos pode ser verificada por técnicas fluorescentes ou genéticas, por meio de marcadores fluorescentes ou outros marcadores específicos não presentes no tecido hospedeiro nativo ou pela utilização de CTM incompatível com sexo e investigações cromossômicas subsequentes (FOX *et al.*, 2007). O rastreamento cintilográfico também pode ser utilizado, tendo a vantagem de monitoramento celular *in vivo*, porém, é limitado por sua baixa resolução espacial e decaimento de radionuclídeos (FOX *et al.*, 2007). Em

nosso estudo, fizemos análises de rastreamento das CTM no fígado e pulmões, *in vitro*, utilizando células-tronco fluorescentes provenientes de camundongos que expressam a proteína tdTomato⁺. A detecção das CTM primeiramente nos pulmões, observada após 1 e 8 dias de sua injeção, pode ser explicada pelo tráfego da circulação venosa que passa primeiro nesse órgão. Após 15 dias da injeção, as células migraram para o fígado, possivelmente atraídas por fatores de inflamação decorrente das lesões hepáticas causadas pelos ovos de *S. mansoni* nesse órgão. Outros órgãos alvos de lesões teciduais na esquistossomose não foram objetivos de avaliação neste projeto. Estudos anteriores sobre a capacidade de migração das CTM para o fígado lesionado relataram conclusões conflitantes. Alguns relataram que as CTM se acumularam gradualmente no fígado (CHO *et al.*, 2009; CHEN *et al.*, 2010), no entanto, um estudo demonstrou que as células transplantadas atingiram uma quantidade máxima no fígado 24 horas após a perfusão e, em seguida, o conteúdo de CTM diminuiu gradualmente (KANAZAWA *et al.*, 2011). Em nosso estudo, não observamos deposição gradual das CTM no fígado, no período de tempo analisado. A sobrevivência das CTM *in vivo*, após a sua aplicação sistêmica permanece controversa, com alguns relatos sugerindo que elas são recrutadas apenas para o pulmão, mas não para o fígado (EGGENHOFER *et al.*, 2002), e outros mostrando que elas podem sobreviver dentro do fígado por mais de um mês (KUO *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2013). Apesar da falta de evidência de rastreamento *in vivo* suficiente para apoiar qualquer um desses pontos de vista, alguns estudos mostraram novas estratégias que ainda precisam ser elucidadas para prolongar a sobrevivência das CTM em um ambiente adverso (HAMED-ASL *et al.*, 2012; MOHAMMADZADEH *et al.*, 2012).

Uma vez caracterizada, expandida *in vitro* e avaliada a migração das CTM-TA, seguiu-se para a avaliação dessas células no controle da inflamação na esquistossomose experimental. Como as CTM-TA não possuem função anti-helmíntica, delineamos nosso estudo unindo a atividade do PZQ para eliminar o *S. mansoni* com as atividades das CTM para controlar a inflamação e induzir regeneração tecidual. A nossa hipótese era de que a terapêutica associada, PZQ e CTM, levaria a uma rápida recuperação do paciente comparada ao tratamento convencional com PZQ. O possível efeito das CTM em controlar a inflamação e reduzir a fibrose hepática poderia ser interessante, porque, embora o PZQ tenha atividade antifibrótica em modelos animais (ABDEL *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012)

e pacientes com esquistossomose (MARTINS-LEITE *et al.*, 2008), o fígado leva muito tempo para o reparo tecidual e modulação dos granulomas quando o PZQ é usado em terapia única (DIETZE & PRATA, 1986; COUTINHO & DOMINGUES, 1987). Como esperado, camundongos do grupo não tratado apresentaram maior número de vermes adultos, o que desencadeou um processo de acumulação de lesões devido à oviposição contínua. Os grupos tratados com PZQ na dosagem de 400mg/Kg tiveram eficácia na eliminação dos vermes adultos, como foi demonstrado por Oliveira, F. A. (2005), o que conseqüentemente cessa ou diminui o número de ovos colocados na circulação mesentérica. Além disso, as análises histopatológicas do fígado revelaram que os camundongos tratados com PZQ apresentaram a maioria dos ovos de *S. mansoni* inviáveis. Estudos mostram que isto é comum quando o PZQ é administrado em doses mais elevadas (RICHARDS *et al.*, 1989). Com a morte dos ovos, sua imunogenicidade é diminuída, o que contribui para redução da inflamação granulomatosa (DEFRANCO *et al.*, 2007; HAMS *et al.*, 2013). Em conjunto, estes resultados explicam a diminuição do peso do fígado dos camundongos do grupo tratado com PZQ.

O principal papel da reação granulomatosa na esquistossomose é proteger os tecidos do hospedeiro, isolando as toxinas em potencial secretadas pelos ovos. Após a deposição dos ovos nos tecidos, eles são rapidamente cercados por infiltrados de células inflamatórias, resultando no granuloma. Esse é um processo dinâmico em que o tamanho e a composição celular das lesões variam com o tempo e é coordenado pela influência de uma rede de mediadores inflamatórios (WYNN & CHEEVER, 1995; COLON, 2005). Em nosso estudo observamos que após o tratamento com PZQ associado às CTM-TA houve diminuição do número de granulomas quando comparado ao grupo NT, além de uma rápida evolução dos granulomas para a fase fibrótica. A fase fibrótica é considerada como a fase de cura. Ribeiro PJ e colaboradores (2004) descreveram como uma espessa camada de fibras colágenas circular, que isola completamente o ovo, sendo comum nesta fase encontrar células inflamatórias, principalmente linfócitos, macrófagos e os eosinófilos que podem ser encontrados dentro da casca do ovo, semelhante ao que observamos em nosso estudo. Apesar da maioria dos granulomas do grupo PZQ/CTM estar na fase avançada e fibrótica, ele apresentou baixa deposição de colágeno assim como o grupo tratado apenas com PZQ, sendo favorável para a

proliferação de novos hepatócitos e conseqüentemente para a recuperação das funções vitais do fígado.

Outra função importante desempenhada pelas CTM-TA é a capacidade destas células estimularem a angiogênese (WANG *et al.*, 2014). Estudos de reconstrução da mama após a radioterapia utilizando a técnica de enxerto de gordura mostraram que os efeitos combinados de vasculogênese e efeito remodelador de colágeno das CTM-TA contribuíram para a diminuição das lesões, fibrose e das retrações da pele (PANETTIERE *et al.*, 2011; SHUKLA *et al.*, 2015). Pretendemos avaliar alguns marcadores de angiogênese no fígado destes animais pela técnica de imunohistoquímica, a fim de descobrir se o reparo tecidual observado está relacionado com este parâmetro a ser avaliado.

Os dados histopatológicos indicaram que as CTM-TA induziram uma resolução mais rápida dos granulomas hepáticos do que o tratamento somente com PZQ. Para investigarmos se isso ocorreu em função da modulação da resposta imune pelas CTM-TA, avaliamos o perfil de ativação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do baço. Verificamos que ambos os tratamentos (PZQ e PZQ/CTM), induziram a expressão de CD69 e CTLA-4 na superfície dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺. A molécula CD69 é uma proteína de membrana tipo II expressa como homodímero constituído por subunidades fortemente glicosiladas. Após a estimulação dos receptores TCR, o CD69 é rapidamente expresso, sendo por isso considerado um marcador de ativação celular recente (ZIEGLER *et al.*, 1993; TESTI *et al.*, 1994). O papel exato desta molécula nas células ainda não foi totalmente esclarecido, pois até o momento não se conhece um ligante específico para essa molécula (SHINODA *et al.*, 2012). A alta expressão de CD69 pode estar relacionada com a participação desta molécula na geração de células de memória (SHINODA *et al.*, 2012). Na esquistossomose, o aumento da expressão de CD69 foi observado em murinos, principalmente em células derivadas de granulomas (RUMBLEY *et al.*, 1998). Estudos em humanos apontam uma diminuição da expressão dessa molécula relacionada com a fase crônica da doença que apresenta um status de ativação do sistema imune menor (SILVEIRA-LEMOS *et al.*, 2006; CAMPI-AZEVEDO *et al.*, 2007).

