



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

TESE DE DOUTORADO

**ASPECTOS CLÍNICOIMUNOLÓGICOS E PERFIL DE CÉLULAS LINFOIDES
INATAS DO TIPO 2 (ILC2) DE INDIVÍDUOS COM ESQUISTOSSOMOSE
MANSÔNICA HUMANA**

MICHAEL NASCIMENTO MACEDO

Salvador - Bahia

2020

IGM

MICHAEL NASCIMENTO MACEDO

**Aspectos clínicoimunológicos e perfil de células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2)
de indivíduos com esquistossomose mansônica humana**

2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana

**ASPECTOS CLÍNICOIMUNOLÓGICOS E PERFIL DE CÉLULAS LINFOIDES
INATAS DO TIPO 2 (ILC2) DE INDIVÍDUOS COM ESQUISTOSSOMOSE
MANSÔNICA HUMANA**

MICHAEL NASCIMENTO MACEDO

Orientador: Dr. Ricardo Riccio Oliveira

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia Humana para a obtenção do grau de Doutor.

Salvador – Bahia

2020

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

M141a Macedo, Michael Nascimento.
Aspectos clínicoimunológicos e perfil de células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) de indivíduos com esquistossomose mansônica humana / Michael Nascimento Macedo. - 2020.
160 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Dr. Ricardo Riccio Oliveira, Laboratório de Patologia Experimental.

Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2020.

1. Esquistossomose mansoni.
2. Células linfoides.
3. Citocinas.
4. IL-13.
5. Fibrose. I. Título.

CDU 616.993.122

"ASPECTOS CLÍNICO-IMUNOLÓGICOS E PERFIL DAS CÉLULAS LINFOIDES INATAS DO TIPO 2 (ILC2) DE INDIVÍDUOS COM ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA HUMANA"

MICHAEL NASCIMENTO MACEDO

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 13 de julho de 2020.

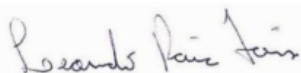
COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Alex José Leite Torres
Professor
UFBA



Dra. Luciana Santos Cardoso
Professora
UFBA



Dr. Leonardo Paiva Farias
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Ricardo Riccio Oliveira
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil
(CAPES) - Código de Financiamento 001.

Edital Jovem Cientista Baiano Nº 008/2015, número 10041/2015.

Programa de Mobilidade Acadêmica da Fiocruz, Edital 2017, em conformidade
com Programa de Integração da Fiocruz.

Laboratório de Patologia Experimental do Instituto Gonçalo Moniz (IGM).

Dedico este trabalho aos meus pais, Erivaldo e Joselita, e a minha irmã, Karen. Obrigado por todo amor e apoio ao longo desses anos.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, aos meus amigos e a minha noiva, Taciana.

A todos os indivíduos acometidos pela esquistossomose, afinal toda essa dedicação visa a sua melhoria de vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr. Ricardo Riccio Oliveira, pela oportunidade, orientações, comprometimento e compreensão nos momentos necessários.

A Yuri Tabajara Pereira Costa dos Santos, pela colaboração durante os experimentos e discussões científicas, sempre muito proveitosas, além da amizade cultivada por todos esses anos.

A minha noiva Taciana Sant'Ana, por todo amor, imensurável apoio, encorajamento, discussões, compreensão e a sua dedicação a mim em todos momentos dessa caminhada.

A Thairone Moura, Thainá Fialho e Andressa Lima pelas colaborações durante toda a realização deste trabalho.

Aos agentes comunitários do município do Conde, Bahia, Brasil, Adaliudes da Conceição, Aline Oliveira e Luciana Quintela pela dedicação aos residentes nesta região e por todo apoio durante toda a realização deste trabalho.

Aos coordenadores dos projetos multidisciplinares que vem sendo desenvolvidos no Conde, Dr. Ricardo Riccio Oliveira e Dra. Isadora Cristina de Siqueira e demais colaboradores, pelo belo trabalho desenvolvido.

Aos amigos do Instituto Gonçalo Moniz (IGM-FIOCRUZ), Yuri Tabajara, Thairone Moura, Thainá Fialho, Andressa Lima, Antônio Santos, Ronald Alves, Thiago Cardoso, Cayo Abreu, Scarlet Mota, Kelvin Jesus, Ane Casaes e Bruna Oliveira, por terem contribuído em algum momento, de maneira direta ou indireta, durante a realização do trabalho.

A Dra. Vera Silvia de Freitas Vinhas, por ter acreditado em mim e ter aberto as portas do meio científico, que era um sonho de vida.

Meus sinceros agradecimentos a todos os membros da banca examinadora por aceitarem o convite.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana.

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta, mas que porventura não puderam ser citados aqui.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.”

Carl Sagan

MACEDO, Michael Nascimento. Aspectos clínicoimunológicos e perfil de células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) de indivíduos com esquistossomose mansônica humana. 160 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A esquistossomose é uma doença causada por parasitas do gênero *Schistosoma*. Atualmente, sabe-se que cinco diferentes espécies podem causar doença no homem, dentre elas o *Schistosoma mansoni*, causador da esquistossomose no Brasil. Essa doença se distribui em 78 países e acomete aproximadamente 250 milhões de pessoas. A fase aguda da infecção é marcada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto a fase crônica caracteriza-se por um predomínio de citocinas do tipo 2. Apesar dessa mudança para o polo Th2 na fase crônica da infecção ser favorável ao controle do parasito, a longo prazo esta resposta pode ser responsável pelos danos observados na doença. Um grupo recentemente descoberto de células, as células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2), vem sendo descrito como importantes no contexto de doenças que cursam com uma resposta Th2, como nas helmintíases. Acredita-se que nestas condições as ILC2 sejam fundamentais produtoras de citocinas do tipo 2, como a IL-13, que pode contribuir para os principais eventos danosos. Apesar disso, o seu papel na esquistossomose mansônica humana ainda não foi elucidado. **OBJETIVO:** O objetivo deste trabalho foi caracterizar o fenótipo e perfil de citocinas de células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) circulantes em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram recrutados indivíduos infectados pelo *S. mansoni* residentes em uma área endêmica e controles saudáveis não residentes. As citocinas séricas avaliadas foram dosadas por meio de ELISA e CBA (Th1, Th2 e Th17). Também foram utilizadas amostras de soro para a avaliação das concentrações séricas das enzimas hepáticas TGO, TGP, γ GT e ALP, para avaliação indireta de danos hepáticos. A frequência das ILC2 foi avaliada por citometria de fluxo e a sua cultura foi realizada após separação destas por *sorting*. A produção das citocinas por ILC2 isoladas por *sorting* também foi avaliada pelos métodos de ELISA e CBA. **RESULTADOS:** Os dados deste trabalho mostram que indivíduos infectados pelo *S. mansoni* apresentam elevadas concentrações séricas das citocinas TSLP e IL-13, e que o tratamento da doença induz à redução desses níveis. Além disso, também foi possível observar que estes indivíduos apresentam significativas alterações nas concentrações das enzimas hepáticas TGO, TGP, γ GT e ALP. Além disso, o coeficiente de Ritis (preditor de cronicidade) mostrou que 98,5% dos participantes podem apresentar lesões crônicas. Apesar de não haver diferença na frequência das ILC2 entre infectados e controles, os indivíduos com esquistossomose apresentam maior expressão do receptor CRTH2. Além disso, as ILC2 isoladas por *sorting* de indivíduos infectados, também produzem mais IL-13 em comparação com os controles. **CONCLUSÕES:** Com esse estudo, foi possível demonstrar que o tratamento da esquistossomose mansônica humana diminui as concentrações séricas das citocinas TSLP e IL-13, envolvidas nos processos de manutenção e homeostase. A partir dos resultados, sugere-se que as ILC2 podem ser uma importante fonte de IL-13, uma vez que indivíduos infectados apresentam elevadas concentrações no soro e essa alta concentração também pôde ser demonstrada por ILC2 *in vitro*.

Palavras-chave: Esquistossomose mansoni, Células linfoides inatas do tipo 2, CRTH2, citocinas, TSLP, IL-13, fibrose.

MACEDO, Michael Nascimento. Clinical and immunological aspects and profile of group 2 innate lymphoid cells (ILC2) of individuals with human schistosomiasis mansoni. 160 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Schistosomiasis is a disease caused by parasites of *Schistosoma* genus. Five different species cause human infection, among them the *Schistosoma mansoni*, responsible for schistosomiasis in Brazil. This disease is distributed by 78 countries affecting about 250 million people. The acute phase of the disease is characterized by Th1 cytokine production, while in the chronic phase, there is a predominance of the type 2 cytokines, which at long term, is more related to damage instead of the curative response. A group of recently discovered cells, the type 2 innate lymphoid cells (ILC2), has been described in the context of diseases with type 2 responses, as in helminthiasis. Recent data shows that ILC2 are crucial as a source of Th2 cytokines, as IL-13, contributing to the main harmful events. Nevertheless, the role of ILC2 in human schistosomiasis is still unclear. **AIM:** The aim of this study was to characterize the circulating type 2 innate lymphoid cells (ILC2) in *Schistosoma mansoni* infected individuals. **MATERIAL AND METHODS:** *S. mansoni* infected individuals were recruited from an endemic area and the health control individuals were recruited from non-endemic area. The assessment of serum cytokines was performed after blood was collect and serum separation, by ELISA and CBA (Th1, Th2 and Th17). **RESULTS:** The present data shows that *S. mansoni* infected individuals present high levels of TSLP and IL-13 cytokines, and that the schistosomiasis treatment decrease these levels. Moreover, this study also shows that the participants have increased serum concentrations of the hepatic enzymes TGO, TGP, γ GT e ALP. In addition, the Ritis coefficient (predictor of chronicity) suggest that 98.5% of participants may have chronic injuries. Although there is no difference in the frequency of ILC2 from infected individuals and healthy controls, the individuals with schistosomiasis present more expression of CRTH2 receptor. In addition, sorting isolated ILC2 from infected individuals, also produce more IL-13 as compared to healthy controls. **CONCLUSIONS:** In this study, we demonstrated that schistosomiasis treatment decrease the concentrations of TSLP and IL-13 cytokines, involved in maintenance and homeostasis processes. The results also indicate that ILC2 are a font of IL-13, once infected individuals show high serum levels, and this also can be demonstrated by ILC2 *in vitro*.

Keywords: Schistosomiasis mansoni, Group 2 innate lymphoid cells, CRTH2, cytokines, TSLP, IL-13, fibrosis.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina trifosfato

ALP – Fosfatase alcalina

CCI – coquetel de citocinas

CCL3 - Quimiocina (C-C motivo) ligante 3

CD1d – Grupamento de diferenciação 1d

CD3 – Grupamento de diferenciação 3

CD4 – Grupamento de diferenciação 4

CD8 – Grupamento de diferenciação 8

CD14 – Grupamento de diferenciação 14

CD19 – Grupamento de diferenciação

CD34 – Grupamento de diferenciação 34

CD56 – Grupamento de diferenciação 56

CD68 – Grupamento de diferenciação 68

CD117 – Grupamento de diferenciação 117

CD127 – Grupamento de diferenciação 127

CD154 – Grupamento de diferenciação 154

CD205 – Grupamento de diferenciação 205

CRTH2 - *chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on T helper (Th)2 cells* ou molécula homóloga do receptor quimioatraente expressa em células T auxiliares (Th) 2

DALY - *Disability-adjusted life-years* ou anos de vida perdidos ajustados à incapacidade

DPOC – Doença obstrutiva crônica

DTN – Doenças tropical negligenciada

IFN- γ – Interferon gamma

IgE – imunoglobulina E

ILC – Célula linfoide inata

ILC1 – Célula linfoide inata do tipo 1

ILC2 – Célula linfoide inata do tipo 2

ILC3 – Célula linfoide inata do tipo 3

IL-1 – Interleucina 1

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-5 – Interleucina 5

IL-6 – Interleucina 6

IL-7R α – Receptor alfa de interleucina 7

IL-10 – Interleucina 10

IL-12p40 – Interleucina 12 p40

IL-13 – Interleucina 13

IL-15 – Interleucina 15

IL-17 – Interleucina 17

IL-18 – Interleucina 18

IL-22 – Interleucina 22

IL-25 – Interleucina 25

IL-33 – Interleucina 33

ILC2 – Célula linfoide inata do tipo 2

FITC – Isotiocianato de fluoresceína

GATA3 – Proteína de ligação GATA 3

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos

Lin⁻ - Linhagem negativa

LTi – Células indutoras de tecido linfoide

MDA – *Mass drug administration* ou programa de administração de medicamentos em massa.

MIP-1 α - *Macrophage Inflammatory Protein 1alpha* ou proteína inflamatória de macrófagos 1alpha

NCR – Receptor natural de citotoxicidade

NF κ B – fator nuclear kappa B

NK – Células assassinas naturais

NKT – Células T assassinas naturais

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico

pDCs – Células dendríticas plasmocitóides

PGD₂ – prostaglandina D₂

SNIS – Sistema nacional de informações sobre saneamento

TCR – receptor de célula T

TGO - transaminase glutâmico oxalacética

TGP - transaminase glutâmico pirúvica

Th1 – T helper 1

Th2 – T helper 2

TLR – Toll like receptor

TNF – Fator de necrose tumoral

TSLP – Linfopoiétina estromal tímica

T $\gamma\delta$ – Células T gamma delta

γ GT- gama glutamil transferase

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	24
Figura 2. Resposta imune na esquistossomose	27
Figura 3. A família das células linfoides inatas (ILCs)	32
Figura 4. Receptores relacionados com a ativação das ILC2	35

CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: Tratamento da esquistossomose reduz a produção de TSLP e IL-13 em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* residentes em uma área endêmica.

Figura 1. Localização geográfica dos povoados de Buri, Camarões e Jenipapo, Conde, Bahia.	49
Figura 2. Avaliação do perfil sérico Th2 de indivíduos infectados pelo <i>S. mansoni</i> antes e após o tratamento com praziquantel.	55
Figura 3. Avaliação do perfil sérico Th1 de indivíduos infectados pelo <i>S. mansoni</i> antes e após o tratamento com praziquantel.	56
Figura 4. Valores observados do coeficiente de Ritis em indivíduos infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i>	58
Figura 5. Avaliação do perfil sérico TSLP de indivíduos infectados pelo <i>S. mansoni</i> antes e após o tratamento com praziquantel.	61

CAPÍTULO 2: Artigo Científico 2: Elevada expressão do receptor CRTH2 e altos níveis da produção da citocina IL-13 por ILC2 de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

Figura 1. Avaliação da frequência de células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) em indivíduos infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i> .	86
Figura 2. Avaliação da frequência das células CD127 e CRTH2 em indivíduos infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i> .	87
Figura 3. Correlação entre a frequência de ILC2 e de células expressando CRTH2+ e a carga parasitária de indivíduos infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i> .	88
Figura 4. Avaliação do perfil Th2 de citocinas produzidas por ILC2 de indivíduos infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i> .	90

Figura 5. Correlação entre a produção de citocinas TH2 por ILC2 de indivíduos com esquistossomose e a carga parasitária. 91

CAPÍTULO 3: Artigo Científico 3: Isolation of Human Group 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2) from peripheral blood by Fluorescence Activated Cell Sorting.

Figure 1. Magnetic selection using EasySep FITC Positive Selection Kit.	112
Figure 2. ILC2 enrichment.	113
Figure 3. Simplified scheme of the methods used for enrichment and sorting of ILC2.	117
Figure 4. Functioning of cell sorting mechanism.	119
Figure 5. Hydrodynamics of sample through the flow cell.	120
Figure 6. Illustration of the work screen at FACSARIA II.	121
Figure 7. Strategy for gates selection and ILC2 sorting.	123
Figure 8. Strategy for doublets reduction by single cell gates.	124
Figure 9. ILC2 frequency in sorting isolated cells.	127
Figure 10. ILC2 isolated by sorting in 96-well plates.	128

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Artigo Científico 1: Tratamento da esquistossomose reduz a produção de TSLP e IL-13 em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* residentes em uma área endêmica.

Tabela 1. Características epidemiológicas e clínicas dos indivíduos com esquistossomose mansônica. 52

Tabela 2. Avaliação de marcadores da função hepática e correlação com a carga parasitária de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*. 59

CAPÍTULO 2: Artigo Científico 2: Elevada expressão do receptor CRTH2 e altos níveis da produção da citocina IL-13 por ILC2 de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

Tabela 1. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos indivíduos com esquistossomose. 83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ESQUISTOSSOMOSE	20
2.2	AGENTE ETIOLÓGICO E ASPECTOS CLÍNICOS DA ESQUISTOSSOMOSE...	22
2.2	RESPOSTA IMUNE NA ESQUISTOSSOMOSE.....	26
2.3	CÉLULAS LINFÓIDES INATAS (ILCs)	30
2.3.1	Introdução às Células Linfóides Inatas (ILCs)	30
2.3.2	A família das células linfóides inatas	32
2.3.3	Células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) e o seu papel na infecção por helmintos.....	35
3	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	39
4	OBJETIVOS	40
5	RESULTADOS	41
5.1	APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO 1	41
5.2	APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO 2	72
5.3	APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO 3	104
6	DISCUSSÃO INTEGRADA	135
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	138
	REFERÊNCIAS	139

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença causada por parasitos do gênero *Schistosoma*. Atualmente, sabe-se que existem cinco espécies capazes de causar infecção no homem: *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, e *S. mekongi*. Acredita-se que esta doença esteja presente em pelo menos 78 países e seja endêmica em 52 destes. Esta doença acomete cerca de 250 milhões de pessoas no mundo e é responsável pela perda de 70 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (DALY). Notadamente, a esquistossomose é reconhecida como uma doença tropical negligenciada, ficando atrás apenas da malária como a doença parasitária mais socialmente impactante (WHO, 2004; STEINMANN *et al.*, 2006; DALYS e COLLABORATORS, 2017). Dentre os principais fatores relacionados com a esquistossomose, estão a falta de saneamento básico nos locais afetados, ações educativas e falta de maiores investimentos em pesquisas sobre o tema, além de novas opções para o manejo terapêutico da doença (HOPKINS *et al.*, 2008). Apesar da extensa dimensão territorial do Brasil, a esquistossomose pode ser observada em quase todo o seu território (19 estados), nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Além da ampla distribuição no país, ainda é possível encontrar regiões com elevada prevalência da doença, podendo chegar até cerca de 70% de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em algumas delas (GOMES CASAVECHIA *et al.*, 2018).

O contato do homem com o parasito tem início quando o hospedeiro intermediário, os caramujos do gênero *Biomphalaria*, liberam-no na forma de cercárias em águas de rios e lagos, contaminando-as. Após ter contato com as águas contaminadas, o homem pode vir a se infectar, desenvolvendo a fase aguda da doença. Durante esta fase da esquistossomose, o hospedeiro desenvolve uma resposta imune predominantemente tipo 1, que se volta para a tentativa de eliminação do agente invasor. Com a sua diferenciação em verme adulto, o *Schistosoma mansoni* pode migrar para diversos locais, como o intestino delgado, mas ao chegar na veia porta hepática, o verme realiza o seu processo de reprodução e, posteriormente, inicia a oviposição (KUNTZ, 1955; WALKER, 2011). O processo de oviposição é um dos principais eventos na infecção pelo *Schistosoma*, posto que os ovos liberados podem migrar para o intestino e serem eliminados nas fezes, mas também migram para outros locais, como o fígado, local no qual alojam-se e desencadeiam uma resposta imune prejudicial ao hospedeiro. As interações do *Schistosoma* com o hospedeiro levam a uma série de manifestações clínicas e podem causar doença aguda e crônica, influenciadas por essa interação parasita-hospedeiro (PEARCE e MACDONALD, 2002; GRYSEELS *et al.*, 2006).

O advento da oviposição, cerca de 6 semanas após a infecção, faz com que o sistema imune do hospedeiro seja exposto à diversos antígenos presentes na estrutura desses ovos, o que irá promover uma mudança no perfil da resposta imune para o polo Th2 (MONTENEGRO *et al.*, 1999; PEARCE, 2005). Enquanto na fase aguda observa-se a produção de citocinas pró-inflamatórias; como TNF, IL-1 e IL-6; a resposta imune do tipo 2, evidenciada na fase crônica, é marcada pela produção de moléculas inflamatórias características deste perfil e sucessivas tentativas de resolução do granuloma, que em um contexto de doença crônica, contribuem muito mais para os danos observados do que para a proteção. Um dos principais processos estudados é a participação da citocina IL-13 e a sua relação com os processos fibróticos, sendo apontada como uma das principais envolvidas na fibrose hepática (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; LA FLAMME *et al.*, 2001; HOFFMANN *et al.*, 2002; PATTON *et al.*, 2002; CHIARAMONTE *et al.*, 2003; WYNN, 2003).

Inicialmente, acreditava-se que as células T CD4⁺ seriam únicas responsáveis pela produção destas citocinas do tipo 2, e que estas seriam as maiores promotoras dessa resposta durante a fase crônica da esquistossomose. No entanto, os últimos anos têm sido marcados por novas hipóteses e questionamentos sobre a participação de outros personagens, com muitos deles já tendo o seu papel esclarecido em algumas doenças. De modo interessante, as recém descobertas células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2), mostraram ter um papel crucial em diversas situações que também cursam com uma resposta imune do tipo 2. Estes estudos têm sugerido que as ILC2 são as principais fontes destas citocinas, a exemplo do que se observa nas doenças alérgicas (ZHAO *et al.*, 2003; MORO *et al.*, 2010; NEILL *et al.*, 2010; PRICE *et al.*, 2010; TURNER *et al.*, 2013; MOHAPATRA *et al.*, 2016). Adicionalmente, estudos recentes também têm enfatizado a função primordial exercida pelas ILC2 em algumas helmintíases, como nas infecções pelos helmintos *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heligmosomoides polygyrus bakeri*, *Strongyloides venezuelensis* e *Litomosoides sigmodontis* (FALLON *et al.*, 2006; NEILL *et al.*, 2010; YASUDA *et al.*, 2012; HUNG *et al.*, 2013; MCHEDLIDZE *et al.*, 2013; TURNER *et al.*, 2013; WOJNO *et al.*, 2015; GERBE *et al.*, 2016; HOWITT *et al.*, 2016; RITTER *et al.*, 2017)

As ILC2 são células que não possuem receptores específicos de antígenos, não apresentam marcadores de linhagem celular (Lin⁻) e podem ser fenotipicamente caracterizadas pela expressão das moléculas de superfície CD127 e CRTH2 (MJOSBERG *et al.*, 2011). Atualmente, acredita-se que estas células possam ser as primeiras e maiores fontes das citocinas do tipo 2; principalmente IL-4, IL-5 e IL-13; em doenças que cursam com esse perfil de resposta imune. Estas células são consideradas vigilantes dos tecidos e podem ser estimuladas a

liberarem as citocinas do tipo 2 sempre que algum processo provocar lesão às células epiteliais, situação na qual há a liberação de um grupo de citocinas capazes de estimular as ILC2, conhecidas como alarminas (IL-25, IL-33 e TSLP) (FORT *et al.*, 2001; MORO *et al.*, 2010; NEILL *et al.*, 2010; PRICE *et al.*, 2010). Em relação á esquistossomose, os poucos estudos realizados ainda possuem um foco nos modelos experimentais. Contudo, estes trabalhos relacionam as ILC2 com a marcante produção de citocinas do tipo 2, como IL-13, e fibrose hepática nos animais infectados (HAMS *et al.*, 2013; MCHEDLIDZE *et al.*, 2013). Apesar das relações entre ILC2 e fibrose terem sido demonstradas em modelos experimentais, o papel destas células na esquistossomose humana ainda não foi esclarecido. Assim, esse estudo teve como objetivo caracterizar o fenótipo e perfil de citocinas de células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2) circulantes em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença causada por parasitos trematódeos sanguíneos de diferentes espécies do gênero *Schistosoma*. Atualmente, cinco espécies do *Schistosoma* causam infecção no homem: *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, e *S. mekongi*. A doença está presente em pelo menos 78 países nas regiões tropicais da África, Ásia, e América do Sul. Contudo, estas espécies se distribuem de maneira bastante heterogênea. Apresentando uma distribuição mundial ampla, o *S. haematobium*, *S. mansoni*, e *S. intercalatum* são principalmente encontrados na África subsaariana. Adicionalmente, o *S. mansoni* também pode ser encontrado no Brasil, Venezuela, e alguns países da região caribenha. O *S. japonicum* foi praticamente eliminado do Japão, mas ainda pode ser encontrado em alguns países como na China, Indonésia, e nas Filipinas. Por outro lado, o *S. mekongi* é mais frequente no sudeste asiático (WHO, 2016; 2019).

No ano de 2017, estimava-se que aproximadamente 250 milhões de pessoas necessitassem de tratamento preventivo para a doença. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o tratamento preventivo, que deve ser repetido diversas vezes ao longo dos anos em áreas endêmicas, permite reduzir a ocorrência de morbidade. Este, inclusive, é um dos fatores que fazem com que a doença seja endêmica em somente 52 dos 78 países em que se faz presente (WHO, 2019).

A esquistossomose humana é uma doença que está intrinsecamente relacionada com as condições sociais e estruturais oferecidas à população, sobretudo algumas condições básicas, mas que ainda não estão presentes em muitos locais, como o saneamento básico (HOPKINS *et al.*, 2008). Oportunamente, estes fatores fizeram com que a esquistossomose fosse incluída entre as principais doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (WHO, 2004). Nesse cenário mundial, a esquistossomose fica atrás apenas da malária como a doença parasitária mais socioeconomicamente impactante. Como em muitos desses países mencionados ainda não foi possível alcançar uma melhora significativa, a OMS estipula que 800 milhões de pessoas estejam vivendo em áreas de risco de infecção pelo *Schistosoma*, com 70 milhões de anos de vida ajustados por incapacidade (*disability-adjusted life-years* - DALY) – 1 DALY representa 1 ano de vida saudável perdido (STEINMANN *et al.*, 2006; DALYS e COLLABORATORS, 2017).

A despeito de o Brasil ser um país com dimensões territoriais consideráveis, a esquistossomose pode ser observada em quase todo o seu território (19 estados), fato que dimensiona a magnitude desse problema de saúde pública neste país. Atualmente, a esquistossomose distribui-se de maneira contínua e contígua por quase toda a costa litorânea da região Nordeste. Durante o seu trajeto por essa região, a doença se estende desde o Rio Grande do Norte em direção à região Sul, passando pelo estado da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, onde acaba alcançando a região de Minas Gerais. Não obstante, a esquistossomose também está presente de maneira mais localizada nos estados do Ceará, Piauí e Maranhão, na região Nordeste; Pará, ao Norte; Goiás e Distrito Federal, no Centro-Oeste; Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro, no Sudeste; Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, na Região Sul (BRASIL, 2010; SAÚDE, 2014).

O Brasil, além de apresentar ampla distribuição da doença, também revela a sua preocupante situação ao ter registros de regiões com até 73,1% de prevalência de infecção pelo *Schistosoma* (GOMES CASAVECHIA et al., 2018). Contudo, desde o século passado essa doença chama atenção no país. Em 1975, foi implementado um programa nacional de controle da esquistossomose que envolvia: 1) melhoria das condições sanitárias, incluindo suprimento de água e a construção de fossas sépticas; 2) educação sanitária para reduzir o comportamento de risco; 3) detecção de casos para o tratamento em larga escala; e 4) controle dos caramujos de acordo com as suas características epidemiológicas e ecológicas (MACHADO, 1982). Anos após a implementação destas medidas, algumas melhorias foram alcançadas, como redução no número de hospitalizações, mortalidade e o aumento da idade média de morte associada à esquistossomose (AMARAL et al., 2006). Embora essas medidas tenham contribuído para uma mudança no quadro epidemiológico da doença no país, a esquistossomose ainda é considerada uma DTN. Ademais, parte da população, 48%, ainda não possui rede de esgotamento sanitário, segundo dados recentes do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS) (BRASIL, 2017).

Por se tratar de uma doença que incide, principalmente, sobre os países mais pobres, a erradicação da esquistossomose ainda é um desafio a ser enfrentado. As DTNs recebem esse nome por serem doenças consideradas endêmicas em populações de baixa renda, apresentarem indicadores inaceitáveis, investimentos reduzidos em pesquisa, produção de medicamentos e em seu controle. Apesar de serem responsáveis por 12% da carga global de doenças, apenas 1,1% dos novos medicamentos registrados entre 1975 e 1999 (25 anos), foram desenvolvidos para essas doenças (TROUILLER et al., 2002). A despeito de a OMS defender que o controle massivo da esquistossomose deve ser feito através de uma dose de praziquantel, essa estratégia

não é totalmente eficaz, porque estes medicamentos ainda não chegam aos que mais precisam deles. Aliás, dados recentes mostram que esse programa de administração de medicamentos em massa (MDA) apresenta apenas 20,74% de cobertura global, realidade que torna inacessível uma redução ou eliminação da doença (OLVEDA *et al.*, 2016).

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO E ASPECTOS CLÍNICOS DA ESQUISTOSSOMOSE

A relação entre o *Schistosoma* e o homem data de muitos anos. Existem evidências de que há pelo menos 5.000 anos este parasito esteja afetando a saúde do homem. Algumas descobertas arqueológicas já indicaram relatos de características e sintomas referentes à esquistossomose em papiros egípcios e algumas análises revelam indícios imunológicos da sua presença em múmias antigas (DEELDER *et al.*, 1990).

Entretanto, pode-se dizer que a sua descoberta, que inclusive deu início à uma nova era na parasitologia tropical, se deu em 1851, quando o físico e patologista alemão Theodor Bilharz documentou a presença de um parasito em lesões que apareciam na mucosa da bexiga, uretra, e intestino, após um procedimento de necrópsia (ELTAWIL, 2011). No Brasil, a esquistossomose foi descoberta em 1908, quando o médico Pirajá da Silva identificou e descreveu o *Schistosoma mansoni* ao estudar diversos casos característicos da doença (KATZ, 2008). Provavelmente, esses parasitos tenham sido introduzidos no Brasil pelo tráfico de escravos africanos e ao chegarem em terras brasileiras tenham encontrado os seus hospedeiros vertebrados (*Homo sapiens sapiens*) e invertebrados (moluscos do gênero *Biomphalaria*) e um ambiente propício para o seu desenvolvimento.

Após diversos anos de pesquisas sobre o parasito, foi possível conhecer todo o seu ciclo de vida e interação com os seus hospedeiros. Atualmente, sabe-se que o ciclo de vida do *S. mansoni* ocorre em dois hospedeiros: caramujos (invertebrado) e mamíferos (humanos, camundongos e cão). O *Schistosoma* tem a capacidade de se reproduzir tanto de maneira sexuada, quando estão parasitando mamíferos; quanto assexuada, quando parasitam caramujos (MOUAHID *et al.*, 2018; VIANA *et al.*, 2018). Nestes, a reprodução tem início após a transformação de mirácídios em esporocistos. Estes esporocistos podem ainda dar origem a mais esporocistos ou, finalmente, se diferenciarem em cercárias (MOUAHID *et al.*, 2018). Apesar de o processo de reprodução ser do tipo assexuada, os caramujos podem lançar centenas de cercárias diariamente, como *S. mansoni* - que consegue gerar de 250 a 600 cercárias/dia (BRAUN *et al.*, 2018).

As cercárias são atraídas, principalmente, pela presença da luz e liberadas na água, onde aguardam o contato com os seus hospedeiros definitivos. A infecção do homem pelo *Schistosoma* ocorre quando a cercária liberada penetra na pele durante o contato com água contaminada. Uma vez no hospedeiro definitivo, as cercárias evoluem para esquistossômulos e migram para diversos tecidos do corpo através da circulação sanguínea (ROSS *et al.*, 2002). Os esquistossômulos amadurecem e se transformam em vermes adultos, que podem migrar para diferentes locais, a depender da sua espécie. O *S. haematobium*, por exemplo, pode habitar a bexiga e uretra, mas também pode ser encontrado em vênulas retais. Por outro lado, O *S. japonicum* é mais frequente no intestino delgado. Finalmente, o *S. mansoni* também pode ser encontrado no intestino delgado, mas podem se transferir para outros locais (KUNTZ, 1955; WALKER, 2011). Contudo, após migrarem para a região da veia porta hepática e se transformarem em vermes adultos, o *S. mansoni* inicia o processo de oviposição. Estes ovos liberados, migram para o intestino e passam a ser eliminados nas fezes, mas também atingem outros locais, como o fígado, local no qual se alojam e desencadeiam uma resposta imune prejudicial ao hospedeiro. As interações do *Schistosoma* com o hospedeiro levam a uma série de manifestações clínicas e podem causar doença aguda e crônica, influenciadas por essa interação parasita-hospedeiro (Figura 1) (PEARCE e MACDONALD, 2002; GRYSEELS *et al.*, 2006).

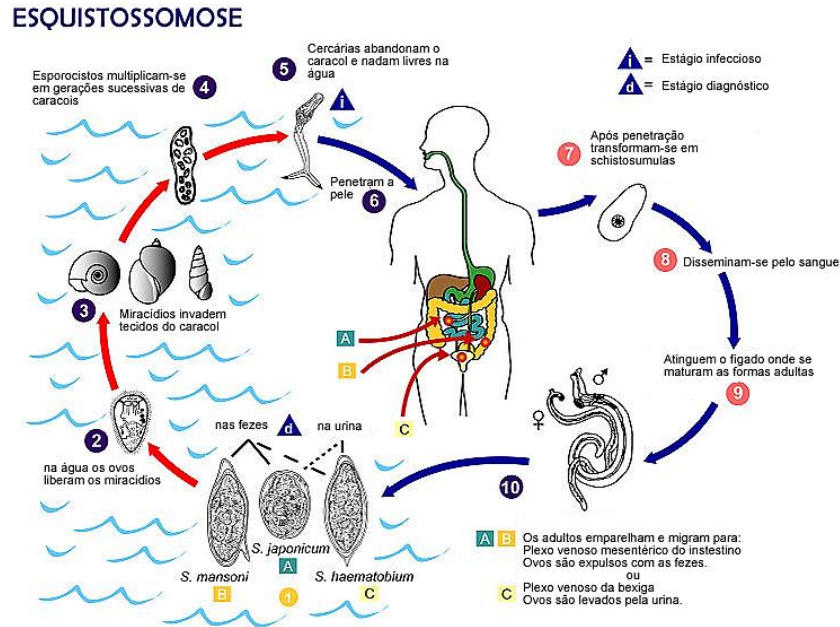


Figura 1. Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni* (Fonte: Centro de Controle de Doenças [CDC], 2017).

Do ponto de vista clínico, uma das primeiras manifestações do contato com as cercárias é a formação de uma erupção maculopapular no local da sua penetração. Os indivíduos que acabaram de ter contato com as cercárias podem apresentar reações na pele dentro de horas, mas também podem aparecer até uma semana depois (WARREN, 1978).

Em geral, após um relato de contato com água contaminada dentro de 3 a 6 semanas, podem ocorrer algumas manifestações agudas, como a febre (febre de Katayama). O início da febre é bastante associado ao advento da oviposição em diversos tecidos, estágio em que também ocorre a formação de imunocomplexos. Contudo, a febre de Katayama é raramente observada em populações expostas cronicamente ao *Schistosoma*, sendo mais comum em viajantes, turistas ou pessoas acidentalmente expostas (KING *et al.*, 1998). Além da febre, outros eventos também podem ser observados durante esta fase, como anorexia, prostração, diarreia com sangue, hepatoesplenomegalia e eosinofilia (ROSS *et al.*, 2002; LEWIS e TUCKER, 2014).

As principais complicações na fase crônica da infecção dão-se, não apenas pelo verme adulto, mas devido aos ovos que foram depositados e que agora estão presos aos tecidos. Estes ovos podem sofrer migração perivesical ou peri-intestinal ou ainda sofrer embolização para o fígado, baço, pulmões, ou sistema cérebro-espinhal. Após serem depositados nestes locais, os ovos geram uma reação inflamatória eosinofílica e granulomatosa, que é progressivamente

substituída por depósitos fibróticos (CHEEVER *et al.*, 2000). Entretanto, alguns estudos mostram que a severidade dos sintomas e gravidade da doença dependerão da genética do hospedeiro e do parasito, grau e tempo de exposição, intensidade da infecção, intensidade intrauterina aos antígenos do *Schistosoma* e a presença de coinfeções (NOVATO-SILVA *et al.*, 1992; CHEVILLARD *et al.*, 2003; BOOTH *et al.*, 2004; KABATEREINE *et al.*, 2004; KAMAL *et al.*, 2004; KING *et al.*, 2004).

A forma mais grave da esquistossomose é a que cursa com um envolvimento hepatoesplênico com risco de vida. Esta forma da doença apresenta fibrose hepática e periportal graves, hipertensão portal e desvio portossistêmico de sangue venoso (PEREIRA *et al.*, 1997; HATZ, 2001). A forma hepatoesplênica pode ainda ser classificada em quatro estágios: precoce, moderado, tardio e terminal. Durante esta fase da doença podem ocorrer algumas complicações, como ascite e varizes de esôfago com risco evidente de sangramento e falência hepática. Adicionalmente, destaca-se que pelo fato de ser uma doença que possui uma natureza fundamentalmente mesenquimal, as agressões aos tecidos podem ocasionar a alteração de parâmetros bioquímicos, como a hipoalbuminemia, que decorrem de fatores como a hemodiluição, má nutrição e diminuição da reserva hepática para a síntese de albumina. Contudo, a extensão do acometimento hepático também pode ser avaliada indiretamente por meio de enzimas hepáticas como TGO e TGP, também chamadas de AST e ALT: AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase). Adicionalmente, γ GT (gama glutamil transpeptidase ou GGT) e fosfatase alcalina (ALP). As primeiras, TGO e TGP, geralmente apresentam moderada elevação em relação aos limites de referência, enquanto γ GT e ALP apresentam-se mais elevadas, a depender do nível de atividade e estágio da doença (ANDRADE, 1965; BARRETO, 1971).

Apesar de haver uma certa discussão sobre a real influência que a carga de ovos possui na determinação da forma hepatoesplênica, alguns estudos têm encontrado uma menor frequência desta forma em regiões onde os pacientes apresentam menores cargas parasitárias (PEREIRA *et al.*, 2010). Além disso, alguns estudos clássicos associam a intensidade da infecção com esta forma hepatoesplênica (CHEEVER *et al.*, 1965; FAROOQ *et al.*, 1966; KLOETZEL, 1967; CHEEVER, 1969).

2.2 RESPOSTA IMUNE NA ESQUISTOSSOMOSE

A resposta imune observada nas fases clínicas ou manifestações da esquistossomose possui forte relação com os estágios de desenvolvimento do parasito no hospedeiro. Todos esses estágios expõem diversas porções antigênicas que estimulam respostas celular e humoral. Por isso, a natureza da resposta imune na fase aguda distingue-se da observada na fase crônica da doença, possibilitando um melhor entendimento dos processos relacionados com a sua patogênese (VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2004; LIU *et al.*, 2006; HOKKE *et al.*, 2007).

Nos momentos iniciais, após a penetração do parasito pela epiderme e derme do hospedeiro, ocorre o predomínio da resposta imune inata. Nesse momento, há uma reação de hipersensibilidade do tipo imediata, seguida de eventos que organizam um infiltrado de polimorfonucleares, mononucleares e células de Langerhans, além da produção local de quimiocinas (CCL3/MIP-1 α) e citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-12p40, IL-10) (HOGG *et al.*, 2003). Contudo, ainda na primeira semana, inicia-se um influxo de linfócitos T CD4⁺ e produção das citocinas IL-12p40, IFN- γ e IL-4, apesar de sua produção decair na segunda semana de infecção (HOGG *et al.*, 2003; KOURILOVA *et al.*, 2004).

À medida que o *Schistosoma* dá sequência ao seu ciclo, a resposta do hospedeiro também o acompanha, o que reforça a complexidade da resposta imune na esquistossomose. Acredita-se que a fase aguda tenha início após o esquistossômulo se diferenciar em verme adulto. Contudo, esta fase aguda subdivide-se em dois momentos: pré-patente (antes da oviposição) e pós-patente (após a oviposição). A fase pré-patente caracteriza-se por um predomínio da resposta do tipo 1, com a produção das citocinas TNF, IL-1 e IL-6 por células mononucleares (DE JESUS *et al.*, 2002). Entretanto, com o início da oviposição, a fase pré-patente dá lugar à uma resposta imune que se caracteriza pela presença de citocinas do tipo 2, que contribuem para a regulação dessa resposta pró-inflamatória, como a IL-10 que exerce um papel fundamental nesse processo (MONTENEGRO *et al.*, 1999; PEARCE, 2005).

A despeito de nos estágios iniciais de infecção haver uma predominância de uma resposta imune do tipo 1, direcionada contra antígenos do parasito, a oviposição, que se inicia cerca de 6 semanas após a infecção, é responsável pela drástica mudança da resposta imune para uma resposta do tipo 2, na tentativa de controlar os ovos do parasito. Sobre isso, acredita-se que a interação de células dendríticas com antígenos específicos do ovo do *Schistosoma* seja responsável por essa mudança imunológica (Figura 2) (EVERTS *et al.*, 2012).

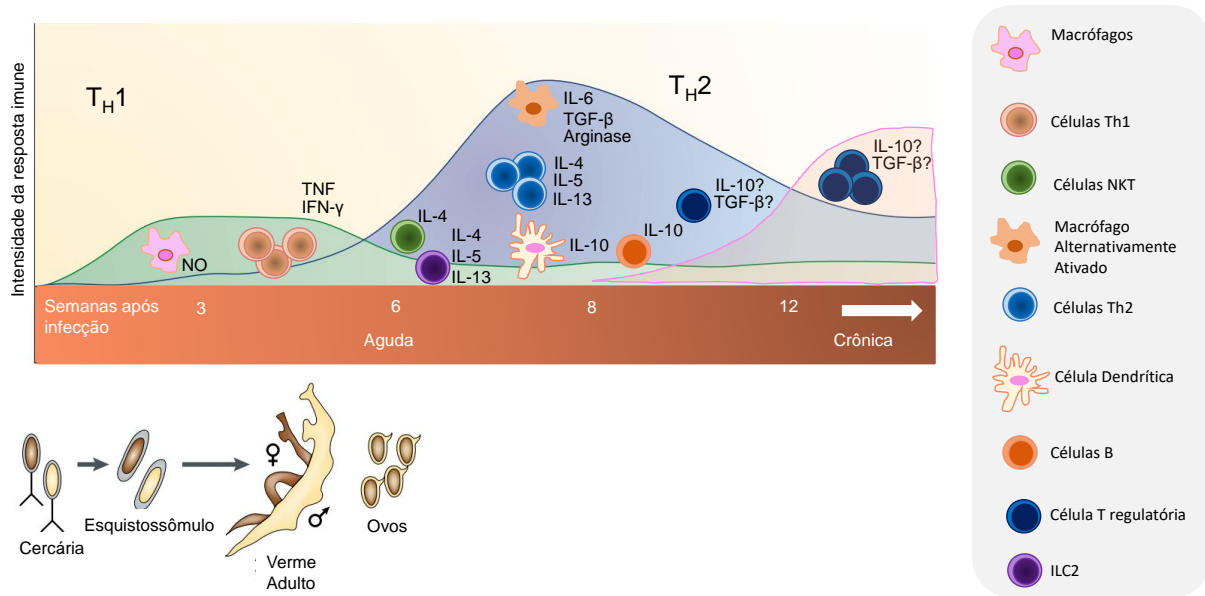


Figura 2. Resposta imune na esquistossomose.