O aumento da expressão de CTLA-4 em células T CD4⁺ observado em nosso estudo corroborou com um estudo que utilizou antígenos de *S. mansoni* (BAFICA *et*

al., 2012). Estes antígenos foram capazes de diminuir o estado de ativação dos linfócitos T aumentando a expressão de moléculas moduladoras. Acreditamos que o tratamento com PZQ levou à exposição de antígenos de *S. mansoni* que podem ter contribuído para a modulação dos linfócitos T CD4⁺ e TCD8⁺ que também apresentaram alta expressão de CTLA-4.

Nossos resultados apontaram para um aumento da expressão de CD28⁺ nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, de acordo com o tratamento recebido: enquanto o PZQ induziu a expressão significativa de CD28 nos linfócitos T CD8⁺ o tratamento adicional com CTM aumentou a expressão dessa molécula nas células T CD4⁺. Isto sugere que as CTM estejam atuando mais nas células T CD4⁺ do que nas células T CD8⁺. As células TCD4⁺ desempenharam um papel crucial tanto no desenvolvimento dos granulomas murinos, quanto nos eventos de modulação da reatividade granulomatosa (MATHEW & BOROS, 1986). Em células T virgens, CD28 é o único receptor para as moléculas B7. Uma vez que as células T estejam ativadas, elas passam a exibir um receptor adicional, homólogo ao CD28, chamado CTLA-4 (WALUNAS *et al.*, 1994). Este se liga às moléculas B7 com 10-20 vezes mais avidéz (STAMPER *et al.*, 2001) e, apesar de ser menos abundante que o CD28, emite um sinal inibitório à célula T ativada, limitando a quantidade de produção do fator de crescimento de células T, a IL-2 (MANDELBROT *et al.*, 1999). Assim, a ligação de CTLA-4 às moléculas B7 é essencial para a limitação de resposta proliferativa das células T ativadas. Isso foi confirmado utilizando camundongos desprovidos do gene CTLA-4. Tais camundongos desenvolvem uma doença fatal caracterizada por massiva proliferação de linfócitos (COSTELLO *et al.*, 1998). Alguns trabalhos também demonstraram que o uso de anticorpo anti-B7.2 tem efeitos similares, sugerindo que a interação CD28 com B7.2 é importante no desenvolvimento da resposta imune do tipo Th2 relacionada à proteção contra a infecção pelo *S.mansoni* (HAGAN *et al.*, 1991; RIHET *et al.*, 1991; DUNNE *et al.*, 1992; TSUYUKI *et al.*, 1997). Além disso, trabalhos em modelos experimentais mostraram que a co-estimulação pelo CD28 influencia no aumento da sensibilização do receptor de IL-4 (IL-4R) e o conseqüente incremento da resposta Th2 (KUBO *et al.*, 1999). Aliado a isto, estudos *in vivo* vêm demonstrando que tanto as células de memória TCD4⁺ quanto as células de memória TCD8⁺ necessitam da coestimulação

de CD28 para atingir sua expansão máxima e a consequente otimização na resposta protetora frente a uma reestimulação antigênica (BOESTEANU & KATSIKIS, 2009).

A molécula CD25 teve sua expressão alterada somente nas células CD8⁺ que apresentaram uma redução significativa induzida por ambos os tratamentos, PZQ e PZQ/CTM. As células TCD8⁺ não são críticas para a formação dos granulomas, ao menos no período inicial da infecção natural (YAP *et al.*, 1997). Porém, as células TCD8⁺ têm sido consideradas como uma das responsáveis pelo efeito supressor responsável pela regulação negativa do tamanho dos granulomas (GREEN & COLLEY, 1981), mediada ao menos por parte, por IFN- γ . Entretanto, as funções das células TCD8⁺ na esquistossomose não estão totalmente esclarecidas (CARVALHO *et al.*, 2008). A expressão de CD25 nos LT CD4⁺ classifica estas células em não ativadas respondedoras, quando não expressam CD25 (TCD4⁺CD25⁻); células ativadas, quando apresentam baixa expressão de CD25 (CD25^{low}); e células T_{REG}, quando a expressão de CD25 é alta (TCD4⁺ CD25^{high}). Essas últimas apresentam uma alta capacidade supressora do sistema imune (BAECHER-ALLAN *et al.*, 2001) tornando-as foco de interesse em diversos campos da imunologia, sobretudo nas doenças infecciosas e parasitárias, especialmente na esquistossomose (HESSE *et al.*, 2004; MELO & CARVALHO, 2009).

Os dados de ativação celular não foram suficientes para relacionarmos a ativação imunológica com a modulação do granuloma após o tratamento com as CTM. Desta forma, mensuramos, também, os níveis de citocinas Th1, Th2 e Th17 no soro dos animais do estudo. Observamos que na ausência dos tratamentos os animais infectados apresentaram um aumento significativo dos níveis séricos de TNF- α e IL-4. Do ponto de vista imunológico, oito semanas após a infecção com *S. mansoni*, a produção de citocinas Th2 por células esplênicas e por células do granuloma hepático é predominante se comparada à produção de citocinas Th1 (STAVITSKY, 2004). Em nosso estudo, embora os animais infectados e não tratados estivessem com mais do que 8 semanas de infecção, os níveis de citocinas no soro não mostraram este perfil clássico. Quando analisamos os dados dos animais tratados com PZQ associado ou não com CTM, observamos que ambos os grupos apresentaram uma diminuição de todas as citocinas analisadas em relação ao grupo não tratado, indicativo de que os tratamentos reestabeleceram o perfil de citocinas observado nos camundongos NI. Porém, não encontramos diferenças significativas

entre os níveis séricos de citocinas dos grupos tratados com PZQ associado ou não às CTM que explicasse a modulação do granuloma e do reparo tecidual observados no grupo que recebeu a injeção de CTM. Nossos resultados foram diferentes daqueles já descritos em alguns modelos experimentais. Por exemplo, a regulação local de citocinas pró-inflamatórias e a regulação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, após o transplante de CTM foram descritas em modelos de insuficiência renal, lesão pulmonar e hepática fulminante (TOGEL *et al.*, 2005; ORTIZ *et al.*, 2007). Pulavendran *et al.* (2010) encontraram que IL-6 e TNF- α , que podem ser regulados por IL-10 e são promotores de fibrose hepática, foram mais baixos no grupo CTM quando comparados com o grupo controle de lesão hepática aguda induzida por tetracloreto de carbono (CCl₄). Acreditamos que as análises séricas de citocinas nos revelaram um perfil inflamatório sistêmico que não foi suficiente para responder as nossas questões sobre a ação das CTM na resposta inflamatória decorrente da esquistossomose. Além disso, a detecção de citocinas poderia se anteceder ao tempo de 15 dias analisado. Portanto, analisamos as citocinas, bem como outros mediadores inflamatórios, *in situ* (fígado), nos tempos de 8 e 15 dias após a injeção de CTM-TA e ainda em animais SPF. Estes animais são criados em ambientes ultra higiênicos e mantidos livres de patógenos específicos. Infecções por patógenos são importantes para o nível basal de ativação e a função do sistema imunológico (LILI & TIFFANY, 2017). Em nosso estudo, os níveis de citocinas mensurados no soro e fígado de animais SPF NI, revelaram uma significativa diminuição da ativação do sistema imune nesses animais em comparação com o mesmo grupo dos animais convencionais. Trabalhos recentes sugerem que a criação SPF tem efeitos amplos e inesperados no sistema imunológico de camundongos (REESE, 2016; BEURA *et al.*, 2016). Como o nome indica, os camundongos SPF estão livres de patógenos específicos. A lista de organismos testados varia de instalação para instalação e sala de operação, mas os organismos geralmente incluem patógenos causadores de doenças, oportunistas e organismos comensais que não causam doenças em camundongos saudáveis. Camundongos criados em condições SPF representam a referência para estudos do sistema imunológico. No entanto, os camundongos SPF podem ter sistemas imunológicos imaturos em comparação com roedores selvagens ou camundongos infectados com patógenos específicos (REESE, 2016; BEURA *et al.*, 2016). Dentre as citocinas dosadas no soro dos camundongos SPF, TNF- α e IL-6 foram as que

apresentaram níveis diminuídos, significativamente, em relação ao grupo NT, após o tratamento com CTM no tempo de 15 dias.