Figura adaptada (DUNNE e COOKE (2005); PEARCE e MACDONALD (2002)).

Apesar de haver um consenso na literatura de que a oviposição, e, conseqüente, exposição de antígenos dos ovos do *Schistosoma*, determina o início de uma resposta imune do tipo 2, existem alguns estudos que destacam um importante papel desta resposta desde a fase aguda. Em um estudo realizado por RINER *et al.* (2013) foi observado que uma resposta imune do tipo 2, mediada por células T CD4⁺ de hospedeiros imunocompetentes durante a fase pré-patente, pode ser um mecanismo utilizado pelo *Schistosoma* para completar a sua diferenciação em verme adulto. Esses dados sugerem que a resposta imune do tipo 2 começa a ter um papel antes mesmo da oviposição. Além disso, o início desta resposta imune no estágio anterior ao desenvolvimento do verme adulto parece ser uma estratégia do parasita para evadir da resposta imune do tipo 1 e dar seqüência ao seu ciclo. Em um trabalho realizado por EGESA *et al.* (2018) observou-se que os antígenos do esquistossômulo desencadeiam uma resposta imune do tipo 1, que é muito eficiente contra o parasita, todavia, antígenos do verme adulto e do ovo do *Schistosoma* induzem, principalmente, uma resposta imune do tipo 2. Esses dados podem ser um indício de que uma resposta imune do tipo 2 é importante para o desenvolvimento do parasita (PEARCE *et al.*, 1991; EGESA *et al.*, 2018).

Embora muitos estudos evidenciem que a resposta imune do tipo 2 é a que mais está associada à uma maior sobrevida do hospedeiro, com formação de granuloma e produção de anticorpos contra os antígenos do ovo do *S. mansoni*, esta resposta provavelmente está mais associada aos potenciais danos ao tecido (LA FLAMME *et al.*, 2001; PATTON *et al.*, 2002).

Os indivíduos infectados residentes em áreas endêmicas apresentam alta produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 por células mononucleares do sangue periférico. Esses efeitos deletérios se dão pois, a longo prazo, esse perfil de resposta imune induz a sucessivas formações e resoluções de granulomas em uma tentativa de controlar o parasito. Nesse contexto, a citocina IL-13 possui uma grande relação com os processos fibróticos, sendo uma das principais envolvidas na fibrose hepática (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; HOFFMANN *et al.*, 2002; CHIARAMONTE *et al.*, 2003; WYNN, 2003).

Adicionalmente, o papel da citocina IL-13 nestes mecanismos pôde ser demonstrado em modelos experimentais tanto na ausência da citocina, quanto através do bloqueio dos seus receptores (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; JANKOVIC, KULLBERG, *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000). Além disso, outros estudos que corroboram esta hipótese já documentaram os mecanismos pelos quais IL-13 atua na fibrogênese (MODOLELL *et al.*, 1995; HESSE *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2001). Sobre isso, a participação desta citocina na proliferação de fibroblastos e produção de colágeno já foi documentada (DOUCET *et al.*, 1998; CHIARAMONTE *et al.*, 1999; ORIENTE *et al.*, 2000), além de também possuir um papel na produção ativa de TGF β ₁ in vivo (LEE *et al.*, 2001).

Além disso, esses processos fibróticos, induzidos pela resposta imune do tipo 2, também contam com a participação de células acessórias, como eosinófilos e macrófagos alternativamente ativados, induzidos por IL-4 e IL-13 (PEARCE e MACDONALD, 2002; FAIRFAX, K. *et al.*, 2012). Não obstante, os macrófagos também foram documentados como uma importante fonte de IL-13, favorecendo a fibrose (LI *et al.*, 2014). Neste contexto, estas células podem ainda participar desses fenômenos por serem capazes de promover a síntese de colágeno e a fibrogênese via metabolismo de L-arginina para prolina e poliamina por Arginase-1 (SONG *et al.*, 2000; HESSE *et al.*, 2001; PESCE *et al.*, 2006; WILSON *et al.*, 2007).

No que diz respeito à participação da resposta imune na proteção contra a infecção, existem muitos estudos em modelos experimentais ou envolvendo a infecção em humanos que discutem sobre a participação das respostas imunes dos tipos 1 e 2. Alguns desses modelos demonstraram que a proteção ao *S. mansoni* está relacionada à participação da imunidade humoral e também mediada por células T (JANKOVIC, WYNN, *et al.*, 1999). Nesses modelos, a produção da citocina IFN- γ está bastante associada com a proteção parcial à exposição por cercárias atenuadas do parasito (KELLY e COLLEY, 1988). Outros estudos enfatizam o papel da citocina IL-10 como importante para que se desenvolva susceptibilidade à infecção por *S. mansoni* (WILSON *et al.*, 2011). Além disso, muitos modelos de vacinas também têm sido

discutidos e testados em modelo de infecção experimental por *S. mansoni* (TENDLER e SIMPSON, 2008; RIVEAU *et al.*, 2012).

De maneira controversa, outros estudos apontam para um papel protetor contra a infecção desempenhado pela resposta imune do tipo 2, através da produção de IL-4 (LA FLAMME *et al.*, 2001; PATTON *et al.*, 2002). Ainda sobre essa perspectiva, ao contrário do que se observa nos modelos experimentais, que relacionam a resistência à infecção com a resposta Th1, a resposta imune em humanos que se encontra mais associada com a proteção contra reinfecção é a resposta Th2 (HAGAN *et al.*, 1991; RIHET *et al.*, 1991; DUNNE *et al.*, 1992; DEMEURE *et al.*, 1993; SATTI *et al.*, 1996; ZHANG *et al.*, 1997; JIZ *et al.*, 2009).

Outra importante citocina envolvida com a proteção contra a patogênese da esquistossomose é a citocina IL-10. Esta citocina possui funções regulatórias, como o que se observa na sua atuação na resposta mediada por células Th2. Alguns estudos experimentais demonstram que a sua ausência está associada com uma resposta imune do tipo 2 exacerbada e uma emergente resposta Th1 e Th17 na fase aguda da infecção pelo *Schistosoma* (WYNN *et al.*, 1998; HOFFMANN *et al.*, 2000; MCKEE e PEARCE, 2004; HERBERT *et al.*, 2008). Entretanto, o papel da IL-10 na imunomodulação da resposta imune do tipo 2 tem sido discutido, uma vez que animais deficientes de 10 (IL-10 $-/-$) conseguem modular a resposta imune mesmo na ausência dessa citocina, sugerindo que podem haver outras moléculas associadas à regulação da resposta imune na esquistossomose, como CTLA-4, TGF- β e Foxp3 (BOSSHARDT *et al.*, 1997; WYNN *et al.*, 1998; SADLER *et al.*, 2003; FAIRFAX, K. C. *et al.*, 2012).

Apesar das controvérsias na literatura envolvendo os papéis benéficos e deletérios das respostas do tipo 1 e do tipo 2 desempenhadas na esquistossomose, e das discussões sobre a validade em humanos das conclusões obtidas em modelos experimentais, as citocinas do tipo 2 parecem estar primariamente envolvidas na fibrose e na patologia no curso da doença (CHEEVER *et al.*, 1994; REIMAN *et al.*, 2006). Isso pôde ser observado em um estudo realizado pelo grupo de WYNN *et al.* (1995), no qual a sensibilização com ovos do *Schistosoma* e IL-12 (potente indutor da resposta do tipo 1) resultou em inibição parcial da formação de granuloma e redução da fibrose tecidual induzida pelo *S. mansoni*. Estas evidências fortalecem as hipóteses de que uma resposta imune do tipo 2 crônica contribui para a maior parte dos danos observados na doença.

Mais recentemente, foi demonstrada a participação de células da resposta imune inata na defesa contra infecção por helmintos. As células NK e NKT, por exemplo, estão ativadas e presentes em frequência elevada em linfonodos de animais infectados experimentalmente, além

de expressar níveis elevados de IL-4 e IL-17 (LUO *et al.*, 2014). Adicionalmente, células dendríticas sensibilizadas com ovo do *Schistosoma* são capazes de induzir ativação das células NKT via molécula CD1d (MALLEVAEY *et al.*, 2006). Finalmente, as células linfóides inatas, grupo de células descrito recentemente, também tem sido associado à defesa contra helmintos (BOYD *et al.*, 2014; HALIM *et al.*, 2014; HAZENBERG e SPITS, 2014). Entretanto, apesar de ser atribuída uma importância destas células na defesa contra infecções por helmintos, ainda não é conhecido o papel delas na esquistossomose mansônica humana.

2.3 CÉLULAS LINFÓIDES INATAS (ILCS)

2.3.1 Introdução às Células Linfóides Inatas (ILCs)

O sistema imune, como conhecemos, pode ser dividido, de maneira geral, em dois compartimentos: os sistemas de imunidade inata e adquirida. Este sistema altamente complexo tem várias funções, dentre as quais pode-se mencionar, a manutenção da homeostasia e proteção contra patógenos, substâncias estranhas, células nativas atípicas, além de outras participações ainda não totalmente elucidadas ou desconhecidas.

Assim, a resposta imune inata atua como uma proteção inicial e menos específica, mas bastante eficiente contra invasores. Esse sistema inato de proteção conta com um conjunto bastante elaborado de compartimentos, incluindo barreiras e muitos outros mecanismos. Por outro lado, os vertebrados também desenvolveram um sofisticado sistema, que gera uma “memória imunológica” contra microrganismos patogênicos e substâncias potencialmente perigosas, denominado imunidade adaptativa. Ao contrário da imunidade inata, a resposta imune adaptativa é altamente específica contra certos antígenos e geram respostas imunes mais fortes do que a resposta imune inata. O estudo desta resposta imune adaptativa se intensificou quando Mosmann *et al.* (1986-1989) descreveram pela primeira vez a evidência de grupos de linfócitos que produziam divergentes proteínas e esses perfis ajudaram a entender as diferentes funções desempenhadas por eles (MOSMANN *et al.*, 1986; MOSMANN e COFFMAN, 1989). Nas recentes descobertas, os imunologistas têm publicado uma série de trabalhos que contribuem para discussões sobre esses paradigmas envolvendo as divisões clássicas do sistema imune. No âmbito dessas discussões, as descobertas de linfócitos que participam como células inatas na resposta imune, ajudaram a fomentar parte desses debates e impulsionam mais descobertas nesse campo.

O primeiro “protótipo” de célula linfóide inata foram as células NK, caracterizadas pela ausência de expressão de receptores de células T (TCR), mas também pela presença de outros marcadores de superfície que também são expressos por células T, células T $\gamma\delta$ (gamma delta) e células NKTi (VIVIER *et al.*, 2011; BEZMAN *et al.*, 2012). Além disso, novas classificações para os linfócitos têm sido sugeridas à medida que novos estudos revelam outras funções ou ainda novos grupos de células com novas características (CERNY e STRIZ, 2019). A partir de recentes descobertas, os pesquisadores puderam descrever o surgimento de um grupo ainda não apreciado de linfócitos, hoje conhecidos como células linfóides inatas (ILCs). Estas células espelham os perfis das células Th1, Th2 e Th17. As ILCs possuem uma divisão canônica em três grupos (ILC1, ILC2 e ILC3), divisão que se baseia no perfil de citocinas produzidas por elas, além de fatores de transcrição que regulam o seu desenvolvimento e as suas funções (SPITS *et al.*, 2013). Ressalta-se que foi somente em 2013, muito recentemente, que esta classificação foi proposta por Spits. Mesmo assim, inúmeros estudos têm sido realizados para um melhor entendimento de como as ILCs participam no contexto de diversas respostas como à patógenos intracelulares, helmintos, bactérias extracelulares e leveduras, respectivamente em semelhança ao que se observa em relação aos seus equivalentes de células T (Figura 3) (POWELL *et al.*, 2012; KLOSE *et al.*, 2013; GEIGER *et al.*, 2014; ABT *et al.*, 2015; HUANG *et al.*, 2015; OESER *et al.*, 2015).

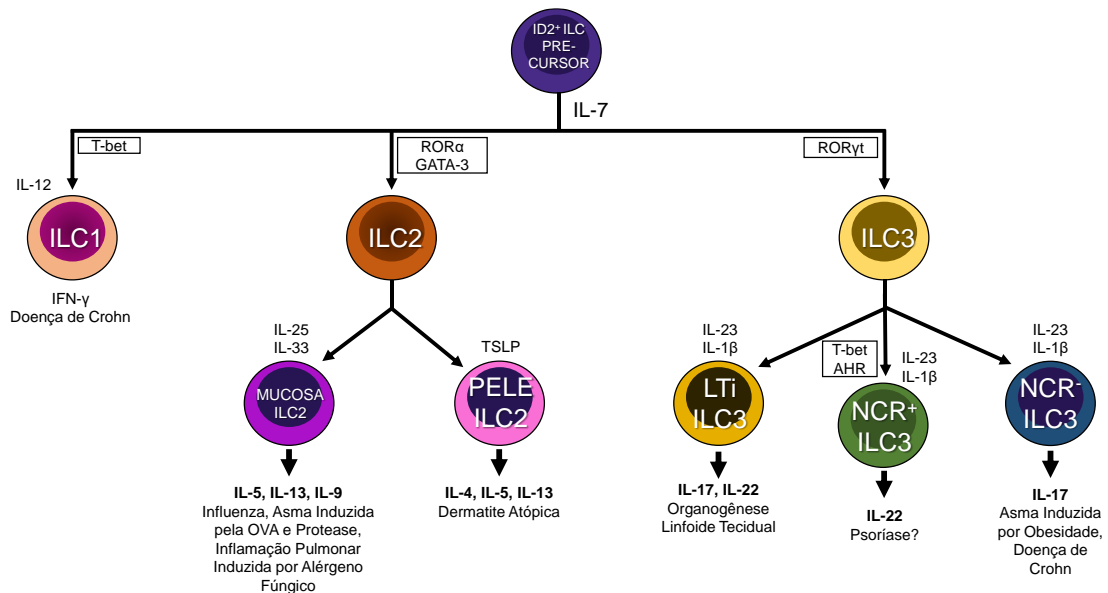


Figura 3. A família das células linfóides inatas (ILCs).

Figura adaptada (YU *et al.* (2014)).

2.3.2 A família das células linfóides inatas

A família das células linfóides inatas tem menos de 10 anos de estudos, entretanto, muitos estudos recentes têm tentado caracterizá-las e diferenciá-las de outros grupos celulares. Contudo, o mais surpreendente sobre estas células parece ser o seu papel como vigilante em muitos tecidos. As ILCs localizam-se principalmente nas superfícies epiteliais, local estratégico que permite que elas participem ativamente da manutenção da homeostase tecidual. A sua localização privilegiada permite ainda que possam responder prontamente à patógenos invasores auxiliando em respostas imunes direcionadas contra eles (KIM *et al.*, 2016; YUDANIN *et al.*, 2019). Apesar de estarem dispostas em vários órgãos, as ILCs apresentam maior frequência em locais onde existe uma maior exposição ao ambiente, podendo também ser recrutadas para outros locais (SAWA *et al.*, 2010; MJOSBERG *et al.*, 2011; SPENCER *et al.*, 2014; YUDANIN *et al.*, 2019). As células linfóides inatas apresentam duas características fundamentais, a primeira delas é a ausência de marcadores de linhagem celular (CD3, CD19, CD56, CD68 e CD205), o que possibilita designá-las como células linhagem negativas (Lin^-). A outra característica, refere-se a ausência de qualquer receptor antígeno-específico para o reconhecimento de patógenos (SPITS e DI SANTO, 2011; SPITS *et al.*, 2013).

As ILC1 coexistem com as células NK no timo. Estas células expressam o receptor CD127 (IL-7 $R\alpha$) e GATA3, porém, ao contrário das NK, produzem IFN- γ e o fator estimulador de colônia de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) em níveis mais elevados do que as células

NK. Além disso, estas células dependem da citocina IL-7 e do fator de transcrição GATA3 para a sua diferenciação (VOSSHENRICH *et al.*, 2006). Embora sejam associadas às células NK, as ILC1 não são consideradas citotóxicas ou apresentam fraca citotoxicidade. O seu papel parece estar muito relacionado a uma primeira linha de defesa contra vírus e certas bactérias (KLOSE, C. S. N. *et al.*, 2014; ABT *et al.*, 2015). As ILC1 podem ser ainda divididas em CD127^{low} e CD127^{high} e essas células apresentam diferentes localizações no tecido e distintas funções. As CD127^{low}, que se assemelham às células TCD8⁺ da região intraepitelial devido à expressão de perforina, são células que respondem às citocinas IL-12 e IL-15. Entretanto, as CD127^{high}, que respondem à IL-12 e IL-18, localizam-se na região da lâmina própria, não expressam perforina, e também são capazes de produzir TNF (BERNINK *et al.*, 2013; FUCHS *et al.*, 2013; KLOSE, C. S. *et al.*, 2014).

As ILC3 encontram-se principalmente nas regiões de mucosa e estão envolvidas na resposta imune inata contra bactérias extracelulares e na contenção de bactérias comensais (SATO-TAKAYAMA *et al.*, 2008; CELLA *et al.*, 2009; CUPEDO *et al.*, 2009; LUCI *et al.*, 2009; BUONOCORE *et al.*, 2010; SONNENBERG *et al.*, 2011; SONNENBERG *et al.*, 2012; RANKIN *et al.*, 2016). Estas células também são Lin⁻CD127⁺, mas a sua caracterização fenotípica se dá pela expressão do CD117 e do fator de transcrição ROR γ t (QIU *et al.*, 2012). As ILC3 também são conhecidas pela sua habilidade de produzir IL-22 e IL17-A (TAKATORI *et al.*, 2009). A sua produção de IL-22 tem um papel fundamental na manutenção da homeostase intestinal e promoção da proliferação de células-tronco intestinais (HEPWORTH *et al.*, 2013). Outro fator que determina as características destas células é a expressão do receptor de citotoxicidade (NCR, NKp44 e NKp46 em humanos). Desse modo, as ILC3 também podem ser classificadas em NKp44⁻ e NKp44⁺, ambas capazes de produzir IL-22. Entretanto, as suas principais diferenças decorrem da capacidade das ILC3 de produzir determinadas citocinas. Enquanto as ILC3 NKp44⁻ são hábeis para produzir IL-17, as ILC3 NKp44⁺ respondem a citocina IL-12, diferenciando-se em ILC1 produtora de IFN- γ . Adicionalmente, um outro subtipo de ILC3, que não produz IL-22, mas que produz IL-17, também são conhecidas como células indutoras de tecido linfóide (LTi) (CELLA *et al.*, 2009; CUPEDO *et al.*, 2009; HUGHES *et al.*, 2010; BERNINK *et al.*, 2013; HAZENBERG e SPITS, 2014).

As primeiras evidências das ILC2 começaram de maneira muito difusa em diversos trabalhos que mostravam células inatas capazes de produzir citocinas do tipo 2 de maneira semelhante ao que se observa nas células TCD4⁺. O primeiro indício ocorreu a partir de um modelo experimental que reportou um grupo de células não-T e não-B, que quando estimuladas por IL-25, seriam capazes de produzir elevadas concentrações das citocinas IL-5 e IL-13 (FORT

et al., 2001). Posteriormente, ALLAKHVERDI *et al.* (2009) tiveram a oportunidade de relatar em humanos a presença de uma população celular CD34⁺, expressando IL-33R e TSLPR, e que produzia citocinas do tipo 2 em resposta ao estímulo por IL-33 e TSLP. Impulsionados por estas descobertas, três distintos grupos de pesquisa realizaram trabalhos nos quais as ILC2 foram mais bem descritas, sobretudo em modelos experimentais. Como principais resultados, alguns desses estudos puderam mostrar a maneira com que as ILC2 se distribuem nos tecidos, bem como propuseram uma nova classificação: núócitos (NEILL *et al.*, 2010), células auxiliaadoras naturais (MORO *et al.*, 2010) e células auxiliares inatas do tipo 2 (PRICE *et al.*, 2010). Contudo, essas nomeações contribuíram para que parte das recentes descobertas ficassem difundidas. Pensando nisso, SPITS *et al.* (2013) propôs uma unificação dessas classificações em que foram nomeadas células linfóides inatas (ILCs [ILC1, ILC2 e ILC3]).

O fato de as ILC2 serem as ILCs mais presentes no sangue periférico contribuiu para que elas também fossem as mais estudadas até o momento. Mesmo assim, sabe-se que a sua frequência é bastante reduzida (0,01%-0,03%) (MJOSBERG *et al.*, 2011). Como as ILCs tem características de células residentes teciduais, certamente estas ILCs circulantes podem ser mais bem observadas quando existe uma demanda decorrente de danos teciduais, podendo haver também aumento na sua frequência no sangue periférico (YU *et al.*, 2018). Desse modo, as ILC2 tem sido descritas principalmente em contextos que cursam com processos inflamatórios de doenças alérgicas e na defesa contra helmintos (TURNER *et al.*, 2013; BARTEMES *et al.*, 2014; JACKSON *et al.*, 2014; MCSORLEY *et al.*, 2014; OLIPHANT *et al.*, 2014). Mais recentemente, alguns estudos têm sugerido que as ILC2 também podem ser subdivididas em dois grupos: ILC2 homeostáticas ou naturais (ILC2n) e ILC2 inflamatórias (ILC2i). Sobre estes subtipos, as recentes evidências têm mostrado que as ILC2n residem nas barreiras teciduais e respondem à IL-33, enquanto as ILC2i não são encontradas nos tecidos periféricos em condições homeostáticas, e podem ser estimuladas pela presença de helmintos ou ainda tratamento com IL-25 (MORO *et al.*, 2010; HUANG *et al.*, 2015; HUANG e PAUL, 2016).

2.3.3 Células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) e o seu papel na infecção por helmintos

Para que consigam exercer as suas funções, as ILC2 dependem da liberação de uma tríade de citocinas também conhecidas como alarminas. As alarminas são citocinas produzidas por células epiteliais quando há algum tipo de dano aos tecidos. Nesses momentos, as células danificadas liberam IL-25 (também chamada de IL-17E), IL-33 e/ou a linfopoiétina estromal tímica (TSLP) (MORO *et al.*, 2010; NEILL *et al.*, 2010; MJOSBERG *et al.*, 2011; GENTEK *et al.*, 2013; TANRIVER e DIEFENBACH, 2014). Como mencionado, as ILC2 expressam receptores para estas citocinas e agem respondendo prontamente a esses estímulos. A Figura 4 sumariza os principais receptores e vias relacionadas com a ativação das ILC2.

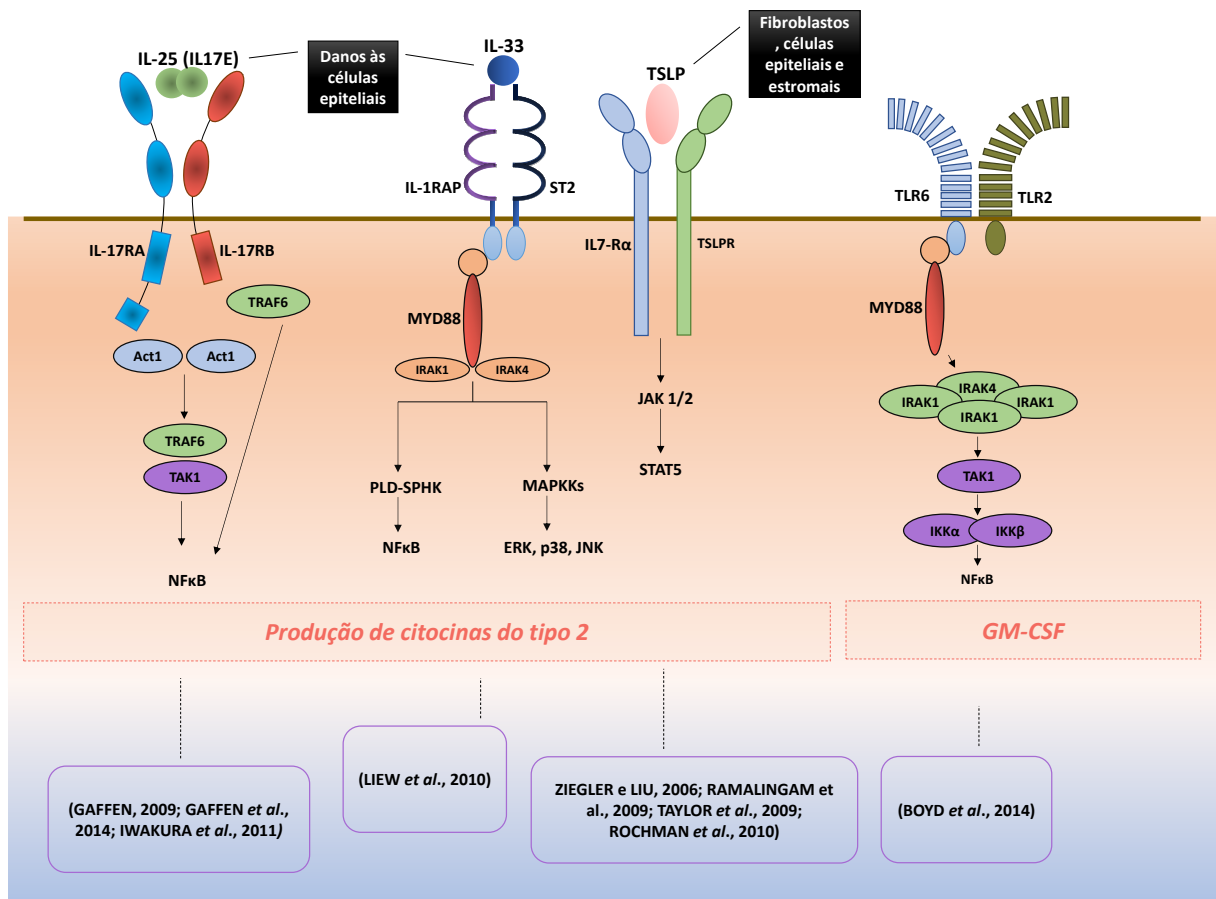


Figura 4. Receptores relacionados com a ativação das ILC2. (ZIEGLER e LIU, 2006; GAFFEN, 2009; RAMALINGAM *et al.*, 2009; TAYLOR *et al.*, 2009; LIEW *et al.*, 2010; ROCHMAN *et al.*, 2010; IWAKURA *et al.*, 2011; BOYD *et al.*, 2014; GAFFEN *et al.*, 2014).

Ao passo que esses mecanismos de ativação foram sendo elucidados, seja por citocinas ou via TLRs, os mecanismos de regulação também receberam atenção nos últimos anos. Nesses mecanismos de regulação, as células dendríticas plasmocitóides (pDCs) exercem um papel fundamental. Em um estudo recente, MAAZI *et al.* (2018) mostraram que a ativação dos TLR-7/8 nas pDCs induzem a liberação de IFN- γ , reduzindo a proliferação, a produção e liberação de citocinas do tipo 2, e aumentando a apoptose em ILC2 na hiper-reatividade das vias aéreas. Em outro modelo experimental realizado por THIO *et al.* (2019) foi observado que o ligante do TLR9, o MIS416, estimula as células NK a produzirem IFN- γ e, conseqüentemente, leva a supressão das ILC2. Apesar de ser um modelo experimental de asma alérgica por *Alternaria alternata*, esses dados foram validados em humanos pelo grupo de pesquisa, sugerindo que ligantes dos receptores toll podem ser utilizados como estratégia terapêutica na asma. Além dos interferons, a citocina IL-27 também possui atividade reguladora sobre as ILC2 (DUERR *et al.*, 2016; MORO *et al.*, 2016). Este mecanismo pôde ser demonstrado tanto na ausência de IL-27, onde as ILC2 passam a se acumular mais no tecido, quanto em experimento *ex vivo*, no qual a adição de IL-27 fez com que as ILC2 diminuíssem a sua produção de IL-5 e IL-13 (MCHEDLIDZE *et al.*, 2016).

Após serem ativadas, as ILC2 produzem citocinas do tipo 2, principalmente IL-5 e IL-13. Contudo, a sua ativação também desencadeia a produção de outras citocinas importantes no contexto de proteção aos danos e combate aos agentes invasores. Ao serem ativadas, as ILC2 também podem secretar IL-4, IL-9, IL-22 e anfiregulina (AREG), molécula importante na reconstrução da integridade da barreira epitelial (MONTICELLI *et al.*, 2011; HALIM *et al.*, 2012; KOYASU e MORO, 2012; HAZENBERG e SPITS, 2014). A citocina IL-9, também produzida por células Th2, tem sido descrita como componente na defesa contra helmintos e na inflamação das vias aéreas (GODFRAIND *et al.*, 1998; TOWNSEND *et al.*, 2000; TEMANN *et al.*, 2002). Além de produzirem IL-9, as ILC2 também expressam o seu receptor em elevada frequência, evidenciando uma função autocrina da mesma (WILHELM *et al.*, 2011; TURNER *et al.*, 2013).

Além de produzirem citocinas do tipo 2 e contribuírem para o início e estabelecimento desta resposta, estudos mostram que as ILC2 também têm capacidade de ativar células T promovendo o início da resposta imune do tipo 2. As ILC2 possuem essa função porque expressam moléculas de MHC II. OLIPHANT *et al.* (2014) ao realizarem um modelo experimental, conseguiram descrever que após a interação entre o TCR (célula Th2) e a molécula de MHC II das ILC2, as células Th2 secretam citocinas do tipo 2.

Todos esses estudos sobre as ILC2 só puderam ser realizados a partir do conhecimento das suas características fenotípicas. Nesse aspecto, elas foram originalmente identificadas em tecido adiposo ou dispersas sistemicamente em camundongos. Essas células foram inicialmente caracterizadas pela ausência dos marcadores de linhagem (Lin⁻), pela expressão do receptor de IL-7 (CD127), c-Kit (CD117), Sca-1, e T1/ST2 (IL-33R). Contudo, a sua caracterização em humanos se deu especificamente a partir da sua observação no intestino e foram definidas como sendo Lin⁻CD127⁺CD161⁺, que também expressavam o receptor quimioatraente de células Th2 (CRTH2), CRTH2⁺ (MJOSBERG *et al.*, 2011). O CRTH2 é um receptor de prostaglandina D₂, mas, de acordo com BARNIG *et al.* (2013), também pode ser ativado de maneira sinérgica com as alarminas IL-25 e IL-33. Este último também está presente nas células Th2, porém apenas as ILC2, dentre as ILCs, o expressam. O CRTH2 tem como função induzir a rápida produção de IL-5 e IL-13 em resposta às citocinas IL-25 e IL-33. Além de ser importante na produção destas citocinas, o CRTH2 possui ainda a função de aumentar a expressão de IL-17RA e ST2, os receptores das alarminas IL-33 e IL-25, respectivamente (XUE *et al.*, 2014).

O papel das ILC2 nas infecções por patógenos tem enfocado principalmente na sua participação como a principal fonte inicial e rápida da citocina IL-13, sobretudo nas helmintíases. A IL-13 produzida por ILC2 nas infecções por helmintos pode ter uma função primordial na hiperplasia de células caliciformes, hipercontratilidade do músculo liso, produção de muco e eliminação dos vermes (ZHAO *et al.*, 2003; MORO *et al.*, 2010; NEILL *et al.*, 2010; PRICE *et al.*, 2010; TURNER *et al.*, 2013; MOHAPATRA *et al.*, 2016). Sendo assim, os principais trabalhos envolvendo a participação das ILC2 nas helmintíases, até o momento, voltaram-se principalmente para as infecções causadas pelo *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heligmosomoides polygyrus bakeri*, *Strongyloides venezuelensis*, *Litomosoides sigmodontis*, *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma haematobium*. Na infecção por *N. brasiliensis* ou *H. polygyrus* estes parasitos induzem a liberação de IL-25 e IL-33, que promovem a proliferação da população de ILC2 (FALLON *et al.*, 2006; NEILL *et al.*, 2010; GERBE *et al.*, 2016; HOWITT *et al.*, 2016). No pulmão, a sua expansão e produção de IL-13 se mostrou dependente da alarmina IL-33 e da citocina IL-9 durante a infecção por *S. venezuelensis* e *N. brasiliensis* (YASUDA *et al.*, 2012; HUNG *et al.*, 2013; MCHEDLIDZE *et al.*, 2013; TURNER *et al.*, 2013; WOJNO *et al.*, 2015; RITTER *et al.*, 2017). Por outro lado, nas infecções do trato gastrointestinal (GI) por nematoides, como o *N. brasiliensis*, as ILC2 parecem ter um importante papel na expulsão destes (OLIPHANT *et al.*, 2014).

Em relação ao *Schistosoma* e helmintos filariais, tem-se observado, em modelos experimentais, que após a infecção ocorre um aumento local da frequência das ILC2 (BOYD

et al., 2015). Em adição, outros modelos de infecção demonstram que a expansão das ILC2 no pulmão e no fígado leva à fibrose (HAMS *et al.*, 2013; MCHEDLIDZE *et al.*, 2013). Neste estudo realizado por MCHEDLIDZE *et al.* (2013), a deficiência do receptor de IL-33 foi eficiente em reduzir o desenvolvimento dessa fibrose. Apesar dessas relações entre ILC2 e fibrose terem sido demonstradas em modelos murinos, essa relação ainda não pode ser avaliada em humanos. Contudo, indivíduos infectados pelo *S. haematobium* apresentam frequência reduzida de células ILC2 (CD45+CD127+CD294+CD161+) circulantes e o tratamento (praziquantel) da esquistossomose nestes indivíduos conseguiu restaurar essa frequência (NAUSCH *et al.*, 2015).

O papel destas células na resposta contra outros parasitas, como o *S. mansoni*, têm sido investigado com mais detalhe em modelos experimentais. Os novos estudos sobre a atuação das ILC2 nessa infecção também precisam avaliar a infecção em humanos e principalmente estarem atentos para a natureza dessa infecção em áreas endêmicas. Apesar de nos últimos anos ter avançado muito o conhecimento sobre a resposta imune inata na esquistossomose (CHUAH *et al.*, 2014; PONICHTERA *et al.*, 2014; TUNDUP *et al.*, 2014), o papel das ILC2 nessa infecção ainda deve ser melhor esclarecido. Uma vez que o verme adulto fica hospedado no interior das veias do sistema porta, e que a oviposição induz lesão constante das células epiteliais do intestino, com provável secreção de TSLP e IL-33, é possível que as ILC2 exerçam papel fundamental na tentativa de eliminação do parasito.

3. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A esquistossomose está inserida em um conjunto de doenças que são consideradas doenças tropicais negligenciadas (DTNs). Elas recebem este nome devido ao fato de serem características de países tropicais, em geral subdesenvolvidos, ou em desenvolvimento. Esta doença possui uma relação direta com situações de pobreza, falta de esgotamento sanitário, e carência de maiores ações que facilitem o acesso à informação e tratamento. Os números da esquistossomose no Brasil mostram que apesar dos esforços desde a década de 1970 para se reduzir a alta prevalência da esquistossomose, ainda está amplamente distribuída no território nacional, com números que podem chegar até 70% de prevalência nestas regiões (GOMES CASAVECHIA *et al.*, 2018).

Não obstante, por conta da natureza da infecção e contexto socioeconômico, os indivíduos que residem nessas áreas endêmicas para a esquistossomose estão em constante contato com o parasita e sofrendo com sucessivas reexposições. Nestas condições, muitos desenvolvem a forma crônica da doença, na qual existe uma resposta imune do tipo 2, que apesar de surgir como uma tentativa de controle, acaba promovendo o acometimento de importantes regiões como a intestinal e hepatoesplênica. Os danos teciduais ocasionados são decorrentes de uma resposta imune do tipo 2 desenvolvida após o início da ovoposição (LA FLAMME *et al.*, 2001; PATTON *et al.*, 2002). Estes ovos após serem depositados, migram para estas regiões e geram uma reação inflamatória eosinofílica e granulomatosa, que é progressivamente substituída por depósitos fibróticos (CHEEVER *et al.*, 2000).

Apesar de haver um grande entendimento sobre a resposta imune na esquistossomose, ainda não foi possível esclarecer todos os mecanismos imunológicos envolvidos com esse processo desenvolvido na fase crônica. Atualmente, diversos estudos têm mostrado que as ILC2 possuem um papel fundamental em doenças que cursam com uma resposta imune do tipo 2, desde doenças alérgicas às parasitárias (TURNER *et al.*, 2013; BARTEMES *et al.*, 2014; JACKSON *et al.*, 2014; MCSORLEY *et al.*, 2014; OLIPHANT *et al.*, 2014). No contexto das helmintíases, a função das ILC2 tem sido bastante relacionada como a principal fonte das citocinas do tipo 2, principalmente IL-13, e com o processo fibrótico gerado por essa resposta. Contudo, existem poucos estudos elucidando o papel destas células na esquistossomose humana, sendo alguns de caráter experimental. Portanto, a hipótese deste estudo é que as células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) do sangue periférico de indivíduos com esquistossomose mansônica possuem um papel importante na imunopatologia da doença produzindo citocinas do tipo 2 que contribuem para os danos observados na doença e fibrose hepática.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Caracterizar o fenótipo e perfil de citocinas produzidas por células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) circulantes em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Quantificar o perfil de citocinas séricas (IL-33, TSLP) em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* após o tratamento da doença.
2. Avaliar indiretamente o dano hepático através das concentrações séricas das enzimas hepáticas transaminase glutâmico-oxalacética (TGO), transaminase glutâmico-pirúvica (TGP), gama glutamil transpeptidase (γ GT) e fosfatase alcalina (ALP) em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e correlacionar com a carga parasitária de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.
3. Comparar a frequência de ILC2 e a expressão dos receptores CD127 e CRTH2 entre indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* e controles saudáveis.
4. Comparar o perfil de citocinas (IL-2; IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN- γ e TNF) produzidas por ILC2 de pacientes com esquistossomose mansônica humana e controles saudáveis;
5. Descrever procedimento de isolamento de células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) por *sorting*;

5. RESULTADOS

5.1 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO 1

Neste capítulo, será apresentado o manuscrito 1, intitulado “Tratamento da esquistossomose reduz a produção de TSLP e IL-13 em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* residentes em uma área endêmica”. Como mencionado anteriormente, indivíduos que residem em áreas endêmicas estão constantemente expostos à infecção pelo *Schistosoma*. Este fato pode ser responsável por danos à vários importantes tecidos e órgãos. Estas agressões ao tecido induzem a liberação de alarminas, citocinas que sinalizam um potencial dano das células epiteliais. As alarminas liberadas são essenciais para sinalizar o dano e iniciar respostas celulares na tentativa de resolver estas agressões, como através da estimulação de células vigilantes do tecido, como as ILC2. Desse modo, os objetivos deste manuscrito foram avaliar o perfil de citocinas séricas (IL-33, TSLP) em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* após o tratamento da doença, bem como também avaliar indiretamente o dano hepático através das concentrações séricas das enzimas hepáticas TGO, TGP, γ GT e ALP e correlacionar com a carga parasitária de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

MANUSCRITO 1: Tratamento da esquistossomose reduz a produção de TSLP e IL-13 em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* residentes em uma área endêmica.

Autores: Michael Nascimento Macedo^{1,2}, Yuri Tabajara^{1,2}, Thainá Fialho², Thairone Moura², Ronald Alves dos Santos^{1,2}, Ane Caroline Casaes², Kelvin Edson Marques de Jesus², Andressa Lima², Marcos Vinicius Francisco^{1,2}, Isadora Cristina de Siqueira^{1,2}, Ricardo Riccio Oliveira^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana, Universidade Federal da Bahia, Brasil,

² Laboratório de Patologia Experimental, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, Brasil.

Resumo

INTRODUÇÃO: A esquistossomose é uma doença causada por parasitos do gênero *Schistosoma*. Atualmente, cinco diferentes espécies são conhecidas por causar infecção no homem: *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, e *S. mekongi*. Esta doença é considerada uma doença tropical negligenciada e a sua ocorrência está relacionada com condições de pobreza. A esquistossomose possui uma fase aguda e uma fase crônica, sendo esta última relacionada com graves complicações, como o acometimento das regiões intestinal e hepatoesplênica. Enquanto na fase aguda existe uma resposta imune do tipo 1 em resposta ao verme, a oviposição marca o início de uma resposta imune do tipo 2 direcionada contra antígenos do ovo. Estudos prévios sugerem que a resposta imune do tipo 2 nas helmintíases é desempenhada principalmente pelas recentemente descobertas células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2), células que produzem citocinas do tipo 2 em resposta às alarminas como IL-33 e TSLP, e contribuem para os principais efeitos danosos, como a fibrose hepática. **OBJETIVO:** O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de citocinas e de alarminas séricas (IL-33, TSLP) em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* após o tratamento da doença, bem como também avaliar indiretamente o dano hepático através das concentrações das enzimas hepáticas TGO, TGP, γ GT e ALP. **MATERIAL E MÉTODOS:** A população estudada foi composta por 232 indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, residentes no município do Conde, Bahia, Brasil. Os participantes tiveram amostras de soro coletadas em períodos distintos para avaliação do efeito do tratamento com praziquantel nas variáveis estudadas: anteriormente ao tratamento (D0), 30 dias (D30) e 180 dias (D180) após o tratamento. A partir da coleta de soro, foram avaliadas as concentrações das citocinas séricas pela técnica de CBA, utilizando o kit Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A), e das citocinas IL-9, IL-13 e IL-33 e TSLP por ELISA. As concentrações séricas das enzimas hepáticas TGO, TGP, γ GT e ALP foram obtidas pelos métodos de Reitman e Frankel, método de Szasz modificado e método de Roy modificado, respectivamente. **RESULTADOS:** Os dados deste estudo mostram que houve uma diminuição nas concentrações séricas das citocinas TSLP e IL-13 após o tratamento de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*. Além disso, também foi possível observar significativas alterações nas concentrações séricas de todas as enzimas da função hepáticas avaliadas. O coeficiente de Ritis, que avalia a presença de lesões crônicas, demonstrou que 98,5% dos participantes podem apresentar lesões crônicas, provavelmente com fibrose ou cirrose hepática. **CONCLUSÕES:** Os dados desse estudo mostraram que o tratamento da esquistossomose mansônica humana pode ter uma relação com a diminuição das concentrações séricas das citocinas TSLP e IL-13, envolvidas nos processos de manutenção e homeostase. Adicionalmente, a diminuição de IL-13 após o tratamento sugere que esta citocina provavelmente está associada com os processos imunopatológico observados na doença, uma vez que a relação desta citocina e fibrose já foi demonstrada na literatura.