Como esperado, a análise de citocinas no fígado revelou melhor a função das CTM no perfil de citocinas. Essas células induziram um aumento dos níveis das citocinas IL-2, IL-10 e IL-17 α . O aumento dos níveis de IL-10 nos tempos de 8 e 15 dias, pode contribuir para um microambiente anti-inflamatório e com geração de linfócitos T auxiliares. A IL-10 está envolvida com a diminuição do tamanho do granuloma na maioria dos indivíduos. Este fenômeno é essencial para o controle da morbidade e a citocina IL-10 é de fundamental importância na geração das condições de função homeostática protetora do hospedeiro na esquistossomose (HOFFMANN *et al.*, 2000; SILVEIRA *et al.*, 2004; TEIXEIRA-CARVALHO *et al.*, 2008). Por outro lado, a citocina IL-2 é um fator de crescimento, sobrevivência e diferenciação de linfócitos T, que desempenha um papel importante na indução de respostas das células T e no controle das respostas imunes e está envolvida na geração e manutenção de células T reguladoras funcionais. A dosagem de IL-2 no fígado pode levar a uma geração de células T reguladoras, DC tolerogênica e monócitos reguladores (WEISS & DAHIKE, 2019), porém não avaliamos estes tipos celulares em nosso trabalho. Na esquistossomose, a produção de IL-2 é característica da fase aguda e os eosinófilos podem ser, em grande parte, a fonte dessa citocina (ROTHENBERG & HOGAN, 2006). O aumento de IL-17 induzido pelas CTM sugere a ativação de células do Tipo 17 (LT CD4⁺), mediadoras de processos inflamatórios crônicos. Estudos em murinos têm revelado um papel da citocina IL-17 α na infecção pelo *Schistosoma*, onde essa citocina aumentaria a progressão da doença. Além disso, a IL-17 α poderia estar relacionada com o recrutamento de eosinófilos, contribuindo para o desenvolvimento de danos nos tecidos e fibrose (MBOW *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2012).

Além das citocinas analisadas, avaliamos, também, nos animais SPF, os níveis de NO. Não observamos nenhuma diferença entre os grupos de estudo, bem como entre os diferentes tempos avaliados induzidos pelo tratamento com CTM. O NO foi descoberto inicialmente como um fator liberado pelas células endoteliais, causando vasodilatação ao relaxar o músculo liso vascular (ROBBINS, 2000) e foi caracterizado como um radical livre lipofílico secretado endogenamente como um bioproduto da conversão da arginina e oxigênio em citrulina, em uma reação

enzimática mediada pela iNOS (HIBBS *et al.*, 1987; MICHEL, 1997). Existem três isoformas de NOS envolvidas na produção do NO (NOS-1, NOS-2 e NOS-3), contudo a forma que merece maior destaque é a NOS-2 ou iNOS, que é a forma induzível produtora de altos níveis de NO quando os macrófagos são ativados por citocinas (TNF- α e IFN- γ) ou agentes infecciosos. Níveis altos de NO parecem limitar a replicação de helmintos, bactérias, protozoários e vírus (bem como células tumorais), com risco de lesão intensa das células e tecidos do hospedeiro (ROBBINS, 2000). Na esquistossomose, a inibição da iNOS está associada com dano hepatocelular exacerbado, aumento da fibrose e apoptose de hepatócitos (BRUNET *et al.*, 1999). Na infecção pelo *S. mansoni*, o NO é importante para o hospedeiro não somente devido às suas características antimicrobianas, mas também servindo como um potente mediador inflamatório e antifibrótico (HESSE *et al.*, 2001). Durante a infecção pelo *S. mansoni*, a produção de NO aumenta no fígado após a oviposição (6 semanas de infecção). Com a indução da resposta Th2 pelos ovos do parasito, a resposta Th1 é inibida e ocorre regulação da produção excessiva de NO e, conseqüentemente, de seus efeitos como mediador inflamatório (BRUNET *et al.*, 1999). Portanto, talvez não tenhamos visto alteração significativa dos níveis de NO pelos tempos de infecção analisados que foram entre 10 a 12 semanas.

Em nosso estudo vimos que os animais SPF apresentaram níveis de ALT menores no grupo PZQ no tempo de 15 dias quando comparado ao grupo PZQ dos animais convencionais no mesmo tempo. A redução do dano tecidual pode estar relacionada à uma resposta imune mais branda nos animais SPF após a exposição aos antígenos de *S. mansoni* durante o tratamento com PZQ. Existe uma hipótese de que alguns modelos de doenças humanas em camundongos poderiam ser melhorados através do entendimento da contribuição de infecções prévias para a função das células imunes e as respostas imunes (LILI & TIFFANY, 2017). Baseado nesta hipótese, deduziu-se que a diferença nos dados encontrados pode ser explicada pelo repertório imune de um camundongo convencional que é exposto à patógenos e antígenos do ambiente, desenvolvendo um sistema imune maduro, ao contrário dos animais SPF que não foram expostos a estes patógenos e antígenos, favorecendo o desenvolvimento de uma resposta imune imatura e talvez menos danosa. Porém, ao compararmos o tamanho do granuloma entre animais convencionais e SPF, vimos que o grupo de animais convencionais tratados com

PZQ/CTM no tempo de 15 dias apresentaram granulomas significativamente menores que o grupo SPF. Isto pode estar envolvido com o sensor comutador das CTM, onde essas células podem ativar ou inibir uma resposta inflamatória dependendo do ambiente em que se encontram (WEI & JIANYONG, 2020). Num ambiente rico em mediadores inflamatórios, como no caso dos animais convencionais, as CTM podem ter desenvolvido a sua função anti-inflamatória mais rapidamente que nos animais SPF, promovendo a supressão do sistema imune e, conseqüentemente, a diminuição do tamanho dos granulomas nos animais convencionais. Em conjunto, os dados obtidos nos animais SPF, apontam para uma ativação tardia das CTM devido ao ambiente pouco inflamado, quando comparado aos animais convencionais.

7 CONCLUSÃO

Os dados mostraram que as CTM podem atuar de modo diferenciado dependendo do microambiente em que são inoculadas. Em conjunto, os resultados deste estudo sugerem as CTM como promissoras para o desenvolvimento de uma terapêutica para a morbidade causada pela esquistossomose mansoni, em associação ao PZQ, uma vez que essas células foram capazes de modular o granuloma na esquistossomose mansoni e migrarem para o fígado, um dos órgãos mais acometidos pela doença, reduzindo o dano hepático e contribuindo para o reparo tecidual. Além disto, os resultados sugerem o uso das CTM para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para controlar a inflamação em outras doenças infecciosas e parasitárias e, também, distúrbios hepáticos, e sustentam a importância do ambiente inflamatório para a função das CTM no controle da inflamação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL, Aziz M; ATTA H; ROSHDY N, *et al.* Amelioration of Murine *Schistosoma mansoni* Induced Liver Fibrosis by Mesenchymal Stem Cells. **J Stem Cells Regen Med**, v. 8, n.1, p. 28-34, 2012.
- AGGARWAL, S; PITTENGER, MF. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. **Blood**, v.105, n.4, p. 1815-1822, 2005.
- AGNIESZKA, Banas; TAKUMI, Teratani; YUSUKE, Yamamoto, *et al.* Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. **J of Gastro and Hepat**, v. 24. p. 70–77, 2009.
- ALEXANDRE, TJ Maria; TOUPET, Karine; BONY, Claire, *et al.* Antifibrotic, Antioxidant, and Immunomodulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells in HOCl-Induced Systemic Sclerosis. **Arthritis & Rheumatology**, v. 68, No. 4, p. 1013–1025, april 2016.
- ALISSON, ACM; ANDRADE, Z; BRUNNER, KT, *et al.* Immunology of schistosomiasis. **WHO press**, v. 51, p. 553-95, 1974.
- ALISON, MR; ISLAM, S; LIM, SM. Cell therapy for liver disease. **Curr Opin Mol Ther**, v.11 p. 364–374, 2009.
- AMARAL, KB; SILVA TP; DIAS FF, *et al.* Histological assessment of granulomas in natural and experimental *Schistosoma mansoni* infections using whole slide imaging. **PLoS One**, v. 12, 2017.
- ANTHONY, RM; RUTITZKY, LI; URBAN, JF, *et al.* Protective immune mechanisms in helminth infection. **Nat Rev Immunol**, v. 7, p. 975-987, 2007.
- ARRIETA, CN; RITZ, J; SILBERSTEIN. The elusive nature and function of mesenchymal stemcells. **Nat Rev Mol Cell Bio**, v. 12. p. 126-131, 2011.
- ATTA, AM. *et al.* Esquistossomose mansônica. Evolução do quadro patológico: análise parasitológica, hematológica e histopatológica. **Rev. Saúde públ**, v. 15, p. 72-92, 1981.
- BAECHER-ALLAN, C. *et al.* CD4⁺CD25^{high} regulatory cells in human peripheral blood. **J Immunol**, v. 167, n. 3, p. 1245-53, 2001.