Palavras-chave: Esquistossomose mansoni, citocinas, TSLP, IL-13, fibrose.

Abstract

INTRODUCTION: Schistosomiasis is a disease caused by parasites of *Schistosoma* genus. Currently, we know five species that cause human disease: *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, e *S. mekongi*. This disease is a neglected tropical disease which occur in association with poverty conditions. Schistosomiasis have an acute and chronic phase, the latter being related to serious complications, such as involvement of intestinal and hepatosplenic regions. While the acute phase is marked by the presence of a type 1 immune response directed to the worms, a type 2 immune response is initiated after the oviposition in response to egg's antigens. Previous studies suggest that the type 2 immune response in helminthiasis is mainly performed by the recently discovered group 2 innate lymphoid cells (ILC2), cells that produce type 2 cytokines in response to alarmins, as IL-33 and TSLP, contributing to the main observed damages, as hepatic fibrosis. **AIM:** The aim of this study was to evaluate the cytokine profile and serum alarmins (IL-33, TSLP) in *S. mansoni* infected individuals upon disease treatment, as well assess the hepatic damage through the hepatic enzymes TGO, TGP, γ GT and ALP. **MATERIAL AND METHODS:** The studied population was composed by 232 *S. mansoni* infected individuals, living in the county of Conde, Bahia, Brazil. The participants had serum samples collected to the evaluation of schistosomiasis treatment with praziquantel at different intervals: before treatment (D0), 30 days (D30) and 180 days (D180) after treatment. After the collect of serum, the concentrations of the serum cytokines were performed by CBA, using the kit Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A), and the cytokines IL-9, IL-13, and IL-33 were assessed by ELISA. The serum concentrations of hepatic enzymes TGO, TGP, γ GT e ALP were evaluated by the methods of modified Reitman & Frankel, modified Szas and modified Roy, respectively. **RESULTS:** The present data show a decrease in the serum levels of the cytokines TSLP and IL-13 after the treatment of individuals infected with *S. mansoni*. Furthermore, we also observed significant alterations in all evaluated hepatic enzymes. Ritis coefficient, which indicates the presence of chronic lesions, demonstrate that 98,5% of the participants may present chronic lesions, likely associated with fibrosis or hepatic cirrhosis. **CONCLUSIONS:** These data showed that schistosomiasis treatment decreases the levels of TSLP and IL-13 cytokines, involved in maintenance and homeostasis process. In addition, the decrease in IL-13 after treatment suggests that this cytokine is likely associated with the immunopathological processes observed in the disease, since the relationship of this cytokine and fibrosis has already been demonstrated in the literature.

Keywords: Schistosomiasis mansoni, cytokines, TSLP, IL-13, fibrosis.

Introdução

A esquistossomose é uma doença causada por parasitos do gênero *Schistosoma*. As espécies que causam infecção em humanos incluem o *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, e *S. mekongi*. Essa infecção apresenta uma ampla distribuição global, estando presente em 78 países (WHO, 2016; 2019). As estimativas mais atuais reportam um acometimento de cerca de 250 milhões de pessoas em todo o mundo, além de outras 800 milhões de pessoas estarem vivendo em áreas de risco de infecção (STEINMANN *et al.*, 2006; WHO, 2019). A ocorrência da esquistossomose nessas regiões possui uma forte relação com as situações socioeconômicas e estruturais vividas pela população destes lugares, fatos que fazem a doença ser associada com situações de pobreza e estar presente na lista de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (HOPKINS *et al.*, 2008). No Brasil, a esquistossomose causada pelo *Schistosoma mansoni* também exhibe dados preocupantes. De acordo com um estudo recente, o país apresenta 19 estados afetados e estimativas de prevalência que chegam à 70% de indivíduos afetadas nestas regiões (GOMES CASAVECHIA *et al.*, 2018). Estes números fizeram com que a Organização Mundial da Saúde (OMS) orientasse um programa de tratamento massivo (MDA) da doença com uma dose do antiparasitário praziquantel, com o objetivo de reduzir as altas prevalências, transmissão e ocorrências de formas graves da doença. Contudo, dados recentes mostram que esse programa de administração em massa apresenta cobertura global de apenas 20,74% (OLVEDA *et al.*, 2016).

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* tem início quando o homem, o hospedeiro definitivo, entra em contato com águas de rios e lagos contaminadas com cercárias do parasito. Após penetrarem na pele do indivíduo, estas cercárias evoluem para esquistossômulos e iniciam uma migração para diversos tecidos do corpo através da circulação sanguínea (ROSS *et al.*, 2002). Estes esquistossômulos diferenciam-se em vermes adultos e também migram para regiões como o intestino delgado, mas, ao chegarem na veia porta hepática, realizam o seu processo de reprodução e, posteriormente, a oviposição (KUNTZ, 1955; WALKER, 2011). Desse modo, a fase aguda da infecção pode ser subdividida em dois momentos: pré-patente (anteriormente a oviposição) e pós-patente (após a oviposição). Enquanto a fase pré-patente é marcada pela produção de citocinas do tipo 1, como TNF, IL-1 e IL-6; a fase pós-patente caracteriza-se pelo início e predomínio da resposta imune do tipo 2, provocada pela exposição dos antígenos do ovo do *Schistosoma*.

Acredita-se que esses ovos depositados sejam responsáveis pelas principais complicações na fase crônica da infecção. Isto se dá porque os ovos liberados migram para a

região peri-intestinal ou ainda sofrem embolização para outras regiões, como o fígado, baço, pulmão, ou sistema cérebro-espinhal. Após a sua migração para estes locais, os ovos se prendem nos tecidos e induzem fortes reações inflamatórias, que são progressivamente substituídas por depósitos fibróticos (CHEEVER *et al.*, 2000). Salienta-se que a gravidade dessa infecção dependerá de fatores que vão desde a genética do hospedeiro e do parasito, grau de exposição, intensidade da infecção, e presença de coinfeções (NOVATO-SILVA *et al.*, 1992; CHEVILLARD *et al.*, 2003; BOOTH *et al.*, 2004; KABATEREINE *et al.*, 2004; KAMAL *et al.*, 2004; KING *et al.*, 2004). Contudo, esta doença também pode levar ao surgimento de formas mais graves, em que existe um acometimento muito maior da região hepatoesplênica com risco de vida. Adicionalmente, estas formas graves da doença podem apresentar fibrose hepática e periportal grave, hipertensão portal e desvio portossistêmico de sangue venoso (PEREIRA *et al.*, 1997; HATZ, 2001).

Durante essa fase crônica da infecção pelo *Schistosoma mansoni*, existe uma resposta imune caracterizada pelo predomínio de citocinas do tipo 2, com formação de granuloma e produção de anticorpos contra os antígenos do ovo (EVERTS *et al.*, 2012). Contudo, acredita-se que esta resposta imune desempenhada com a produção dessas citocinas, como a IL-13, e as sucessivas tentativas de resolução do granuloma, contribuem muito mais para os danos observados na infecção crônica do que para a proteção (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; LA FLAMME *et al.*, 2001; HOFFMANN *et al.*, 2002; PATTON *et al.*, 2002; CHIARAMONTE *et al.*, 2003; WYNN, 2003). Em adição, parte das células que sofrem com estes danos provocados respondem liberando citocinas denominadas alarminas, como a IL-33 e o TSLP (MORO *et al.*, 2010; NEILL *et al.*, 2010; MJOSBERG *et al.*, 2011; GENTEK *et al.*, 2013; TANRIVER e DIEFENBACH, 2014).

Estas citocinas liberadas em decorrência do dano tecidual são cruciais na sinalização do dano ocorrido e iniciam um processo de estimulação de importantes células na vigilância do tecido, mas que só foram descobertas em 2010, as células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2). Estas células se caracterizam por não expressarem receptores específicos de antígenos e não apresentarem marcadores de linhagem celular (MORO *et al.*, 2010; NEILL *et al.*, 2010; PRICE *et al.*, 2010; MJOSBERG *et al.*, 2011). Adicionalmente, as ILC2 são reconhecidas em diversas doenças como nas alérgicas e algumas infecções por patógenos, como nas helmintíases, por serem as primeiras e as principais fontes de citocinas do tipo 2, contribuindo para os danos teciduais e fibrose (TURNER *et al.*, 2013; BARTEMES *et al.*, 2014; JACKSON *et al.*, 2014; MCSORLEY *et al.*, 2014; OLIPHANT *et al.*, 2014). Apesar de as evidências serem muito recentes, e o seu papel na esquistossomose humana não estar muito bem definido, as ILC2 já

possuem a sua participação nos processos de patogênese bem documentado, principalmente em relação aos mecanismos em que contribuem para os danos teciduais e fibrose por meio da sua liberação de IL-13 (HAMS *et al.*, 2013; MCHEDLIDZE *et al.*, 2013). Nesse sentido, este estudo propõe avaliar, em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, o perfil de citocinas e de alarminas séricas, assim como também avaliar indiretamente o dano hepático nestes indivíduos através das concentrações das enzimas hepáticas TGO, TGP, γ GT e ALP. Sendo assim, acredita-se que os eventos decorrentes da infecção pelo *Schistosoma mansoni* leve a uma maior produção das alarminas séricas e de citocinas que participam da imunopatologia da esquistossomose.

Metodologia

População de estudo

Este estudo foi realizado na região do Conde, localizada a 150 km ao norte de Salvador, Bahia, Brasil. O município possui uma localização privilegiada que propicia a atividade turística como base econômica, além da cultura do côco e da pecuária.

O estudo proposto é um estudo intervencionista e prospectivo, no qual foram incluídos indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* residentes nesta região. A população desta região já vem sendo acompanhada por estudos realizados pelo nosso grupo desde 2001, devido à elevada frequência de esquistossomose observada. A população incluída nesta casuística é constituída de cerca de 600 indivíduos que se distribuem nos vilarejos de Camarões, Jenipapo e Buri. Os residentes situados nestas regiões apresentam em comum a necessidade de utilização dos rios que passam pela região para os seus afazeres domésticos, atividades de lazer, mas também como principal fonte de renda, visto que a população destes vilarejos depende da pesca como principal fonte de renda. Por se tratar de uma região de difícil acesso, no ano de 2001 os moradores ainda não dispunham de cuidados médicos como consultas, exames ou medicamentos, além de as residências não possuírem energia elétrica, esgotamento sanitário ou água encanada. Quase duas décadas depois, esta região apresenta melhorias no que diz respeito ao acesso a serviços básicos, como água e energia elétrica, todavia, a falta de saneamento básico ainda é um problema existente e que demanda atenção das autoridades competentes. É importante ressaltar que alguns destes fatores podem contribuir para que a população tenha dificuldades na prevenção de algumas doenças e, de maneira acidental, participe de ciclos parasitários silvestres.

Desse modo, após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), foram coletadas amostras de fezes para a realização de exames parasitológicos através da técnica de Kato-Katz em voluntários residentes no Conde-BA. A realização deste teste permitiu, assim, determinar a prevalência da esquistossomose mansônica na região e eleger os participantes do estudo. Aqueles que apresentavam infecção pelo *Schistosoma*, atendiam aos critérios de inclusão (idade – 4 a 70 anos) e aceitaram participar, foram incluídos no estudo e tiveram amostras de sangue coletadas para as avaliações laboratoriais. Vale ressaltar que devido à alta prevalência encontrada, todos os indivíduos investigados na região, com ou sem infecção, foram tratados com uma dose de praziquantel (60 mg/kg [4-15 anos]; 50 mg/kg [16-70 anos]), seguindo às recomendações do Ministério da Saúde (SAÚDE, 2017). Com o intuito de se

avaliar os efeitos do tratamento em relação aos fatores clínicos e imunológicos, os participantes da pesquisa foram novamente avaliados com 30 e 180 dias após o tratamento. Dessa forma, as avaliações do estudo incluíram o D0 (anteriormente ao tratamento), D30 (30 dias após o tratamento) e D180 (180 dias após o tratamento).

Coleta de dados

O trabalho de base realizado previamente por agentes comunitários municipais nestes vilarejos permitiu um mapeamento dos indivíduos desta região. No entanto, nenhum trabalho havia sido realizado na região no que diz respeito à coleta de informações mais detalhadas para uso estratégico em estudos ou para a elaboração de políticas públicas.

Sendo assim, este estudo contou com uma sofisticada plataforma de coleta e gerenciamento de dados conhecida como RedCap (*Research Electronic Data Capture*) para a coleta e armazenamento de dados clínico-epidemiológicos. Como se trata de uma região com áreas de difícil acesso, as localizações geográficas via satélite de cada indivíduo foram obtidas e gravadas no sistema da plataforma, o que tornou a coleta de dados mais confiável e eficiente. A figura 1 mostra a referida região e como os povoados estão distribuídos.

Povoados

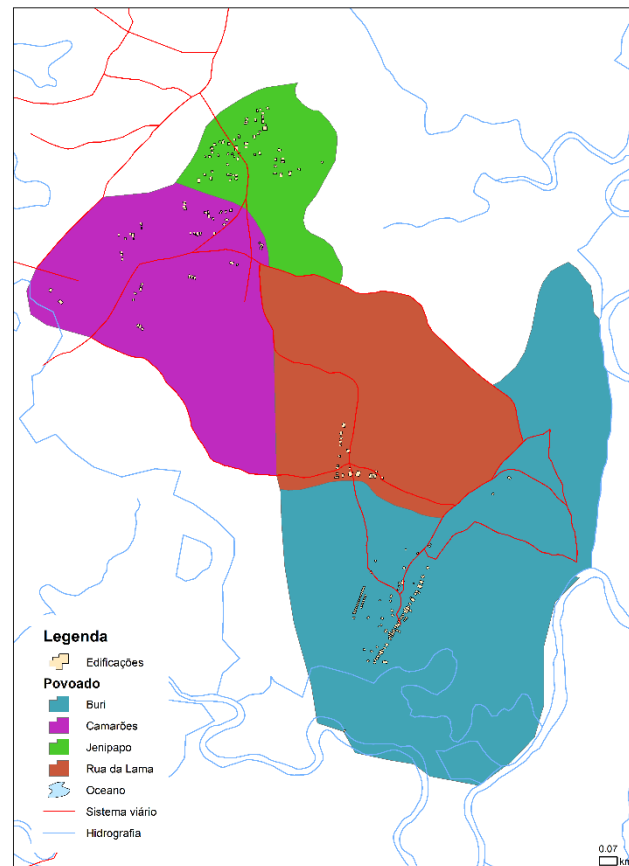


Figura 1. Localização geográfica dos povoados de Buri, Camarões e Jenipapo, Conde, Bahia. (Fonte: O autor [2020]).

Avaliação da produção de citocinas séricas

A dosagem de citocinas séricas foi realizada pela técnica de CBA (*Cytometric Bead Array*; BD Biosciences) utilizando o kit Th1/Th2/Th17 (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A), de acordo com as instruções do fabricante e com o auxílio do citômetro de fluxo. As dosagens das citocinas não contempladas no kit Th1/Th2/Th17 foi realizada por ELISA sanduíche, utilizando os kits DuoSet (R&D Systems), IL-13, IL33 e TSLP; enquanto IL-9 foi avaliada através do kit Platinum (eBioscience). Foram utilizados valores brutos em MFI (média de intensidade de fluorescência), para CBA, e densidade ótica (DO), para o ELISA. Após a obtenção destes valores, encontrou-se os valores de concentração em pg (picograma) por meio de análise estatística.

Avaliação de biomarcadores hepáticos

A avaliação de moléculas relacionadas com a função hepática foi realizada por meio de amostras de soro obtido no momento da coleta de sangue total. Dessa forma, avaliou-se a concentração das enzimas transaminase glutâmico oxalacética (TGO), também conhecida como aspartato aminotransferase (AST); transaminase glutâmico pirúvica (TGP), que também pode ser referenciada como alanina aminotransferase (ALT), gama glutamil transferase (γ GT) e fosfatase alcalina (ALP). As dosagens foram realizadas por meio da técnica de Reitmann e Frankel, através dos kits Transaminase TGO K034, para o TGO, e o TGP, Transaminase TGP K035. O γ GT foi avaliado pelo método de Szasz modificado, através do kit Gama GT cinética K080 e a fosfatase alcalina pelo método de Roy modificado, utilizando o kit Fosfatase Alcalina K019. Todos os kits foram manufaturados pelo fabricante Bioclin (Bioclin, BH, BR). Algumas destas enzimas possuem valores de referências que variam de acordo com a idade e gênero. Nestes casos, foram feitas análises considerando o grupo geral e analisando os estratos provenientes deste grupo, de acordo com as variações biológicas referenciadas. Os valores de referência seguiram as orientações do fabricante, que os determinou a partir de estudos com indivíduos saudáveis. O coeficiente de Ritis, utilizado neste estudo para indicar indiretamente a presença de lesões crônicas a nível hepático, foi obtido a partir de uma análise na qual é levado em consideração a diferença entre TGO e TGP (BOTROS e SIKARIS, 2013).

Análises estatísticas

Os dados obtidos neste estudo foram analisados pelo software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Inicialmente, os dados foram analisados quanto a sua normalidade através do teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. Os dados que obedeciam aos parâmetros de normalidade foram analisados utilizando-se testes paramétricos e aqueles que não se enquadravam nestes critérios, não-paramétricos. Desse modo, quando se fez necessário a análise de avaliações realizadas em diferentes pontos, ou seja, emparelhadas utilizou-se o teste de Wilcoxon. Por outro lado, a análise da associação entre algumas variáveis foi feita por meio de uma correlação de Spearman, dependendo da distribuição dos dados e tamanho da amostra.

Resultados

Aspectos epidemiológicos e clínicos da população estudada

A população estudada foi composta por 232 indivíduos. Estas pessoas residiam na região pertencente ao município do Conde-BA, mais especificamente nos vilarejos de Buri, Camarões e Jenipapo. A partir da observação realizada por (ARAÚJO *et al.*, 2004), em que foi documentada a existência de endemicidade pelo *S. mansoni* na comunidade, diversos estudos foram realizados para melhor compreensão dos aspectos relacionados com a doença na região (DE SOUZA RDA *et al.*, 2012; GRANT *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2014; KRUSCHEWSKY *et al.*, 2016). Todavia, ainda existem lacunas que talvez possam ser preenchidas a partir de estudos maiores e que se debrucem sobre os fatores epidemiológicos e imunológicos envolvidos na doença. Além disso, a exemplo do que mostraremos nesse estudo, o número de indivíduos infectados pelo parasito ainda permanece elevado, o que mostra que as estratégias adotadas não foram totalmente eficientes. Uma tabela sobre os principais aspectos epidemiológicos e clínicos representativa da população estudada pode ser observada logo abaixo (Tabela 1).

Tabela 1. Características epidemiológicas e clínicas dos indivíduos com esquistossomose mansônica

	Buri (n=119)	Camarões (n=40)	Jenipapo (n=73)	Total na região (n=232)
Idade (média, DP)	29,2 ± 19,4	30,9 ± 18,4	26,1 ± 17	28,5 ± 18,5
Gênero	54M; 65F	14M; 26F	24M; 49F	92M; 140F
Infecção por <i>S. mansoni</i>	112/119 (94,1%)	13/40 (32,5%)	12/73 (16,4%)	137/232 (59%)
<i>Masculino</i>	50 (44,7%)	5 (38,5%)	2 (16,7%)	57 (41,6%)
<i>Feminino</i>	62 (55,3%)	8 (61,5%)	10 (83,3%)	80 (58,4%)
Carga parasitária (mediana, AIQ)	42 epg (108)	42 epg (48)	24 epg (42)	36 epg (84)
<i>Masculino</i>	36 epg (96)	48 epg (72)	36 epg (36)	36 epg (81)
<i>Feminino</i>	48 epg (120)	36 epg (36)	12 epg (27)	24 epg (60)
Contato com rio ou lagoa no Conde-BA	113/119 (94,9%)	36/40 (90%)	68/73 (93,1%)	217/231 (93,9%)

NOTAS: DP, desvio-padrão; M, masculino; F, feminino; epg, eggs per gram (ovos por grama); AIQ, amplitude interquartil; BA, Bahia.

Como pode ser observado, nesta população, existe um elevado número de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* (137/232 [59%]). A análise da prevalência de infecção nesta região pode ainda ser realizada por meio da estratificação das suas regiões (Buri, Camarões e Jenipapo). Enquanto as regiões de Camarões e Jenipapo são mais próximas do centro urbano do Conde, a região de Buri é mais afastada desse centro e conta com a presença de rios e lagos na sua extensão territorial, fatores que podem ser importantes para a história da doença na região (Figura 1).

Nesse sentido, foi observado que em uma das regiões, Jenipapo, os indivíduos encontram-se menos infectados (16,4%) quando comparados com aqueles residentes em Buri (94,1%) e em Camarões (32,5%). Neste mesmo vilarejo, os residentes também apresentaram uma menor carga parasitária (24 epg [42]) quando comparado com as regiões do Buri (42 epg [108]) e Camarões (42 epg [48]). Outra observação importante diz respeito às claras diferenças existentes na infecção entre os gêneros. No grupo dos infectados foi possível observar que existe uma prevalência maior do gênero feminino. No entanto, no que diz respeito à carga parasitária, os indivíduos do gênero masculino apresentaram valores mais elevados. Diversos fatores podem estar relacionados com estas observações, desde maior possibilidade de exposição às águas contaminadas devido às diferentes atividades exercidas entre os membros das famílias, quanto existência de resistência ou não a realização do tratamento. É importante salientar que a transmissão da doença depende da presença do homem infectado, excretando ovos do helminto pelas fezes. Esses dados sugerem que cargas parasitárias elevadas também podem estar associadas com um número maior de indivíduos infectados.

O contato com água contaminada é tido como um fator preponderante para infecção e a manutenção do ciclo do parasito. A carência de água encanada e esgotamento sanitário satisfatório fazem com que a maior parte da população tenha contato com água de rios ou lagoas da região (93,9%). Este se configura como um importante problema, uma vez que grande parte da população tem essas reservas como a única fonte de água para consumo.

Produção de citocinas séricas em indivíduos infectados pelo *S. mansoni* antes e no pós tratamento com praziquantel

O Ministério da Saúde (MS) recomenda que na existência de áreas endêmicas com prevalência de infecção superior a 25%, todos os indivíduos da região sejam tratados com o intuito de reduzir o surgimento de formas graves da doença, prevalência de infecção, risco de expansão geográfica e adotar medidas de controle em tempo oportuno (SAÚDE, 2017). Neste sentido, todos os indivíduos participantes do estudo, com ou sem infecção pelo *S. mansoni* confirmada pelo parasitológico de fezes, foram tratados com praziquantel.

A infecção pelo *S. mansoni* leva ao desenvolvimento de uma resposta imune do tipo 1 na fase conhecida como aguda. Com o início da oviposição, cerca de 6 semanas após o início da infecção, inicia-se uma resposta imune do tipo 2. Diversas citocinas do tipo 2 parecem ter um importante papel na manutenção de uma infecção crônica (GRZYCH *et al.*, 1991; PEARCE *et al.*, 1991). Com o intuito de avaliarmos os efeitos positivos do tratamento, a produção sérica de citocinas foi avaliada antes do tratamento (D0), com 30 dias após o tratamento (D30) e com 180 dias após o tratamento (D180).

Nossas observações mostraram que o tratamento levou a uma diminuição na produção da citocina IL-13. Com 30 dias após o tratamento, ainda não é possível observar uma mudança no perfil da citocina (382,8 pg/mL [1195] *versus* 391,3 pg/mL [1281], $p = 0,26$). Contudo, essa redução torna-se evidente no D180, quando comparado com o D0 (382,8 pg/mL [1195] *versus* 197,1 pg/mL [531], $p = 0,009$) (Figura 2). Por outro lado, apenas 1 indivíduo apresentou concentrações detectáveis da citocina IL-4 em todos os tempos de observação. Além disso, não foram observadas mudanças no perfil da citocina IL-10 após o tratamento, e a citocina IL-9 apresentou concentrações indetectáveis no soro. De maneira semelhante, não houve alteração significativa na produção das citocinas do tipo 1, IL-2, IFN- γ , TNF e IL17A. Em contrapartida, a despeito de não haver uma diferença estatisticamente significativa, IFN- γ e TNF aparecem discretamente mais elevadas após o tratamento da esquistossomose (Figura 3).

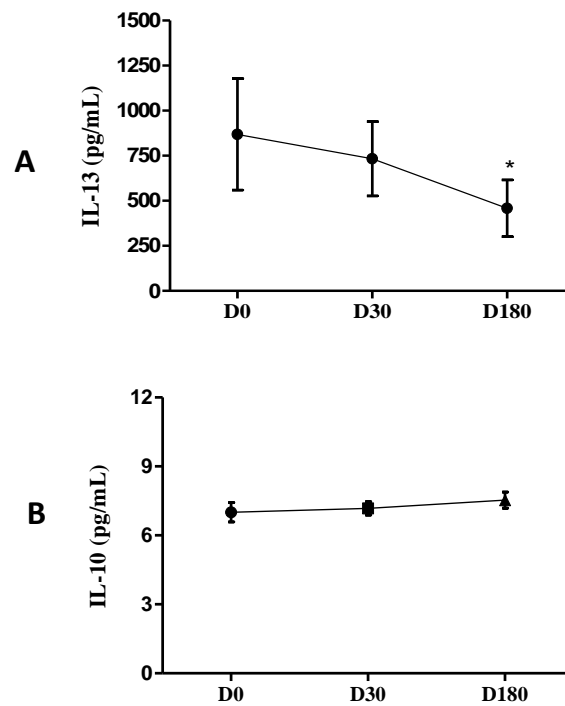


Figura 2. Avaliação do perfil sérico Th2 de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* antes e após o tratamento com praziquantel. Os gráficos A e B são representativos da produção sérica das citocinas IL-13 e IL-10 por indivíduos com esquistossomose mansônica. Os indivíduos participantes do estudo foram avaliados em três momentos distintos: anteriormente ao tratamento (D0), 30 dias após o tratamento e 180 dias após o tratamento (D180). Os valores de concentração da citocina IL-13 foram obtidos após dosagens realizadas pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando kits DuoSet (R&D Systems). A citocina IL-10 foi quantificada por CBA (Cytometric Bead Array; BD) utilizando o kit Th1/Th2/Th17 (BD Bioscience). Todos os valores estão representados em média e erro padrão da média. As comparações entre os diferentes pontos foram feitas com o teste de Wilcoxon.

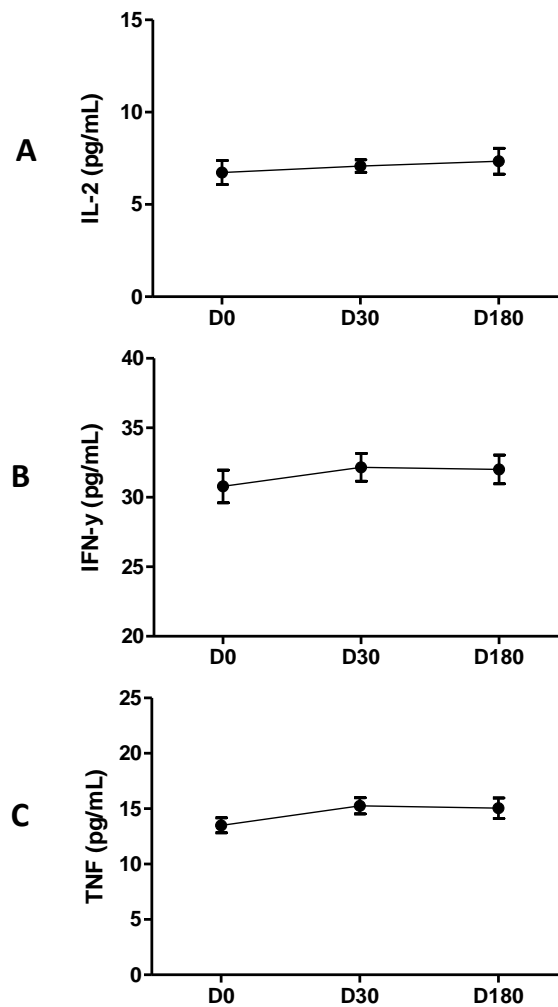


Figura 3. Avaliação do perfil sérico Th1 de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* antes e após o tratamento com praziquantel. Os gráficos A, B e C são representativos da produção sérica das citocinas IL-2, IFN- γ , TNF por indivíduos com esquistossomose mansônica. Os indivíduos participantes do estudo foram avaliados em três momentos distintos: anteriormente ao tratamento (D0), 30 dias após o tratamento e 180 dias após o tratamento (D180). Os valores de concentração das citocinas foram obtidos após dosagens realizadas pela técnica de CBA (Cytometric Bead Array; BD) utilizando o kit Th1/Th2/Th17 (BD Bioscience). Todos os valores estão representados em média e erro padrão da média. As comparações entre os diferentes pontos foram feitas com o teste de Wilcoxon.

Avaliação de marcadores da função hepática e correlação com mecanismos associados à patogênese da esquistossomose

Uma vez que neste estudo encontramos dados sugestivos de que a citocina IL-13 pode participar da imunopatologia da doença, devido a sua diminuição após o tratamento, decidimos também investigar, indiretamente, a ocorrência de alterações hepáticas por meio da avaliação sérica de marcadores da função hepática.

Para tanto, o acometimento hepático pode ser melhor entendido quando observamos a elevação sérica de algumas moléculas como as enzimas transaminases TGO e TGP, também chamadas de AST e ALT: AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase). Adicionalmente, γ GT (gama glutamil transpeptidase ou GGT) e fosfatase alcalina (ALP) também podem acompanhar esses marcadores, auxiliando na avaliação da função hepática.

Sendo assim, avaliamos os valores encontrados destas moléculas nos indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e comparamos com os valores normais de referência recomendados pelos fabricantes dos kits (Bioclin). Em adição, para avaliar se o aumento destas moléculas estava associado com a carga parasitária encontrada, realizamos uma análise de correlação com esta variável. É importante salientar que muitos destes marcadores apresentam uma grande variabilidade etária e/ou quanto ao gênero. Em vista disso, em muitas análises foram necessárias análises estratificando a população para uma maior compreensão dos dados.

Neste estudo, como pode ser observado na Tabela 2, os indivíduos com esquistossomose apresentaram maior elevação de TGO (masculino, 40,6% e feminino, 21,9%) do que TGP (masculino, 9,1% e feminino, 10,2%). A relação entre o aumento destas enzimas também tem importância na avaliação da intensidade da lesão. Uma relação entre os valores de TGO e TGP, coeficiente de Ritis, sugere que 69/70 (98,5%) dos infectados podem apresentar lesões crônicas e mais profundas (Figura 4). Apesar disso, estas elevações não estiveram correlacionadas com os valores de carga parasitária (Tabela 2).

Por outro lado, em relação ao γ GT, foram encontradas elevações em todos grupos etários e de gênero avaliados. Além disso, quando visto de uma maneira global, o γ GT apresenta-se correlacionado com a carga parasitária nestes indivíduos, apesar de fraca associação ($r= 0,37$; $p= 0,001$). Interessantemente, γ GT esteve mais correlacionado com a carga parasitária nos indivíduos infectados do gênero masculino. Nestes subgrupos, tanto os adultos, quanto os indivíduos de 13-18 anos apresentaram correlação com a carga parasitária (adultos, $r= 0,51$; $p= 0,03$ e 13-18 anos, $r= 0,84$; $p= 0,02$) (Tabela 2).

A fosfatase alcalina também apresentou elevação nos subgrupos observados. Contudo, o subgrupo dos adultos (maiores de 18 anos) foi o que apresentou maior elevação acima dos limites de referência 17/19 (89,4%) (Tabela 2). Apesar desta observação ser sugestiva de processos obstrutivos envolvendo os ductos biliares, não foi possível encontrar uma correlação entre ALP e os valores de carga parasitária encontrados.

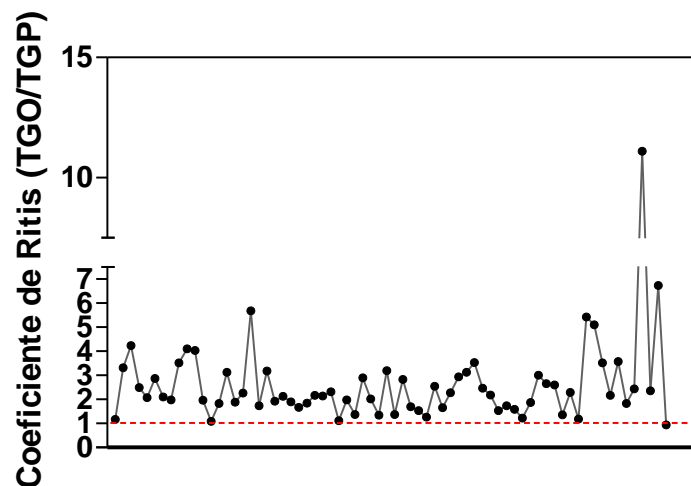


Figura 4. Valores observados do coeficiente de Ritis em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. O gráfico ilustra os valores encontrados do coeficiente de Ritis para cada indivíduo com esquistossomose mansônica avaliado. Este coeficiente pode ser estimado a partir de uma relação entre as enzimas TGO e TGP em cada participante. Valores do coeficiente de Ritis abaixo de 1 podem ser observados em algumas lesões agudas no fígado, como nas hepatites B e C. Por outro lado, valores acima de 1 sugerem lesões crônicas, principalmente quando estas já estão em curso de fibrose ou cirrose.

Tabela 2. Avaliação de marcadores da função hepática e correlação com a carga parasitária de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*

Enzima	Acima dos limites de referência (%)	Correlação com carga parasitária	
		<i>r</i>	<i>p</i>
TGO	22/73 (30,1%)	0,04	0,7
<i>Masculino</i>	13/32 (40,6%)	- 0,05	0,7
<i>Feminino</i>	9/41 (21,9%)	0,1	0,4
TGP	7/72 (9,7%)	0,03	0,7
<i>Masculino</i>	3/33 (9,1%)	0,01	0,9
<i>Feminino</i>	4/39 (10,2%)	0,05	0,7
γGT	-	0,37	0,001*
<i>1-12 anos (masculino)</i>	5/10 (50%)	- 0,01	0,9
<i>1-12 anos (feminino)</i>	4/9 (44,4%)	0,49	0,1
<i>13-18 anos (masculino)</i>	3/7 (42,8%)	0,84	0,02*
<i>13-18 anos (feminino)</i>	4/9 (44,4%)	0,61	0,08
<i>Adultos (masculino)</i>	4/17 (23,5%)	0,51	0,03*
<i>Adultos (feminino)</i>	12/21 (57,1%)	0,16	0,4
Fosfatase alcalina	-	0,18	0,3
<i>1-12 anos</i>	4/7 (57,1%)	0,41	0,3
<i>Adultos</i>	17/19 (89,4%)	- 0,2	0,2

NOTAS: TGO, aspartato aminotransferase; TGP, alanina aminotransferase; γGT, gama GT.

Como visto previamente, nossos dados mostraram que o tratamento da esquistossomose leva a uma redução da citocina IL-13, citocina bastante relacionada com danos hepáticos. Desse modo, correlacionamos IL-13 e IL-4, duas citocinas do tipo 2 envolvidas neste processo, com as enzimas TGO, TGP, γGT e ALP. Contudo, não foi encontrada nenhuma correlação entre as citocinas supracitadas e os marcadores hepáticos investigados.

Avaliação das citocinas produzidas em resposta ao dano ao epitélio – produção de alarminas

Alguns estudos já evidenciaram que certos eventos de sinalização são importantes na infecção crônica e tem uma relação direta com os desfechos observados (BINA e PRATA, 2003; MAGALHAES *et al.*, 2004; VENNERVALD *et al.*, 2004; ALVES OLIVEIRA *et al.*, 2006; LICONA-LIMON *et al.*, 2013). Isso provavelmente acontece porque as células epiteliais destas regiões acometidas possuem um mecanismo para sinalizar o dano tecidual, que envolve, dentre outros, a liberação de alarminas (MORO *et al.*, 2010; NEILL *et al.*, 2010; MJOSBERG *et al.*, 2011; GENTEK *et al.*, 2013; TANRIVER e DIEFENBACH, 2014). Com o intuito de avaliar a produção destas alarminas nos indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, este estudo também investigou a produção das principais citocinas envolvidas nestes eventos: IL-33 e TSLP.

Em relação ao TSLP, as observações deste estudo mostraram que, a exemplo do que foi demonstrado para IL-13, o tratamento da esquistossomose também reduz a produção desta citocina (361,9 [946,5] *versus* 208,6 [857,7], $p= 0,03$). Esse achado reforça a hipótese de que TSLP também está envolvida na resposta desenvolvida contra o *Schistosoma*. De maneira semelhante, a produção de TSLP continua a reduzir após o tratamento no D180, apesar de não ser estatisticamente significativa (361,9 [946,5] *versus* 183,4 [711,9], $p= 0,07$) (Figura 5). Apesar de TSLP possuir uma relação direta com o dano às células do epitélio e a presença do parasito estar associada a isso, não foi possível encontrar uma correlação entre TSLP e a carga parasitária observada. Além disso, a alarmina IL-33 não apresentou níveis detectáveis.

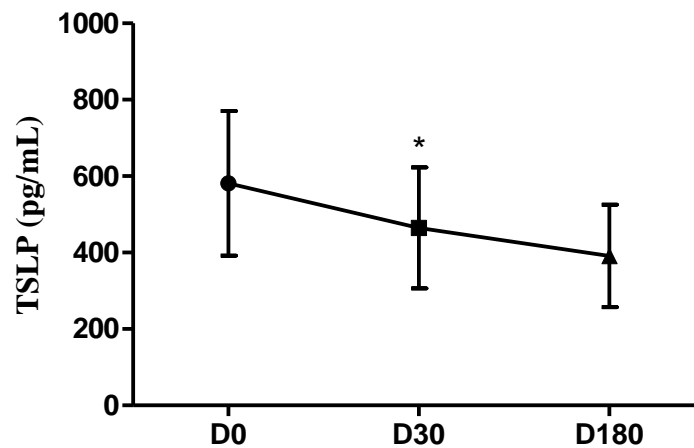


Figura 5. Avaliação do perfil sérico TSLP de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* antes e após o tratamento com praziquantel. O gráfico ilustra a produção sérica da citocina TSLP por indivíduos com esquistossomose mansônica. Os indivíduos participantes do estudo foram avaliados em três momentos distintos: anteriormente ao tratamento (D0), 30 dias após o tratamento e 180 dias após o tratamento (D180). Os valores de concentração de TSLP foram obtidos após dosagens realizadas pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando kit DuoSet (R&D Systems). Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil. As comparações entre os diferentes pontos foram feitas com o teste de Wilcoxon.

Discussão

Apesar de diversos estudos mostrarem que melhores condições sociais e estruturais podem contribuir para a erradicação de vários problemas de saúde, ainda se nota que nos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, existe uma grande presença dessas enfermidades. A situação de pobreza vista nesses locais está intrinsecamente relacionada com a ocorrência das doenças tropicais negligenciadas (DTNs) (WHO, 2004). Apesar disso, países tropicais como o Brasil, vivenciam um cenário em que estas doenças ainda configuram como problemas de saúde pública muito frequentes como, por exemplo, a doença de chagas, dengue, leishmaniose e a esquistossomose mansônica (MARTINS-MELO *et al.*, 2018).

Neste trabalho, foi possível observar que ainda existem populações em situações de extrema dificuldade de acesso à serviços básicos, como o saneamento e água encanada. Sobre isso, mostramos neste estudo que 93,9% dos participantes utilizavam às águas dos rios ou lagoas para suas atividades básicas. Essa é uma das principais condições no entendimento dos fatores determinantes para o envolvimento do homem em ciclos parasitários silvestres.

Em relação ao *Schistosoma mansoni*, uma das principais DTNs, foi observada uma prevalência de infecção de 59%, uma situação que demanda a intervenção imediata com tratamento de toda a população, a fim de se reduzir a ocorrência de formas mais graves e se diminuir a prevalência, além de se abreviar a expansão geográfica da doença. A ocorrência da esquistossomose mansônica na Bahia nestes números é preocupante, uma vez que o estado configura um dos que apresentam a doença de maneira endêmica, juntamente com Alagoas, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (SAÚDE, 2014). Essa situação pode ser um indício de que as políticas públicas precisam ter maior capilaridade e estarem acompanhadas de medidas educacionais nas regiões mais carentes. Apesar de haver inquéritos coproscópicos recentes, como o do INPEG (2018) mostrando que os números de infectados pelo *Schistosoma* tem diminuído, estes números levam em conta macrorregiões, o que pode tornar a sua análise tendenciosa (KATZ, 2018). Por outro lado, quando os dados são olhados do ponto de vista das áreas endêmicas, podemos observar que existem estados com municípios endêmicos com números que variam de 2,41% a 68,18%. Neste inquérito, 14 estados foram considerados endêmicos e ainda existem regiões, sobretudo no norte e nordeste, que carecem de atenção e ações para uma redução destes números.

Uma das principais complicações da infecção pelo *Schistosoma* refere-se ao dano hepático. Os nossos dados mostraram que as enzimas hepáticas TGO e TGP apresentaram importantes alterações do ponto de vista clínico. Vale salientar que TGO e TGP estão

localizadas dentro dos hepatócitos e, portanto, servem como referência para avaliar o dano hepático à nível celular. No presente estudo evidenciamos a existência deste tipo de alteração na esquistossomose. Isso pode ser notado quando analisamos o coeficiente de Ritis, usado para investigar a ocorrência de lesões crônicas e mais profundas. Esse foi um dos resultados que mais se destacou, pois, como já mencionado, alguns estudos mostram que 5 a 10% dos indivíduos com envolvimento intestinal e hepatoesplênico podem desenvolver fibrose hepática e hipertensão portal, com sério risco de vida no caso de hematêmese (BINA e PRATA, 2003; VENNERVALD *et al.*, 2004). O dado do coeficiente de Ritis sugerindo que 98,5% dos participantes podem apresentar lesões crônicas a nível hepático, se torna ainda mais preocupante quando o analisamos em conjunto com o elevado número de infectados (59%). O coeficiente de Ritis pode estar abaixo de 1,0 em algumas lesões agudas no fígado, como nas hepatites B e C. Entretanto, valores acima de 1,0, como observado em 98,5% dos indivíduos investigados neste estudo, são característicos de lesões crônicas, principalmente quando estas já estão em curso de fibrose ou cirrose (WILLIAMS e HOOFNAGLE, 1988; POHL *et al.*, 2001). É possível que nestas regiões os indivíduos estejam em constantes ciclos de reinfecção e transmissão do parasito, além de possivelmente estarem com importante comprometimento do sistema hepático.