BASCIANO, L; NEMOS, C; FOLIGUET, B de Isla N, *et al.* Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. **BMC Cell Biol**, v. 12, p. 12, 2011.

BANAS, A; TERATANI, T; YAMAMOTO Y, *et al.* Rapid hepatic fate specification of adipose-derived stem cells and their therapeutic potential for liver failure. **J. Gastro Hepato**, v. 24, p. 70–77, 2009.

BARTH, Wilmar Luiz. Células-tronco e bioética: o processo biomédico e os desafios éticos. **EDIPUCRS**. p 331. 2006.

BARTHOLOMEW, A; STURGEON, C; SIATSKAS M, *et al.* Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation *in vitro* and *in vivo* and prolong skin graft survival *in vivo*. **Exp. Hematol**, v. 30, p. 42–48, 2002.

BAUMGART, M; TOMPKINS, F; LENG, *et al.* Naturally occurring CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells are an essential, IL-10-independent part of the immunoregulatory network in *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation. **J Immunol**, v. 176, p. 5374-5387, 2006.

BELKAID, Y; ROUSE, BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. **Nat Immunol**, v. 6, p. 353-360, 2005.

BERARDIS, S; LOMBARD, C; EVRAERTS J, *et al.* Gene expression profiling and secretome analysis differentiate adult derived human liver stem/progenitor cells and human hepatic stellate cells. **PLoS One**, v. 9 :e86137, 2014.

BERRIMAN, M; BRIAN, J Hass; NAJIB, M. The genome of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **Nature**, v. 460, p. 352-359, 2009.

BEURA, L.K.; HAMILTON S; JASON KB, *et al.* Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. **Nature**, v. 532, p. 512–516, 2016.

BIANCO, P; ROBEY PG; SIMMONS, PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell Stem Cell**, v. 2, p. 313-319, 2008.

BOESTEANU, AC & KATSIKIS, PD. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. **Semin Immunol**, v. 21, n. 2, p. 69-77, 2009.

BONAVITA, AG; QUARESMA K; COTTA, AV, *et al.* Hepatocyte xenotransplantation for treating liver disease. **Xenotransplantation**, v. 17, p. 181–187, 2010.

BOROS, DL. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, p. 250-269, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Grupo Técnico das Parasitárias. Situação epidemiológica da esquistossomose no Brasil. Brasília: MS/SVS, 2010. 18 p. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/situacoesquistossomose_brasil_abril2011.pdf. Acesso em: 01 junho 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Vigilância da esquistossomose mansoni diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília: MS; 2014.

BRUNET, L. R; BEALL, M; PEARCE EJ. Nitric oxide and the th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. **The Journal of Immunology**, v. 163, p. 4976-4977, 1999.

BURKE, ML; JONES, MK; GOBERT, GN, *et al.* Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol**, v. 31, n. 4, p. 163-76, 2009.

CAHILL, RA; WENKERT, D; PERLMAN, SA, *et al.* Infantile hypophosphatasia: transplantation therapy trial using bone fragments and cultured osteoblasts. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 92, n. 8, p. 2923-2930, 2007.

CAMPI-AZEVEDO, AC; GAZZINELLI, G; BOTTAZZI, ME *et al.* *In vitro* cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic schistosomiasis mansoni show immunomodulation of cyclin D_{1,2,3} in the presence of soluble egg antigens. **Microbes and Infection**, v. 9, p. 1493e1499, 2007.

CAPLAN, AL. Mesenchymal stem cells. **J. Orthop Res**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

CAPLAN, AL. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **Journal of Pathology**, v. 217, n. 2, p. 318-324, 2009.

CARRION, FA & FIGUEROA, FE. Mesenchymal stem cells for the treatment of systemic lupus erythematosus: is the cure for connective tissue diseases within connective tissue? **Stem Cell Res Ther**, v. 11;2(3):23, May 2011.

CARVALHO, OS; COELHO, PMZ; LENZI, HL. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro, **editora FIOCRUZ**. Cap.19, p. 578, 2008.

CHEN, Y; XIANG, LX; SHAO, JZ, *et al.* Recruitment of endogenous bone marrow mesenchymal stem cells towards injured liver. **J Cell Mol Med**, v. 14, p. 1494–1508, 2010.

CHO, KA; JU, SY; CHO, SJ; JUNG, YJ, *et al.* Mesenchymal stem cells showed the highest potential for the regeneration of injured liver tissue compared with other subpopulations of the bone marrow. **Cell Biol Int**. v. 33, p. 772–777, 2009.

CICINELLI, E; IGNARRO, LJ; SCHONAUER, LM, *et al.* Different plasma levels of nitric oxide in arterial and venous blood, **Clin Physiol Funct Imaging**, v. 19, n. 5, p. 440–442, 1999.

CONLON, CP. Schistosomiasis. **Medicine**, v. 31, p. 64-67, 2005.

COSTELLO, R; MALLET, FS; MARANINCHI, D, *et al.* Regulation of CD80/B7-1 and CD86/B7-2 molecule expression in human primary acute myeloid leukemia and their role in allogenic immune recognition. **Eur J Immunol**, v. 28, n. 1, p. 90-103, 1998.

COURA, JR; AMARAL, RS. Epidemiological and control aspects of Schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, p. 13-19, 2004.

COUTINHO, A & DOMINGUES, AL. Specific treatment of advanced schistosomiasis liver disease in man: favourable results. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 82 Suppl 4, p. 335-340, 1987.

CRELLEN, T; WALKER, M; LAMBERTON, PH, *et al.* Reduced Efficacy of Praziquantel Against *Schistosoma mansoni* Is Associated with multiple rounds of mass drug administration. **Clin Infect Dis**, v. 63, n. 9, p.1151-1159, 2016.

CUA, DJ; SHERLOCK, J; CHEN, Y, *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. **Nature**, v. 421, p. 744-748, 2003.

CUI, L; YIN, S; LIU, W, *et al.* Expanded adipose-derived stem cells suppress mixed lymphocyte reaction by secretion of prostaglandin E2. **Tissue Eng**, v. 13, p. 1185–95, 2007.

DA SILVA MEIRELLES, LS; FONTES, AM; COVAS, DT, *et al.* Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine Growth Factor Reviews**, v. 20, p. 419-427, 2009.

DEFRANCO, A; LOCKSLEY R & ROBERT-SON, M. Immunity: The Immune Response in Infectious and Inflammatory Disease. Northants, UK: **New Sciences Press Ltd**. 277, 2007.

DE JESUS, AR; SILVA A; SANTANA, LB, *et al.* Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **J Infect Dis**, v. 185, n. 1, p. 98-105, 2002.

DIETZER & PRATA, A. Rate of reversion of hepatosplenic schistosomiasis after specific therapy. **Rev. Soc. Bras. Med Trop**, v. 19, p. 69-73, 1986.

DI NICOLA, M; CARLO-STELLA, C; MAGNI, M, *et al.* Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3838-3843, 2002.

DOMINICI, MD; LE BLANC, K; MUELLER, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006.

DUNNE, DW; BUTTERWORTH, AE; FULFORD, AJ, *et al.* Immunity after treatment of human schistosomiasis: association between IgE antibodies to adult worm antigens and resistance to reinfection. **Eur J Immunol**, v. 22, n. 6, p. 1483-94, 1992.