Enquanto TGO e TGP, permitem avaliar o dano hepático a nível de hepatócitos, as elevações nas concentrações das enzimas γ GT e ALP, estão relacionadas com dano na região dos ductos biliares. No que se refere ao γ GT, encontramos elevações realmente importantes e que se fizeram presentes em todos os grupos de faixa etária e gênero. Dentre esses grupos avaliados, o gênero pareceu apresentar maior notoriedade. Interessantemente, as elevações do γ GT no gênero masculino apresentou correlação com a carga parasitária observada nestes indivíduos. Estas observações podem ser justificadas pelo fato de o gênero masculino apresentar altos valores de carga parasitária. A existência de uma associação entre γ GT e carga parasitária sugere uma forte relação com processos inflamatórios nos ductos biliares. Semelhantemente, ALP, relacionada com obstrução em ductos biliares, apresentou elevações em todas as faixas etárias, mas com predominância nos adultos (89,4%). Esses processos envolvendo γ GT e ALP podem ser um importante fator na colestase, condição na qual ocorre uma interrupção do fluxo da bile do fígado para o intestino. A colestase pode estar associada tanto com cálculo, quanto tumores (POPPER e SCHAFFNER, 1970). Contudo, na esquistossomose a colestase está mais relacionada com a deposição de ovos nos ductos biliares. A despeito de não serem utilizadas como marcadores de prognóstico na esquistossomose, essas

enzimas da função hepática têm grande valia na determinação de dano celular hepático como mostrado por POPPER e SCHAFFNER (1970) e FONTANA e LOK (2002).

Estudos clássicos já mostraram que o advento de uma resposta imune do tipo 2 na esquistossomose é determinante para o desenvolvimento e a manutenção de uma infecção crônica (GRZYCH *et al.*, 1991; PEARCE *et al.*, 1991). Durante essa resposta imune do tipo 2, diversas citocinas atuam na tentativa de contribuir para a eliminação do parasito e resolução da infecção, como IL-4 e IL-13, por exemplo. Entretanto, uma resposta crônica, com eventos inflamatórios importantes, como o granuloma, são os principais responsáveis pelas lesões celulares causadas e potencialmente levando à fibrose hepática (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; HOFFMANN *et al.*, 2002; CHIARAMONTE *et al.*, 2003; WYNN, 2003). Os resultados desse estudo mostraram que o tratamento da esquistossomose leva a uma importante redução da produção de IL-13 nos indivíduos infectados. Essa diminuição já pode ser observada com 30 dias após o tratamento, todavia, a maior redução se dá com 180 dias, momento da última avaliação imunológica realizada. Essas observações contribuem para hipótese de que IL-13 pode estar associada aos danos hepáticos causados pela resposta inflamatória.

Outros estudos envolvendo esquistossomose mansônica humana no Brasil também contribuem para o entendimento das hipóteses de uma associação entre IL-13 e a imunopatologia da doença. DE SOUZA RDA *et al.* (2012) sugerem que esta citocina está mais elevada no soro dos indivíduos infectados na fase pré-fibrótica, já que os infectados sem fibrose apresentam maiores concentrações de IL-13 em comparação com aqueles em graus mais avançados. No entanto, não foi observada nenhuma diferença na produção de IL-13 entre os graus “inicial” e “moderado à grave”. Neste mesmo estudo, os autores ainda discutem que esta observação pode estar relacionada ao fato de IL-13 servir como uma indutora dos processos fibróticos e, portanto, estaria mais elevada nos momentos iniciais da fibrose (RIBEIRO DE JESUS *et al.*, 2000; DE MORAIS *et al.*, 2002; SILVA-TEIXEIRA *et al.*, 2004). Apesar disso, esta observação de que as concentrações séricas de IL-13 não aumentam de acordo com a gravidade da fibrose corroboram os dados de um estudo previamente realizado por BRANDT *et al.* (2010), no qual não foi possível observar diferenças dessa citocina nos diferentes estágios de fibrose em pacientes hepatoesplênicos.

Contudo, outros estudos mostram uma associação entre a produção de IL-13 por células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e o grau de fibrose em indivíduos com esquistossomose (MAGALHAES *et al.*, 2004; ALVES OLIVEIRA *et al.*, 2006). Essas aparentes divergências, nos dados envolvendo estudos com amostras de soro e PBMC de

indivíduos com esquistossomose, não discordam sobre a potencial participação danosa que IL-13 pode ter na doença. Ademais, observa-se que no presente estudo pudemos mostrar uma diminuição significativa desta citocina em indivíduos infectados após o tratamento. Ressalta-se ainda que outros estudos podem melhor explorar as concentrações dessa citocina tanto em sobrenadantes de PBMC, quanto em soro de pacientes infectados após o tratamento da doença.

O fato de IL-13 não estar correlacionada com os aumentos nas concentrações séricas dos marcadores hepáticos (TGO, TGP, γ GT e ALP), pode ser entendido como a não existência de uma relação direta entre essas variáveis, principalmente por que IL-13 tem papéis mais relacionados à sinalização com células do sistema imunológico. Em um modelo experimental realizado por CHIARAMONTE *et al.* (1999) foi demonstrado que inibidores de IL-13 conseguem controlar o desenvolvimento de fibrose nos camundongos C57BL/6. Neste mesmo estudo, também foi observado que os animais IL-13^{-/-} apresentaram uma menor mortalidade, sugerindo que IL-13 é fundamental na forma crônica da esquistossomose. As outras citocinas do tipo 2 estudadas (IL-4 e IL-10) não apresentaram alterações significantes após o tratamento.

Em relação as citocinas do tipo 1, esperava-se encontrar uma elevação no pós-tratamento, principalmente IFN- γ , contudo, isso não foi observado. Em um estudo realizado por SHER *et al.* (1991), o bloqueio de IL-10 com anticorpos monoclonais levou a um aumento na produção de IFN- γ em culturas de esplenócitos de animais infectados. Esse achado pode explicar o fato de não termos observado alterações do IFN- γ , uma vez que o tratamento não levou a uma redução nas concentrações séricas de IL-10.

Os dados mostrados neste estudo envolvendo citocinas do tipo 2 e enzimas hepáticas, de certo modo, corroboram outras observações que evidenciaram que a infecção pelo *Schistosoma* induz ao dano tecidual (BINA e PRATA, 2003; VENNERVALD *et al.*, 2004). Como mencionado, o desenvolvimento de uma resposta protetora surge com o intuito de controlar a infecção. No entanto, por se tratar de uma infecção crônica, a longa duração dessa resposta pode contribuir para estas agressões. Nesse sentido, neste estudo também investigamos a liberação de alarminas em resposta a estes danos constantemente causados ao tecido. Estudos prévios já demonstraram que a infecção percutânea por cercarias do *S. mansoni* leva a uma produção transitória das citocinas TSLP e IL-33. Apesar de não ter havido uma demonstração direta, essas citocinas provavelmente ativam as ILC2 residentes nesses locais (BOURKE *et al.*, 2015).

Os nossos resultados confirmaram a nossa hipótese de que os eventos danosos mencionados podem induzir a liberação destas citocinas, sobretudo TSLP. A observação de que o tratamento da esquistossomose reduz a produção de TSLP com 30 dias após o tratamento,

sugere que esta citocina pode participar da resposta contra o *Schistosoma* realizando principalmente a comunicação com células da resposta imune. Alguns estudos já mostraram que TSLP quando liberado nestas situações leva a produção da citocina IL-13 pelas recém descobertas células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) (HALIM *et al.*, 2012; OCHIAI *et al.*, 2018). Esta citocina atua de maneira sinérgica com a prostaglandina D₂, estimulando a produção de citocinas como IL-13 pelas ILC2 (BARTEMES *et al.*, 2014). As ILC2 são células que ao serem estimuladas pelas alarminas liberam citocinas do tipo 2, como IL-4 e IL13 (DIEFENBACH *et al.*, 2014; HAZENBERG e SPITS, 2014). Como vimos neste estudo, o que foi observado sobre IL-13 pode ter uma importância clínica muito importante. Desse modo, estes resultados apontam um papel para TSLP como também sendo uma assinatura da infecção pelo *S. mansoni*, provavelmente estimulando algumas células do sistema imune, como as ILC2, a produzirem mais IL-13 na tentativa de controlar a infecção pelo *S. mansoni*.

Em suma, este estudo foi pioneiro em mostrar que o tratamento da esquistossomose, em indivíduos infectados e residentes de uma área endêmica, promove uma redução da citocina TSLP, uma das citocinas envolvidas nos processos de tentativa de manutenção da homeostase tecidual. Além disso, os dados deste estudo também mostram que a maior parte dos indivíduos participantes do estudo demonstraram um quadro sugestivo de lesões crônicas a nível hepático. Adicionalmente, a diminuição de IL-13 após o tratamento sugere que esta citocina provavelmente está associada com os processos imunopatológico observados na doença, uma vez que a relação desta citocina e fibrose já foi demonstrada na literatura.

Referências

- ALVES OLIVEIRA, L. F. *et al.* Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. **Infect Immun**, v. 74, n. 2, p. 1215-21, Feb 2006.
- ARAÚJO, M. I. *et al.* Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. **J Infect Dis**, v. 190, n. 10, p. 1797-803, Nov 15 2004.
- BARTEMES, K. R. *et al.* Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 134, n. 3, p. 671-678 e4, Sep 2014.
- BINA, J. C.; PRATA, A. [Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarandi: I- Schistosoma mansoni infection and severe clinical forms]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 2, p. 211-6, Mar-Apr 2003.
- BOOTH, M. *et al.* Micro-geographical variation in exposure to Schistosoma mansoni and malaria, and exacerbation of splenomegaly in Kenyan school-aged children. **BMC Infect Dis**, v. 4, p. 13, May 17 2004.
- BOTROS, M.; SIKARIS, K. A. The de Ritis ratio: the test of time. **Clin Biochem Rev**, v. 34, n. 3, p. 117-30, Nov 2013.
- BOURKE, C. D. *et al.* Epidermal keratinocytes initiate wound healing and pro-inflammatory immune responses following percutaneous schistosome infection. **Int J Parasitol**, v. 45, n. 4, p. 215-24, Mar 2015.
- BRANDT, C. T. *et al.* Evaluation of the cytokines IL-10 and IL-13 as mediators in the progression of Symmers fibrosis in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Rev Col Bras Cir**, v. 37, n. 5, p. 333-7, Oct 2010.
- CHEEVER, A. W.; HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol Today**, v. 21, n. 9, p. 465-6, Sep 2000.
- CHEVILLARD, C. *et al.* IFN-gamma polymorphisms (IFN-gamma +2109 and IFN-gamma +3810) are associated with severe hepatic fibrosis in human hepatic schistosomiasis (Schistosoma mansoni). **J Immunol**, v. 171, n. 10, p. 5596-601, Nov 15 2003.
- CHIARAMONTE, M. G. *et al.* An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. **J Clin Invest**, v. 104, n. 6, p. 777-85, Sep 1999.
- CHIARAMONTE, M. G. *et al.* Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. **J Exp Med**, v. 197, n. 6, p. 687-701, Mar 17 2003.
- DE MORAIS, C. N. *et al.* Studies on the production and regulation of interleukin, IL-13, IL-4 and interferon-gamma in human Schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97 Suppl 1, p. 113-4, 2002.

- DE SOUZA RDA, P. *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. 394981, 2012.
- DIEFENBACH, A.; COLONNA, M.; KOYASU, S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. **Immunity**, v. 41, n. 3, p. 354-65, Sep 18 2014.
- EVERTS, B. *et al.* Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. **J Exp Med**, v. 209, n. 10, p. 1753-67, S1, Sep 24 2012.
- FALLON, P. G. *et al.* Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **J Immunol**, v. 164, n. 5, p. 2585-91, Mar 1 2000.
- FERNANDES, J. S. *et al.* Monocyte subsets in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 703653, 2014.
- FONTANA, R. J.; LOK, A. S. Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S57-64, Nov 2002.
- GENTEK, R. *et al.* Modulation of Signal Strength Switches Notch from an Inducer of T Cells to an Inducer of ILC2. **Front Immunol**, v. 4, p. 334, 2013.
- GOMES CASAVECHIA, M. T. *et al.* Systematic review and meta-analysis on *Schistosoma mansoni* infection prevalence, and associated risk factors in Brazil. **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1000-1014, Jul 2018.
- GRANT, A. V. *et al.* Functional polymorphisms in IL13 are protective against high *Schistosoma mansoni* infection intensity in a Brazilian population. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35863, 2012.
- GRZYCH, J. M. *et al.* Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v. 146, n. 4, p. 1322-7, Feb 15 1991.
- HALIM, T. Y. *et al.* Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 451-63, Mar 23 2012.
- HAMS, E. *et al.* Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. **J Immunol**, v. 191, n. 11, p. 5349-53, Dec 1 2013.
- HATZ, C. F. The use of ultrasound in schistosomiasis. **Adv Parasitol**, v. 48, p. 225-84, 2001.
- HAZENBERG, M. D.; SPITS, H. Human innate lymphoid cells. **Blood**, v. 124, n. 5, p. 700-9, Jul 31 2014.
- HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A.; DUNNE, D. W. Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. **Adv Parasitol**, v. 52, p. 265-307, 2002.

HOPKINS, D. R. *et al.* Dracunculiasis, onchocerciasis, schistosomiasis, and trachoma. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1136, p. 45-52, 2008.

JACKSON, D. J. *et al.* IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 190, n. 12, p. 1373-82, Dec 15 2014.

KABATEREINE, N. B. *et al.* Epidemiology and morbidity of *Schistosoma mansoni* infection in a fishing community along Lake Albert in Uganda. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 98, n. 12, p. 711-8, Dec 2004.

KAMAL, S. M. *et al.* Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cell responses in HCV and *Schistosoma mansoni* coinfection: relation to progression of liver fibrosis. **J Infect Dis**, v. 189, n. 7, p. 1140-50, Apr 1 2004.

KATZ, N. **Inquérito nacional de prevalência da esquistossomose mansoni e geo-helminthos.** FIOCRUZ, C.-. Belo Horizonte: 90 p. 2018.

KING, C. H. *et al.* Low heritable component of risk for infection intensity and infection-associated disease in urinary schistosomiasis among Wadigo village populations in Coast Province, Kenya. **Am J Trop Med Hyg**, v. 70, n. 1, p. 57-62, Jan 2004.

KRUSCHEWSKY, R. A. *et al.* Immunological Profile in Individuals with Schistosomal Myeloradiculopathy. **Neuroimmunomodulation**, v. 23, n. 3, p. 157-167, 2016.

KUNTZ, R. E. Biology of the schistosome complexes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 4, n. 3, p. 383-413, May 1955.

LA FLAMME, A. C. *et al.* IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. **J Immunol**, v. 166, n. 3, p. 1903-11, Feb 1 2001.

LICONA-LIMON, P. *et al.* TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. **Nat Immunol**, v. 14, n. 6, p. 536-42, Jun 2013.

MAGALHAES, A. *et al.* Cytokine profile associated with human chronic schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 21-6, 2004.

MARTINS-MELO, F. R. *et al.* The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 6, p. e0006559, Jun 2018.

MCHEDLIDZE, T. *et al.* Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 357-71, Aug 22 2013.

MCSORLEY, H. J. *et al.* Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. **Mucosal Immunol**, v. 7, n. 5, p. 1068-78, Sep 2014.

MJOSBERG, J. M. *et al.* Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. **Nat Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1055-62, Nov 2011.

MORO, K. *et al.* Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 540-4, Jan 28 2010.

NEILL, D. R. *et al.* Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1367-70, Apr 29 2010.

NOVATO-SILVA, E.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D. G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XVIII. Immunologic status of pregnant women and their neonates. **Scand J Immunol**, v. 35, n. 4, p. 429-37, Apr 1992.

OCHIAI, S. *et al.* Thymic stromal lymphopoietin drives the development of IL-13(+) Th2 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 5, p. 1033-1038, Jan 30 2018.

OLIPHANT, C. J. *et al.* MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. **Immunity**, v. 41, n. 2, p. 283-95, Aug 21 2014.

OLIVEIRA, R. R. *et al.* Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 2, p. 296-305, Feb 2012.

OLVEDA, D. U.; MCMANUS, D. P.; ROSS, A. G. Mass drug administration and the global control of schistosomiasis: successes, limitations and clinical outcomes. **Curr Opin Infect Dis**, v. 29, n. 6, p. 595-608, Dec 2016.

PATTON, E. A. *et al.* Central role for interleukin-4 in regulating nitric oxide-mediated inhibition of T-cell proliferation and gamma interferon production in schistosomiasis. **Infect Immun**, v. 70, n. 1, p. 177-84, Jan 2002.

PEARCE, E. J. *et al.* Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J Exp Med**, v. 173, n. 1, p. 159-66, Jan 1 1991.

PEREIRA, L. M. *et al.* Specific liver autoreactivity in schistosomiasis mansoni. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 91, n. 3, p. 310-4, May-Jun 1997.

POHL, A. *et al.* Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. **Am J Gastroenterol**, v. 96, n. 11, p. 3142-6, Nov 2001.

POPPER, H.; SCHAFFNER, F. Pathophysiology of cholestasis. **Hum Pathol**, v. 1, n. 1, p. 1-24, Mar 1970.

PRICE, A. E. *et al.* Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 25, p. 11489-94, Jun 22 2010.

RIBEIRO DE JESUS, A. *et al.* Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2797-803, May 2000.

ROSS, A. G. *et al.* Schistosomiasis. **N Engl J Med**, v. 346, n. 16, p. 1212-20, Apr 18 2002.

SAÚDE, M. D. **Vigilância da esquistossomose mansoni - diretrizes técnicas.** TRANSMISSÍVEIS, D. D. V. D. D. Brasília: 140 p. 2014.

_____. **Guia de vigilância em saúde.** Brasília. Volume único 2017.

SHER, A. *et al.* Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. **J Immunol**, v. 147, n. 8, p. 2713-6, Oct 15 1991.

SILVA-TEIXEIRA, D. N. *et al.* Gender-related cytokine patterns in sera of schistosomiasis patients with Symmers' fibrosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 3, p. 627-30, May 2004.

STEINMANN, P. *et al.* Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 7, p. 411-25, Jul 2006.

TANRIVER, Y.; DIEFENBACH, A. Transcription factors controlling development and function of innate lymphoid cells. **Int Immunol**, v. 26, n. 3, p. 119-28, Mar 2014.

TURNER, J. E. *et al.* IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. **J Exp Med**, v. 210, n. 13, p. 2951-65, Dec 16 2013.

VENNERVALD, B. J. *et al.* Detailed clinical and ultrasound examination of children and adolescents in a *Schistosoma mansoni* endemic area in Kenya: hepatosplenic disease in the absence of portal fibrosis. **Trop Med Int Health**, v. 9, n. 4, p. 461-70, Apr 2004.

WALKER, A. J. Insights into the functional biology of schistosomes. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 203, Oct 20 2011.

WHO. **Diseases of poverty and the 10/90 gap:** World Health Organization: 3-12 p. 2004.

_____. Status of schistosomiasis endemic countries: 2016. Map and Statistics 2016. Disponível em: < http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html >. Acesso em: nov. 2019.

_____. Schistosomiasis. World Health Organization, 2019 2019. Disponível em: < <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis> >. Acesso em: nov. 2019.

WILLIAMS, A. L.; HOOFNAGLE, J. H. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 95, n. 3, p. 734-9, Sep 1988.

WYNN, T. A. IL-13 effector functions. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 425-56, 2003.

5.2 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO 2

No presente capítulo, será apresentado o manuscrito 2, intitulado “Elevada expressão do receptor CRTH2 e altos níveis da produção da citocina IL-13 por ILC2 de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*”. A documentação prévia na literatura que aponta para um papel das ILC2 em determinadas doenças que cursam com uma resposta imune do tipo 2, a exemplo da asma e algumas doenças causadas por patógenos, tornou necessária uma maior investigação sobre estas células em outras condições. Nas doenças causadas por helmintos, como na infecção por *Schistosoma* e filárias, evidências apontam que as células ILC2 de animais infectados apresentam uma grande concentração local destas células e o aumento da sua concentração está associado aos processos fibróticos. Além disso, diversos estudos também mostram que as ILC2 são importantes fontes das citocinas do tipo 2, citocinas produzidas em resposta às alarminas. Apesar de haver uma evidente importância das ILC2 nas infecções por helmintos, ainda existe uma lacuna sobre o real papel destas células na infecção pelo *Schistosoma* em humanos. Assim, este manuscrito apresentado teve como objetivo avaliar a frequência de ILC2 em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* e controles saudáveis. Em adição, também avaliamos o perfil de citocinas (IL-2; IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN- γ e TNF) produzidas por ILC2 de indivíduos com esquistossomose mansônica humana e controles saudáveis.