DUNNE, DW & COOKE A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, p. 420-426, (2005).

EGGENHOFER, E; BENSELER, V; KROEMER, A, *et al.* Mesenchymal stem cells are short-lived and do not migrate beyond the lungs after intravenous infusion. **Frontiers in Immunology**, v. 3, p. 297, 2012.

HAMS, E; AVIELLO, G; PADRAIC, GF. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? **Frontiers in immunology**, v. 4, Article 89, 2013.

ENGELS, D; CHITSULO, L; MONTRESOR, A, *et al.* The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. **Acta Trop**, v. 82, p.139-146, 2002.

FENWICK, A; SAVIOLI, L; ENGELS, D, *et al.* Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends Parasitol**, v. 19, p. 509-515, 2003.

FIKRY, H; GAWAD, SA; BAHER, W. Therapeutic Potential of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Experimental Liver Injury Induced by *Schistosoma mansoni*: A Histological Study. **Int J Stem Cells**, v. 9, n. 1, p. 96-106, 2016.

FIORE, EJ; MAZZOLIN, G; AQUINO, JB. Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Liver Fibrosis: Recent Findings, Old/New Caveats and Future Perspectives. **Stem Cell Rev**, v. 11, n. 4, p. 586-597, 2015.

FREEMAN, CM; BO-CHIM, C; STOLBERG, VR, *et al.* CCR8 is expressed by antigen-elicited, IL-10-producing CD4⁺CD25⁺ T cells, which regulate Th2-mediated granuloma formation in mice. **J Immunol**, v. 174, p. 1962-1970, 2005.

FRIEDENSTEIN, AJ; CHAILAKHYAN, RK; LATSINIK, *et al.* Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning *in vitro* and retransplantation *in vivo*. **Transplantation**, v. 17, n. 4, p. 331-340, 1974.

FRIEDMAN, Scott L. Liver fibrosis – from bench to bedside. **Journal of Hepatology**, v. 38, S38–S53, 2003.

FRIEDMAN, Scott L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. **Gastroenterology**, v. 134, p. 1655-69, 2008.

FRIEDMAN, Scott L; SHEPPARD, D; DUFFIELD, JS, *et al.* Therapy for Fibrotic Diseases: Nearing the Starting Line. **Science Translational Medicine**, v. 5, p. 167sr1, 2013.

GAEUN, Kim; YOUNG, WE; SOON, KB, *et al.* Therapeutic Effects of Mesenchymal Stem Cells for Patients with Chronic Liver Diseases: Systematic Review and Meta-analysis. **J Korean Med Sci**, v. 30, p. 1405-1415, 2015.

GORDON, RM; GRIFFITHS, RB. Observations on the means by which the cercariae of *S. mansoni* penetrate mammalian skin together with an account of certain morphological changes observed in the newly penetrated larvae. **Ann Trop Med**, v. 45, p. 227-243, 1951.

GRAMIGNOLI, R; TAHAN, V; DORKO, K, *et al.* New potential cell source for hepatocyte transplantation: discarded livers from metabolic disease liver transplants. **Stem Cell Res**, v. 11, p. 563–573, 2013.

GREEN, WE; COLLEY, DG. Modulation of *Schistosoma mansoni* egg-induced granuloma formation: 1- restriction of cell mediated suppression in a chronic parasitic infection. **Proceedings of National Academy of Sciences of the USA**, v. 78, p. 1.151-1.156, 1981.

GRYSEELS, B; POLMAN, K; CLERINX, J, *et al.* Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p. 1106-1118, 2006.

GUIMARAES, AG; DA COSTA, AG; MARTINS-FILHO, OA, *et al.* CD11c⁺CD123^{Low} dendritic cell subset and the triad TNF-alpha/IL-17A/IFN-gamma integrate mucosal and peripheral cellular responses in HIV patients with high-grade anal intraepithelial neoplasia: a systems biology approach. **J Acquir Immune Defic Syndr**, v. 68, p. 112–122, 2015.

HAMEDI-ASL, P; HALABIAN, R; BAHMANI, P, *et al.* Adenovirus-mediated expression of the HO-1 protein within MSCs decreased cytotoxicity and inhibited apoptosis induced by oxidative stresses. **Cell Stress & Chaperones**, v. 17, p.181–190, 2012.

HAMS, E; AVIELLO, G; FALLON, PG. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? **Front Immunol**, v. 4, p. 89, 2013.

HAGAN, P; BLUMENTHAL UJ; HAYES RJ, *et al.* Eosinophilia and resistance to *Schistosoma haematobium* in man. **Parasite Immuno**, v. 7, n. 6, p. 625-32, 1985.

HATZ, CF; VENNERVALD, BJ; NKULILA, T, *et al.* Evolution of *Schistosoma haematobium* -related pathology over 24 months after treatment with praziquantel among school children in southeastern Tanzania. **Am J Trop Med Hyg**, v. 59, n.5, p.775-781, 1998.

HENGSTLER, JG; BRULPORT, M; SCHORMANN, W, *et al.* Generation of human hepatocytes by stem cell technology: definition of the hepatocyte. **Expert Opin Drug Metab Toxicol**, v.1, p. 61–74, 2005.

HERRERA, MB; FONSA TO, V; BRUNO, S, *et al.* Human liver stem cells improve liver injury in a model of fulminant liver failure. **Hepatology**, v. 57, p. 311–9, 2013.

HESSE, M; PICCIRILLO CA; BELKAID, Y. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **J Immunol**, v. 172, n. 5, p. 3157-66, 2004.

HESSE, M; MODELELL M; LA FLAME, AC, *et al.* Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1 / type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by pattern of l-arginine metabolism. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 11, p. 6533-6544, 2001.

HESSE M; PICCIRILLO, CA; BELKAID, *et al.* The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10- producing innate effector and regulatory. **T cells J Immunol**, v. 172, p. 3157-3166, 2004.

HIBBS, J; TAINTOR, R; VAVRIN, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deaminase activity and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v. 235, p. 473-476, 1987.

HOFFMANN, KF; CHEEVER, AW; WYNN, TA. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **J Immunol**, v.164, n. 12, p. 6406-6416, 2000.

HORIGUCHI, K; HIRANO, T; UEKI, T, *et al.* Treating liver cirrhosis in dogs with hepatocyte growth factor gene therapy via the hepatic artery. **J Hepatobiliary Pancreat Surg**, v. 16, p. 171 –7, 2009.

HORWITZ, EM; PROCKOP, DJ; FITZPATRICK, LA, *et al.* Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta. **Nat Med**, v. 5, n. 3, p. 309-313, 1999.

IZADPANA, R; TRYGG, C; PATEL, B, *et al.* Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 5, p.1285-1297, 2006.

JAMES M. Fox; CHAMBERLAIN, G; ASHTON, BA, *et al.* Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. **British Journal of Haematology**, v. 136, 6, p. 491-502, 2007.

JIANG & JIANYONG, Xu. Immune modulation by mesenchymal stem cells. **Cell proliferation**, 2020.

JONES, S; HORWOOD, N; COPE, *et al.* The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. **J Immunol**, v.179, n. 5, p. 2824-2831, 2007.

KATZ, N & ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, v. 55, n.1, p. 38-43, 2003.

KAZUTOSHI, Takahashi & SHINYA, Yamanaka. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**. v. 126, p. 663–676, 2006.

KAZUYA, Sato; KATSUTOSHI, Ozaki; IEKUNI, Oh, *et al.* Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. **Blood**, v. 109, n. 1, Janeiro, 2007.

KRAMPERA, M; MAGGI, E; ROMAGNANI S, *et al.* TLR3 and TLR4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing notch signalling. **Stem Cells**, v. 26, p. 279–289, 2008.

KANAZAWA, H; FUJIMOTO, Y; TERATANI, T, *et al.* Bone marrow-derived mesenchymal stem cells ameliorate hepatic ischemia reperfusion injury in a rat model. **PLoS One**, v. 6: e19195, 2011.

KUBO, M; YAMASHITA, M; ABE, R, *et al.* CD28 costimulation accelerates IL-4 receptor sensitivity and IL-4-mediated Th2 differentiation. **J Immunol**, v. 163, n. 5, p. 2432-42, 1999.

KUO, TK; HUNG, SP; CHUANG, CH; CHEN, *et al.* Stem cell therapy for liver disease: parameters governing the success of using bone marrow mesenchymal stem cells. **Gastroenterology**, v. 134, p. 2111–21. 21 e1-3, 2008.

LAMBERTUCCI JR; SERUFO, JC; Gerspacher-Lara, *et al.* *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Trop**, v. 77, p. 101-109, 2000.

LENZI, HL; KIMMEL, E; SCHECHTMAN, H, *et al.* Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93 Suppl 1, p. 141-151, 1998.

LI, Q; ZHOU, X; SHI, Y, *et al.* *In vivo* tracking and comparison of the therapeutic effects of MSCs and HSCs for liver injury. **PLoS One**, v. 8, e62363. 85, 2013.

LIEW, FY. Nitric oxide in infections and autoimmune diseases. **Ciba Found Symp**, 195, p. 234-239, 1995.

LILI, Tao & Tiffany A. Reese. Making Mouse Models That Reflect Human Immune Responses. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 3. 2017.

LUIZA-SILVA, M; CAMPI-AZEVEDO, AC; BATISTA, *et al.* Cytokine signatures of innate and adaptive immunity in 17DD yellow fever vaccinated children and its association with the level of neutralizing antibody. **J Infect Dis**, v. 204, p. 873–883, 2011.

MELO, KM & Carvalho, BTC. Células T regulatórias: mecanismo de ação e função nas doenças humanas. **Rev Bra Alerg Immunopatol**. v. 32, n. 5, p. 184 – 188, 2009.

MANDELBROT, DA; McADAM, AJ; SHARPE, AH. B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4). **J Exp Med**, v. 189, n. 2, p. 435-40, 1999.

MATHEW, RC; BOROS, DL. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. **Infect Immun**, v. 54, n. 3, p. 820-826, 1986.

MARTINS-LEITE, P; GAZZINELLI, G; ALVES-OLIVEIRA, LF, *et al.* Effect of chemotherapy with praziquantel on the production of cytokines and morbidity associated with schistosomiasis mansoni. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 8, p. 2780-2786, 2008.

MA, XR; TANG, YL; XUAM, M; CHANG, *et al.* Transplantation of autologous mesenchymal stem cells for end-stage liver cirrhosis: a meta-analysis based on seven controlled trials. **Gastroenterol Res Pract**. 2015.

MBOW, M; LARKIM, BM; MEURS, L. *et al.* T - Helper 17 cells are associated with pathology in human schistosomiasis. **J. Infect. Dis**, v. 207, p. 186-195, 2008.

McKEE, AS & PEARCE, EJ. CD25⁺CD4⁺ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J Immunol**, v. 173, p. 1224-1231, 2004.

MIRANDA, VHS, *et al.* Avaliação do efeito das células-tronco mesenquimais na terapêutica da esquistossomose mansoni experimental. Dissertação de mestrado. **Fiocruz Minas**, 2016.

MOHAMMADZADEH, M; HALABIAN, R; GHAREHBAGHIAN, A, *et al.* Nrf-2 overexpression in mesenchymal stem cells reduces oxidative stress-induced apoptosis and cytotoxicity. **Cell Stress & Chaperones**, v.17, p. 553–565, 2012.

MUZUMDAR, MD; TASIC, B; MIYAMICHI, K, *et al.* A global double-fluorescent Cre reporter mouse. **Genesis**, v. 45, n. 9, p.593-605, 2007.

NAJAR, M; RAICEVIC, G; FAYYAD-KAZAN, H; BRON, D, *et al.* Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. **Cytotherapy**. v. 18, n. 2, p. 160-171, 2016.

NARMADA, BC; CHIA, SM; TUCKER-KELLOGG L, *et al.* HGF regulates the activation of TGF-beta1 in rat hepatocytes and hepatic stellate cells. **J Cell Physiol**, v. 228, p. 393–401, 2013.

OLDS, GR; DASARATHY, S. Schistosomiasis. **Curr Treat Options Infect Dis**, v. 2, p. 88-99, 2000.

OLIVEIRA, DM; CARMO, AS; SILVA-TEIXEIRA, *et al.* Immunization with PIII, a Fraction of *Schistosoma mansoni* Soluble Adult Worm Antigenic Preparation, Affects Nitric Oxide Production by Murine Spleen Cells. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 175-180, 1998.

OLIVEIRA, DM; GUSTAVSON, S; SILVA-TEIXEIRA, DN, *et al.* Nitric oxide and IL-10 production induced by PIII—A fraction of *Schistosoma mansoni* adult worm antigenic preparation- associated with downregulation of *in vitro* granuloma formation. **Hum Immunol**, v. 60, p. 305-311, 1999.

OLIVEIRA, DM; SILVA-TEIXEIRA, DN; GUSTAVSON, *et al.* Nitric oxide interaction with IL-10, MIP-1a, MCP-1 and RANTES over the *in vitro* granuloma formation against different *Schistosoma mansoni* antigenic preparations on human schistosomiasis. **Parasitology**, v. 120, p. 391-398, 2000.

OLIVEIRA, FA. Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas drogas sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni*. Belo Horizonte: Fundação Oswaldo Cruz / Centro de Pesquisas René Rachou, 2005.

OLIVEIRA, FA; KUSEL, JR; RIBEIRO, F, *et al.* Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. **Parasitology**, v. 132, Pt 3, p. 321-330, 2006.

ORTIZ, LA; DUTREIL, M; FATTMAN, C, *et al.* Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104, p. 11002–11007, 2007.

PANETTIERE, P; ACCORSI D; MARCHETTI, L. The Role of Free Fat Graft in Breast Reconstruction After Radiotherapy. **Current Concepts in Plastic Surgery**, 2011.

PAREKKADAN, B; VAN POLL, D; MEGEED, Z, *et al.* Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 363, p. 247 –252, 2007.

PAREKKADAN, B; VAN POLL, D; SUGANUMA, K, *et al.* Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. **PLoS One**, v. 2, e941, 2007.

PARRA, JC; DOUGHTY, B; COLLEY, *et al.* Human Schistosomiasis mansoni: studies on *in vitro* granuloma modulation. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 87 Suppl 5, p. 79-81, 1992.

PEARCE, WJ. Mechanisms of hypoxic cerebral vasodilatation. **Pharmacol Ther.** v. 65, p. 75-91, 1995.

PEARCE, EJ & MACDONALD, AS. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

PELLEGRINO, JE & SIQUEIRA, AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. **Revista Brasileira de Malariologia e Doenças Tropicais**, v. 8, p. 589–597, 1956.

PELLEGRINO, J & KATZ, N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. **Adv Parasitol**, v. 6, p. 233-290, 1968.

PITTENGER, MF; MACKAY, AM; BECK, SC, *et al.* Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. **Science**, v. 284, n. 5411, p. 143-147, 1999.

PRATA, A; BINA, JC. Development of the hepatosplenic form of schistosomiasis (A study of 20 patients observed during a 5 years period). **Gaz. Med. Bahia**, v. 68, p. 49–60, 1968.

PULAVENDRAN, S; VIGNESH, J; ROSE, C. Differential anti-inflammatory and anti-fibrotic activity of transplanted mesenchymal vs. hematopoietic stem cells in carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. **Int Immunopharmacol**, v. 10, p. 513–519, 2010.

REESE, TA; KAMBAL, A; FILALI, MA, *et al.* Sequential infection with common pathogens promotes human-like immune gene expression and altered vaccine response. **Cell Host Microbe**, v. 19, p. 713–719, 2016.

RIBEIRO, PJ; AGUIAR, LAK; TOLEDO, CF. Educational program in schistosomiasis: a model for a methodological approach. **Revista de Saúde Pública**, v. 38. P. 415-421, 2004.

RICHARDS, F; SULLIVAN, J; RUIZ-TIBEN, E, *et al.* Effect of praziquantel on the eggs of *Schistosoma mansoni*, with a note on the implications for managing central nervous system schistosomiasis. **Ann Trop Med Parasitol**, v.83, n. 5, p.465-72, 1989.

RIHET, P; DEMEURE, CE; BOURGOIS, A, *et al.* Evidence for an association between human resistance to *Schistosoma mansoni* and high anti-larval IgE levels. **Eur J Immunol**, v. 21, n. 11, p. 2679-86, 1991.

ROBBINS. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1251, 2000.

ROCKEY, DC & CHUNG, JJ. Interferon gamma inhibits lipocyte activation and extracellular matrix mRNA expression during experimental liver injury: implications for treatment of hepatic fibrosis. **J Investig Med**, v. 42, p. 660-670, 1994.

ROTHENBERG, ME & HOGAN, SP. The eosinophil. **Annu Rev Immunol**, v. 24, p. 147-174, 2006.

RUMBLEY, AC; ZEKAVAT, A; SUGAYA, H, *et al.* The *Schistosoma* Granuloma: Characterization of Lymphocyte Migration, Activation, and Cytokine Production. **J Immunol**, v. 161, p. 4129-4137, 1998.

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. **J Immunol**, v. 175, p. 3920-3926, 2005.

SACONATO, H & ATALLAH, A. Interventions for treating schistosomiasis mansoni. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2, CD000528, 2000.

SAUNDERS, KA; RAINE, T; COOKE, A, *et al.* Inhibition of autoimmune type 1 diabetes by gastrointestinal helminth infection. **Infect Immun**, v. 75, p. 397-407, 2007.

Schistosomiasis. **WHO**. 2017.

SHUKLA, L; WAYNE, A; MORRISON, RS. Adipose-derived stem cells in radiotherapy injury: a new frontier. **Front. Surg**, 28, 2015.

SOUZA, RP; CARDOSO, LS; LOPES, G, *et al.* Cytokine and Chemokine Profile in Individuals with Different Degrees of Periportal Fibrosis due to *Schistosoma mansoni* Infection. **J. Parasitol. Res**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

SUMMERS, RW; ELLIOTT, DE; QADIR, K, *et al.* *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**, v. 98, p. 2034-41, 2003.

STELMA, FF; TALLA, I; SOW, S, *et al.* Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **Am J Trop Med Hyg**, v. 53, p. 167-170, 1995.

SHAWN, Rose; ALEXANDER, Misharin; HARRIS, Perlman. A novel Ly6C/Ly6G-based strategy to analyze the mouse splenic myeloid compartment. **Cytometry A**, v. 81, n. 4, p. 343–350, 2012.

SHINODA, K; TOKOYODA, K; HANAZAWA, A, *et al.* Type II membrane protein CD69 regulates the formation of resting T-helper memory. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 19, p. 7409-14, 2012.

SMITH, PM; SHAINHEIT, MG; BAZZONE, LE, *et al.* Genetic Control of Severe Egg-Induced Immunopathology and IL-17 Production in Murine Schistosomiasis. **J Immunol**, v. 183, p. 3317-3323, 2009.

SILVEIRA, AM; GAZZINELLI, G; ALVES-OLIVEIRA, LF, *et al.* Human schistosomiasis mansoni: intensity of infection differentially affects the production of interleukin-10, interferon-gamma and interleukin-13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 98, n.9, p. 514-519, 2004.

SILVEIRA-LEMOES, D; TEIXEIRA-CARVALHO, A; MARTINS-FILHO, AO, *et al.* High expression of co-stimulatory and adhesion molecules are observed on eosinophils during human *Schistosoma mansoni* infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101, Suppl. I, p. 345-351, 2006.

SOARES, MB; GARCIA, S; CAMPOS DE CARVALHO, AC, *et al.* Cellular therapy in Chagas' disease: potential applications in patients with chronic cardiomyopathy. **Regen Med**, v. 2, n. 3, p. 257-264, 2007.

SOARES, MB; LIMA, RS; SOUZA, BS, *et al.* Reversion of gene expression alterations in hearts of mice with chronic chagasic cardiomyopathy after transplantation of bone marrow cells. **Cell Cycle**, v. 10, n. 9, p. 1448-1455, 2011.

STAMPER, CC; ZHANG, Y; TOBIN, JF, *et al.* Crystal structure of the B7-1/CTLA-4 complex that inhibits human immune responses. **Nature**, v. 410, n. 6828, p. 608-11, 2001.

SUMMERS, RW; ELLIOTT, DE; QADIR, K, *et al.* *Trichuris suis* seems to be safe and possibly effective in the treatment of inflammatory bowel disease. **Am J Gastroenterol**, v. 98, p. 2034-41, 2003.

SUNG, JH; YANG, HM; PARQUE, JB. *et al.* Isolation and characterization of mouse mesenchymal stem cells. **Transplantation Proceedings**, v.40, p.2649-2654, 2008.

SUN, LY; ZHANG, HY; FENG, XB, *et al.* Abnormality of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in patients with systemic lupus erythematosus. **Lupus**, v.16, n. 2, p. 121-128, 2007.

TAYLOR, JJ; MOHRS, M; PEARCE, EJ. Regulatory T cell responses develop in parallel to Th responses and control the magnitude and phenotype of the Th effector population. **J Immunol**. v. 176, p. 5839-5847, 2006.

TEIXEIRA-CARVALHO, A; MARTINS-FILHO, AO; PERUHYPE-MAGALHAES, V, *et al.* Cytokines, chemokine receptors, CD4⁺CD25^{HIGH}⁺ T-cells and clinical forms of human schistosomiasis. **Acta Trop**,v. 108,n. 2-3, p. 139-149, 2008.

TESTI, R; AMBROSIO, D; De MARIA, R, *et al.* The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. **Immunol Today**, v. 15, n. 10, p. 479-83, 1994.

THAKUR, RS; TOUSIF, S; AWASTHI, V, *et al.* Mesenchymal stem cells play an important role in host protective immune responses against malaria by modulating regulatory T cells. **Eur J Immunol**, v. 43, n. 8, p. 2070-2077, 2013.

THOMAS, MB & ZHU, AX. Hepatocellular carcinoma: the need for progress. **J. Clin. Oncol**, v. 23, p. 2892–99, 2005.

TOGEL, F; HU, Z; WEISS, K, *et al.* Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 289, p. 31–42, 2005.

TSUYUKI, S; TSUYUKI, J; EINSLE K, *et al.* Costimulation through B7-2 (CD86) is required for the induction of a lung mucosal T helper cell 2 (TH2) immune response and altered airway responsiveness. **J Exp Med**, v. 185, n. 9, p. 1671-9, 1997.

UCCELLI, A; MORETTA, L; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 8 n. 9, p. 726-736, 2008.

VIEIRA, P; MIRANDA, HP; CERQUEIRA, M, *et al.* Latent schistosomiasis in Portuguese soldiers. **Mil Med**, v. 172, n. 2, p. 144-146, 2007.

VOLAREVIC, V; NURKOVIC, J; ARSENIJEVIC, *et al.* Concise review: Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for the treatment of acute liver failure and cirrhosis. **Stem Cells**, v. 32, p. 2818–2823, 2014.

WAGERS, AJ & WEISSMAN, IL. Plasticity of adult stem cells. **Cell**, v. 116, n. 5, p. 639- 48, 2004.

WALUNAS, TL; LENSCHOW, DJ; BAKKER, CY, *et al.* CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. **Immunity**, v. 1, n. 5, p. 405-13, 1994.

WANG, W; DAI, JR; LI, HJ, *et al.* The Sensitivity of *Schistosoma japonicum* to Praziquantel: A Field Evaluation in Areas with Low Endemicity of China. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 5, p. 834-836, 2012.

WEI, X; YANG, X; HAN, *et al.* Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. **Acta Pharmacol Sin**, v. 34, n. 6, p. 747-754, 2013.

WHO. **Schistosomiasis**. Fact sheet: 115, 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 10 out. 2015.

WUNM, TA & CHEEVER, AW. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, p. 505-511, 1995.

XIAO, S; TANNER, M; N'GORAN, EK, *et al.* Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. **Acta Trop**, v. 82, p. 175-181, 2002.

XIN, W; YANG, X; HAN, z. *et al.* Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 34, p. 747-754, 2013.

XU, H; QIAN, H; ZHU, W, *et al.* Mesenchymal stem cells relieve fibrosis of *Schistosoma japonicum*-induced mouse liver injury. **Exp Biol Med**, v. 237, n. 5, p. 585-592, 2012.

YAP, G; CASPAR, P; JANKOVIC, D, *et al.* Unimpaired down-modulation of the hepatic granulomatous response in CD8T cell and IFN- α deficient mice chronically infected with *Schistosoma mansoni*. **Infection and Immunity**, v. 65, p. 2.583-2.586, 1997.

YASUMA, Yoshizumi; HIROSHI, Yukawa; RYOJI, Iwaki, *et al.* Immunomodulatory Effects of Adipose Tissue-Derived Stem Cells on Concanavalin A-Induced Acute Liver Injury in Mice. **Cell Medicine**, v. 9, p. 21–33, 2016.

YING, Wang; XIAODONG, Chen; WEI, Cao, *et al.* Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. **Nature immunology**, v. 15, p. 11, 2014.

YU, J & THOMSON, JA. Pluripotent stem cell lines. **Genes Dev**, v. 22, n.15, p.1987-97, 2008.

ZIEGLER, SF; RAMSDELL, F; HJERRILD, KA, *et al.* Molecular characterization of the early activation antigen CD69: a type II membrane glycoprotein related to a family of natural killer cell activation antigens. **Eur J Immunol**, v. 23, n. 7, p. 1643-8, 1993.

ZONI, AC; CATALA, L; AULT, SK. Schistosomiasis Prevalence and Intensity of Infection in Latin America and the Caribbean Countries, 1942-2014: A Systematic Review in the Context of a Regional Elimination Goal. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 10, n. 3, e0004493, 2016.

ZORZETTO, R. Células-troco em revisão. **Pesquisa FAPESP**, v. 260. p. 18-23, 2017.

ZUK, PA; ZHU, M; MIZUNO, H, *et al.* Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7,n. 5, p. 211-228, 2001.

ZUK, PA; ZHU, M; ASHIJAN, P, *et al.* Human adipose tissue is a source of multipotent stem cell. **Molecular Biology of the Cell**. v.13, p.4279-4295, 2002.

ANEXOS

Anexo 1.1

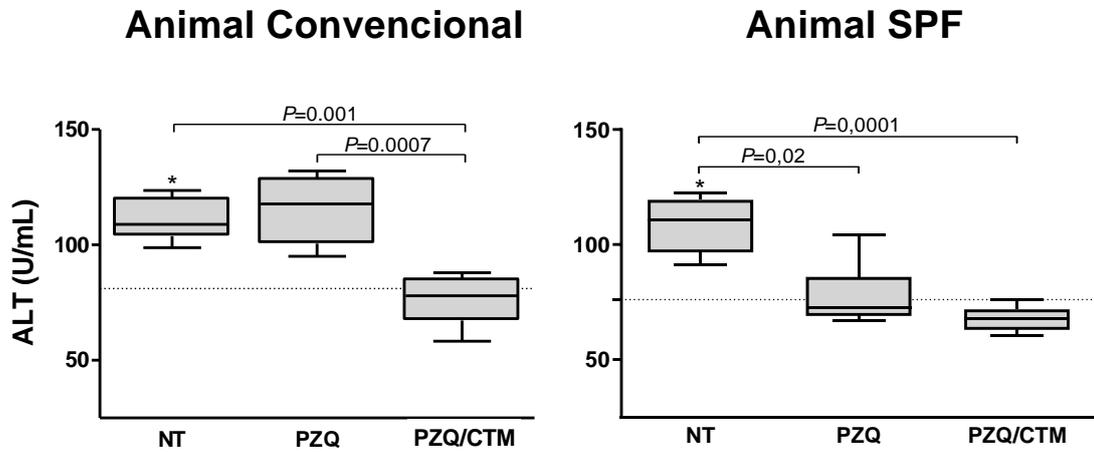


Figura suplementar 1. Gráficos individuais da dosagem dos níveis séricos de ALT de animais convencionais e animais SPF. Soro de camundongos C57BL/6 convencional ou SPF infectados por *S. mansoni* tratados com PZQ ou PZQ/CTM no tempo 15 dias. Dados representam a mediana \pm desvio padrão. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = grupo tratado com PZQ associado às células-tronco derivadas do tecido adiposo. (*) Indica uma diferença significativa entre os grupos saudável e não tratado.

Anexo 1.2

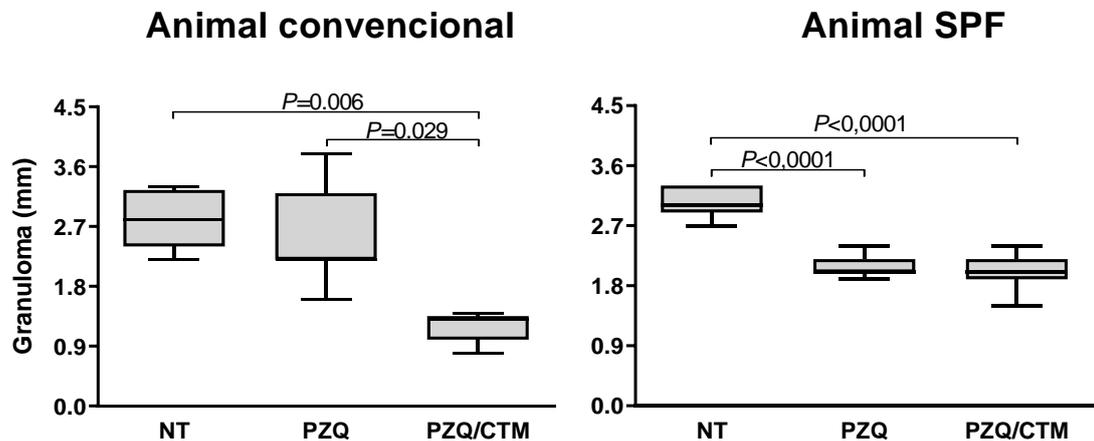


Figura suplementar 2. Gráficos individuais do tamanho do granuloma de animais convencionais e animais SPF. Análises histológicas do fígado de camundongos C57BL/6 convencional ou SPF infectados por *S. mansoni* tratados com PZQ ou PZQ/CTM no tempo 15 dias. Dados representam a mediana \pm desvio padrão. NT = grupo não tratado. PZQ = grupo tratado com praziquantel. PZQ/CTM = grupo tratado com PZQ associado às células-tronco derivadas do tecido adiposo.

Anexo 1.3

Licença CEUA:

	Ministério da Saúde FIOCRUZ Fundação Oswaldo Cruz Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência		CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais
LICENÇA		LW-10/17	
<p>Certificamos que o protocolo (P-31/16-7), intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS SOBRE A REAÇÃO GRANULOMATOSA E FIBROSE HEPÁTICA DECORRENTES DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL", sob a responsabilidade de Érica Alessandra Rocha Alves, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.</p>			
<p>Esta licença tem validade até 28/03/2021 e inclui o uso total de :</p>			
<p><i>Mus musculus</i> - 120 Machos de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 17,0000 Grama(s).</p>			
<p><i>Mus musculus</i> - 150 Machos de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 17,0000 Grama(s).</p>			
<p><i>Mus musculus</i> - 96 Machos de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 17,0000 Grama(s).</p>			
<p><i>Mus musculus</i> - 96 Machos de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 17,0000 Grama(s).</p>			
<p><i>Mus musculus</i> - 48 Machos de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 17,0000 Grama(s).</p>			
<p><i>Mus musculus</i> - 48 Machos de C57BL/6, Idade: 6 Semana(s), Peso: 17,0000 Grama(s).</p>			
<p>Rio de Janeiro, 28 de março de</p>			
 Etelice M. Malinaro Vice-Coordenadora CEUA/FIOCRUZ SIAPE 0483096	Octavio Augusto França Presgrave Coordenador da CEUA		
 Octavio A. F. Presgrave Coordenador CEUA/FIOCRUZ SIAPE 04826590 08/03/17 Comissão de Ética no Uso de Animais Vice-presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência - Fundação Oswaldo Cruz Av. Brasil, 4036 - Prédio da Expansão - sala 200 - Marquinhos - Rio de Janeiro / RJ Telefone: (21) 3882.9121 e-mail: ceua@fiocruz.br			