MANUSCRITO 2: Elevada expressão do receptor CRTH2 e altos níveis da produção da citocina IL-13 por ILC2 de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*.

Autores: Michael Nascimento Macedo^{1,2}, Yuri Tabajara^{1,2}, Thairone Moura², Thainá Fialho², Thassila Nogueira Pitanga³, Dalila Zanette³, Marilda de Souza Gonçalves³, Ricardo Riccio Oliveira^{1,2}

¹ Programa de Pós-Graduação em Patologia Humana, Universidade Federal da Bahia, Brasil,

² Laboratório de Patologia Experimental, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, Brasil.

³ Laboratório de Investigação em Genética e Hematologia Translacional, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, Brasil.

Resumo

INTRODUÇÃO: A esquistossomose é uma doença causada por parasitos do gênero *Schistosoma*. Esta doença está presente em diversos países e é considerada uma doença tropical negligenciada, principalmente associada a condições de pobreza. A infecção aguda pelo *S. mansoni* inicia uma resposta imune do tipo 1 direcionada ao verme. Entretanto, com o início da oviposição, esta resposta dá lugar à uma predominante resposta tipo 2, com a produção de citocinas como IL-13, que contribuem para a eliminação do parasito. Contudo, esse perfil de resposta, a longo prazo, contribui muito mais para os danos observados do que para a proteção do hospedeiro. Estudo recentes têm mostrado que as recém descobertas células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) estão especialmente envolvidas com a produção de citocinas do tipo 2 em diversas doenças que cursam com esse perfil de resposta, havendo também participação nos processos danosos, como a fibrose hepática. Apesar de ser sugestiva a participação destas células na imunopatologia da esquistossomose mansônica, poucos estudos foram realizados nesse sentido, sobretudo na infecção em humanos. **OBJETIVO:** O presente estudo teve o objetivo de avaliar a frequência de ILC2 em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* e controles saudáveis. Em adição, também se avaliou o perfil de citocinas (IL-2; IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN- γ e TNF) produzidas por ILC2 de indivíduos com esquistossomose mansônica humana e controles saudáveis. **MATERIAL E MÉTODOS:** A frequência de ILC2 foi avaliada por citometria de fluxo após a marcação com anticorpos para as moléculas de superfície que definem fenotipicamente esta população. Assim, a população de ILC2 foi definida como Lin⁻ CD127⁺ CRTH2⁺. Estas células foram ainda isoladas pelo método de *sorting* asséptico para a realização de culturas, suplementadas com um coquetel de citocinas (CCI) contendo as citocinas estimuladoras de ILC2 (IL-2, IL7, IL-25, IL-33 e TSLP) por 12 horas de cultura e, posteriormente, coleta de sobrenadante para a dosagem das citocinas produzidas pelas técnicas de ELISA (IL-9, IL-13 e IL-33) e CBA (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , e IL-17A). **RESULTADOS:** Os dados deste estudo mostraram que apesar de não haver uma diferença na frequência das ILC2 entre indivíduos infectados e controles saudáveis, os indivíduos com esquistossomose apresentam uma maior expressão do receptor CRTH2. Além disso, as ILC2 isoladas por *sorting* de indivíduos infectados, também produzem mais IL-13 em comparação com os controles. **CONCLUSÕES:** Este estudo foi pioneiro em mostrar que as ILC2 de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* são importantes fontes da citocina IL-13 no curso da infecção. Além disso, sugere-se que a maior produção desta citocina nos infectados esteja relacionada com a maior expressão do receptor CRTH2, receptor que se relaciona diretamente com a produção de IL-13, importante na imunopatologia da doença.

Palavras-chave: Esquistossomose mansoni, Células linfóides inatas do tipo 2, ILC2, CRTH2, IL-13, citocinas.

Abstract

INTRODUCTION: Schistosomiasis is caused by parasites of *Schistosoma* genus. This disease is distributed in many countries and is also considered a neglected tropical disease, mainly related with poverty conditions. The *S. mansoni* acute infection is characterized by the initiation of a type 1 immune response, directed to worm. However, the beginning of oviposition also initiates and switch the immune response for a predominant type 2 immune response, with the production of IL-13, which contribute to parasite elimination. Nevertheless, this immune response, at long term, has more contribution to the observed damages than to the host protection. Recent studies have shown that newly discovered group 2 innate lymphoid cells (ILC2) are especially involved with the production of type 2 cytokines in several diseases that have this response profile and participate in harmful processes such as liver fibrosis. Although the involvement of these cells in the immunopathology of schistosomiasis mansoni is suggestive, few studies were done, especially in human infection. **AIM:** The present study evaluates the frequency of ILC2 in *Schistosoma mansoni* infected individuals and healthy controls. In addition, this study also evaluates the cytokine profile (IL-2; IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17A, IFN- γ e TNF) produced by individuals with human schistosomiasis mansoni and healthy controls. **MATERIAL AND METHODS:** The frequency of ILC2 was evaluated by flow cytometry after antibody labeling of the surface markers which defines this population phenotype. Thus, ILC2 population was defined as Lin⁻ CD127⁺ CRTH2⁺. These cells were also isolated by the method of aseptic sorting for the cell culture, supplemented with a cytokines cocktail (CCI) containing ILC2 stimulating cytokines (IL-2, IL7, IL-25, IL-33 e TSLP) for 12 hours of culture and after, collect of supernante for dosage of produced cytokines by ELISA (IL-9, IL-13 e IL-33) and CBA (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , e IL-17A). **RESULTS:** The results show that although there is no difference in the frequency of ILC2 between infected individuals and healthy controls, *S. mansoni* infected individuals have more expression of CRTH2 receptor. Moreover, sorting isolated ILC2 from infected individuals also produce more IL-13 as compared to healthy controls. **CONCLUSIONS:** This study was pioneer in show that ILC2 from *S. mansoni* infected individuals are an important source of IL-13 cytokine during the disease course. Furthermore, we suggest that high levels of this cytokine are likely associated with the observed expression of CRTH2 receptor, which is related with IL-13 production, important in disease immunopathology.

Keywords: Schistosomiasis mansoni, Group 2 innate lymphoid cells, ILC2, CRTH2, IL-13, Cytokines.

Introdução

A esquistossomose é uma doença causada por parasitos do gênero *Schistosoma*. As espécies que causam infecção em humanos incluem o *Schistosoma haematobium*, *S. mansoni*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, e *S. mekongi*. Essa infecção apresenta uma ampla distribuição global, estando presente em 78 países (WHO, 2016; 2019). Atualmente acredita-se que existam cerca de 250 milhões de pessoas necessitando de tratamento e outras 800 milhões vivendo em áreas de risco de infecção (STEINMANN *et al.*, 2006; WHO, 2019). No Brasil, a doença é causada pelo *S. mansoni* e se distribui amplamente em todo o território nacional. Essa doença está bastante associada à situações de pobreza, na qual a precariedade de alguns serviços básicos, como o esgotamento sanitário e facilidade de acesso aos serviços de saúde, ainda não atingiram níveis satisfatórios (HOPKINS *et al.*, 2008; GOMES CASAVECHIA *et al.*, 2018).

A resposta imune na esquistossomose mansônica apresenta características que se associam ao estágio da infecção. Enquanto na fase aguda existe uma resposta imune do tipo 1 desenvolvida contra o parasito, na fase crônica essa resposta é substituída por uma resposta predominantemente tipo 2. Acredita-se que a resposta imune do tipo 2 se inicie em resposta aos antígenos presentes no ovo *Schistosoma* depositos após a sua transformação em vermes adultos (MONTENEGRO *et al.*, 1999; DE JESUS *et al.*, 2002; PEARCE, 2005). Consequentemente, os ovos depositados conseguem migrar para diversas regiões como intestino, baço, pulmão, ou sistema cérebro-espinhal. Após a sua migração para estes locais, os ovos induzem fortes reações inflamatórias, que são progressivamente substituídas por depósitos fibróticos devido à formação de granulomas e sucessivas tentativas de resolução (CHEEVER *et al.*, 2000). Classicamente, a resposta imune em indivíduos infectados residentes de áreas endêmicas é caracterizada pela produção das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 (ARAUJO *et al.*, 1996). Além disso, existem outras evidências que associam a citocina IL-13 a esses processos fibróticos na infecção crônica, sendo apontada como uma das principais envolvidas na fibrose hepática (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; LA FLAMME *et al.*, 2001; HOFFMANN *et al.*, 2002; PATTON *et al.*, 2002; CHIARAMONTE *et al.*, 2003; WYNN, 2003).

Durante essas respostas imunes desenvolvidas, diversas células participam, de diferentes formas, das tentativas de resolução da infecção e expulsão do verme. Apesar de vários desses personagens já serem conhecidos, ainda existem lacunas, principalmente sobre como ocorrem os principais eventos durante a infecção. Apesar do consenso de que as células T CD4⁺ são as principais produtoras destas citocinas do tipo 2, alguns estudos em outros

modelos de infecção, incluindo helmintíases, vem propondo que um outro grupo de células recém descobertas também participem auxiliando na produção de citocinas do tipo 2 e eliminação do verme. Em 2010, três grupos distintos descreveram que um grupo ainda desconhecido de células seriam capazes de produzir citocinas do tipo 2 em resposta às citocinas conhecidas como alarminas (IL-25, IL-33 e TSLP) (MORO *et al.*, 2010; NEILL *et al.*, 2010; PRICE *et al.*, 2010). Inicialmente, essas células foram denominadas por esses grupos como nuócitos (NEILL *et al.*, 2010), células auxiliaadoras naturais (MORO *et al.*, 2010), e células auxiliaadoras inatas do tipo 2 (PRICE *et al.*, 2010). Contudo, três anos depois SPITS *et al.* (2013) propuseram uma unificação para esse novo grupo de células, passando, então, a serem conhecidas como células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2). Além das ILC2, evidências de outros grupos de células linfoides inatas (ILCs) também foram documentadas. Atualmente, a família das é composta por ILC1, ILC2 e ILC3, e a exemplo do que foi descoberto para as ILC2, cada uma apresenta um perfil distinto de produção de citocinas. Enquanto as ILC2 produzem citocinas do tipo 2, as ILC1 e ILC3 produzem, respectivamente, citocinas dos tipos 1 e 17, e são importantes em diversas doenças (VOSSHENRICH *et al.*, 2006; TAKATORI *et al.*, 2009; KLOSE, C. S. N. *et al.*, 2014; ABT *et al.*, 2015). Considera-se que devido à sua localização privilegiada, principalmente nas superfícies epiteliais, as ILCs sejam uma das principais células a atuarem ativamente na manutenção e homeostase tecidual. Desse modo, a sua atuação se volta à uma defesa imediata à patógenos invasores auxiliando em respostas imunes direcionadas contra eles (KIM *et al.*, 2016; YUDANIN *et al.*, 2019).

Ao contrário dos linfócitos T e B, as ILC2 não apresentam receptores de reconhecimento de antígenos adaptativos (VIVIER *et al.*, 2011; BEZMAN *et al.*, 2012). Além disso, a sua estimulação se dá por meio do reconhecimento das citocinas liberadas por células epiteliais quando estão em situações de estresse, as alarminas IL-25, IL-33 e TSLP (MORO *et al.*, 2010; NEILL *et al.*, 2010; MJOSBERG *et al.*, 2011; GENTEK *et al.*, 2013; TANRIVER e DIEFENBACH, 2014). Interessantemente, as ILC2 são as ILCs mais bem estudadas até o momento, em parte pelo seu importante papel em algumas doenças, mas especialmente por serem as que apresentam a maior frequência em sangue periférico (0,01%-0,03%) (MJOSBERG *et al.*, 2011). As ILC2 se caracterizam fenotipicamente pela ausência de marcadores de linhagem celular (Lin⁺ [CD3, CD14, CD16, CD19 e CD56]) e pela expressão das moléculas de superfície CD127 (IL-7R), CD161 (receptor de lectina tipo C), e pela expressão do receptor quimioatraente de células Th2 (CRTH2) (MJOSBERG *et al.*, 2011). O CRTH2 é um receptor de prostaglandina D₂, que também pode ser ativado de maneira sinérgica com as citocinas IL-25 e IL-33. Apesar de também ser expresso por células Th2, apenas as

ILC2 dentre as ILCs apresentam o perfil de expressão dos receptores CD127 (presentes nas ILC1 e ILC3) e o CRTH2. Este último tem como função induzir a rápida produção de IL-5 e IL-13 em resposta as citocinas IL-25 e IL-33 (MJOSBERG *et al.*, 2011; XUE *et al.*, 2014). Adicionalmente, o TSLP também apresenta outras importante funções para as ILC2, principalmente contribuindo para o aumento da sobrevivência destas células (CAMELO *et al.*, 2017).

As evidências existentes sobre as ILC2 até o momento, a classificam como uma importante célula que atua na defesa contra infecções por diversos patógenos, mas também em doenças alérgicas, como na asma (TURNER *et al.*, 2013; BARTEMES *et al.*, 2014; JACKSON *et al.*, 2014; MCSORLEY *et al.*, 2014; OLIPHANT *et al.*, 2014). Nestes contextos, as ILC2 são a principal fonte inicial da citocina IL-13, sobretudo nas helmintíases. É oportuno considerar o importante papel que esta citocina tem na hiperplasia de células caliciformes, hipercontratilidade do músculo liso, produção de muco e eliminação de vermes (ZHAO *et al.*, 2003; MORO *et al.*, 2010; NEILL *et al.*, 2010; PRICE *et al.*, 2010; TURNER *et al.*, 2013; MOHAPATRA *et al.*, 2016). Apesar de ainda ser recente, e a maioria ser em modelos experimentais, os estudos com alguns tipos de helmintíases indicam que as ILC2 aumentam a sua frequência nos locais afetados pelos parasitos, como *Nippostrongylus brasiliensis* e *Heligmosomoides polygyrus* (FALLON *et al.*, 2006; NEILL *et al.*, 2010; GERBE *et al.*, 2016; HOWITT *et al.*, 2016). Ademais, estes parasitos induzem a liberação da citocina IL-25, que além de contribuírem para sua expansão, também são cruciais para a produção de IL-13 (FALLON *et al.*, 2006; HOWITT *et al.*, 2016). Além disso, em estudo realizado por OLIPHANT *et al.* (2014), as ILC2 se mostraram importantes na expulsão do *N. brasiliensis* do trato gastrointestinal de animais infectados. Esses dados prévios sugerem que provavelmente as ILC2 também estejam participando em outras situações que cursam com resposta imune do tipo 2, principalmente nas helmintíases.

A despeito de o papel das ILC2 na infecção pelo *Schistosoma* ser bem sugestivo, ainda existem poucos estudos apontando as suas principais funções na infecção em humanos. A exemplo do que fora observado em outras helmintíases, alguns modelos de infecção demonstram um aumento local da frequência das ILC2 após a infecção pelo *S. mansoni* (BOYD *et al.*, 2015). Em adição, outros trabalhos também puderam demonstrar que as ILC2 se expandem localmente após a infecção pelo *Schistosoma*, contudo, também foi documentado que essa expansão está associada à fibrose no pulmão e no fígado (HAMS *et al.*, 2013; MCHEDLIDZE *et al.*, 2013). MCHEDLIDZE *et al.* (2013) ao avaliarem a fibrose hepática

neste experimento constataram que a ausência do receptor de IL-33 foi eficiente na supressão dos eventos fibróticos, fatos que implicam as ILC2 nesse processo.

Apesar dessas relações entre ILC2 e fibrose terem sido demonstradas nos modelos murinos, essa relação ainda não pôde ser mais bem avaliada em humanos. Não obstante, em um trabalho com crianças infectadas desenvolvido por NAUSCH *et al.* (2015), o tratamento da esquistossomose promoveu o aumento da frequência de ILC2 (CD45⁺CD127⁺CD294⁺CD161⁺) no sangue periférico, sugerindo que elas podem estar mais localizadas nos tecidos durante a infecção do que na periferia. Mesmo assim, mais estudos ainda se fazem necessários principalmente para o entendimento sobre como essas ILC2 se comportam em indivíduos que vivem em áreas endêmicas para a infecção. Além disso, mesmo que os estudos tenham avançado nos últimos anos, mostrando as ILC2 no contexto da esquistossomose, o seu papel na infecção em humanos ainda precisa ser melhor investigado, uma vez que esse verme se hospeda no sistema porta, e que a oviposição induz uma constante lesão das células epiteliais, com provável liberação de TSLP e IL-33. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a frequência de ILC2 e expressão de marcadores de superfície em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* e avaliar o perfil de citocinas produzidas por estas células isoladas por *sorting*. Acredita-se que as ILC2 de indivíduos infectados apresentem um perfil de produção de citocinas do tipo 2 que contribui para a imunopatologia da doença e que estão comprometidas com esse perfil.

Metodologia

População estudada

O presente estudo constitui um corte transversal, no qual a população estudada residia em uma região que compreende os vilarejos de Camarões, Jenipapo e Buri. Esta região está situada a 150 km ao litoral norte de Salvador, Bahia, Brasil. Devido a localização privilegiada, associado a fatores históricos e sociais, a região tem como principais atividades econômicas, o turismo, a cultura do côco e a pecuária. No entanto, a população local ainda sofre com problemas de ordem social e estrutural, como o a falta de saneamento básico e a dificuldade de acesso à alguns serviços básicos, como água e energia elétrica, apesar de terem alcançado algumas melhorias significativas nos últimos anos. Este conjunto de fatores faz com que parte da população utilize dos rios e lagos locais para os afazeres domésticos e para a pesca, que muitas vezes é a única fonte de renda de algumas famílias. O envolvimento acidental do homem em ciclos parasitários silvestres possui uma forte associação com os fatores supracitados, o que torna evidente a necessidade de estudos que auxiliem a conhecer as condições de vida desta população. Estudos prévios realizados pelo nosso grupo nestas comunidades evidenciaram uma frequência consideravelmente elevada de infecção pelo *Schistosoma mansoni* (ARAUJO *et al.*, 2004).

O presente estudo recrutou, através de uma abordagem por conveniência, 22 indivíduos residentes nestas regiões e 6 controles saudáveis (não-expostos). Os indivíduos recrutados tiveram a infecção pelo *S. mansoni* confirmada pelo método Kato-Katz e foram pareados com os controles em relação à idade e gênero para uma melhor avaliação. Desse modo, após a confirmação do parasitológico de fezes e de algumas exigências técnicas quanto aos experimentos com ILC2, foram incluídos 8 indivíduos no grupo de infectados pelo *S. mansoni*.

Enriquecimento da população de ILC2

A população de ILC2 apresenta uma frequência consideravelmente baixa no sangue periférico, o que impossibilitaria o seu isolamento para análise das suas funções e cultura sem um método de enriquecimento (MJOSBERG *et al.*, 2011). Sendo assim, realizamos um método de enriquecimento no qual foram depletadas células que expressavam marcadores de linhagem celular (Lin^+ [CD3, CD14, CD16, CD19 e CD56]), marcadores não expressos pelas ILC2. Este método garante um ganho de até 50% da população de ILC2 presente nas culturas (BOYD *et al.*, 2014). Para a depleção das células de linhagem, utilizamos o kit EasySep FITC Positive Selection Kit (BD Bioscience), que contém anticorpos anti-CD3, CD14, CD16, CD19 e CD56, todos conjugados ao fluorocromo FITC (MJOSBERG *et al.*, 2011). A realização desse método mostrou-se muito eficiente, uma vez que pudemos aumentar em cerca de 8 vezes a frequência de ILC2, o que tornou a sua cultura viável (MANUSCRITO 3).

Sorting de ILC2

As células destinadas à cultura precisam passar previamente pelo processo de enriquecimento celular mencionado no item anterior. Somente com essa estratégia será possível atingir uma quantidade satisfatória de isolado para as culturas. Os isolamentos por *sorting* deste estudo foram realizados no equipamento de citometria de fluxo FACS Aria II, com um conjunto de estratégias para otimizar o isolamento, reduzir a ocorrência de *doublets* e aumentar a viabilidade das células para uso posterior (MANUSCRITO 3).

Algumas estratégias anteriores à análise no citômetro e no momento da aquisição podem contribuir para esses procedimentos prévios que visam essa otimização. Após a depleção das células Lin^+ , as suspensões de células devem ser transferidas para tubos Falcon® (fundo em “U”) com sistema de filtro na tampa (Stem Cell Technologies, YVR, CAN) para a redução dos agregados. Apesar de ser uma estratégia eficiente, os agregados ainda podem ser notados, a depender das condições do experimento. Desse modo, no momento da análise por citometria, foram selecionadas apenas as *single cells*, excluindo, assim, a ocorrência de *doublets* (MANUSCRITO 3). Sendo assim, as células ILC2 foram sorteadas através de uma estratégia de análise que exclui os *doublets* e as células Lin^- e seleciona as células que co-expressam as moléculas CD127 e CRTH2.

Após a realização do *sorting*, as células devem ser recepcionadas em tubos apropriados recobertos com SFB (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) contendo meio RPMI suplementado

com 20% de SFB. Para assegurar uma viabilidade maior, recomenda-se que estas suspensões de células estejam sob refrigeração constante até o momento da cultura.

Cultura de ILC2

As ILC2 isoladas por *sorting* foram quantificadas (hemocitômetro) e tiveram a sua viabilidade considerada (81,1%) para o momento da cultura utilizando-se o corante Trypan Blue 0,4% (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Após a quantificação, as ILC2 foram distribuídas em placas de 96 poços (fundo em “U”) em uma média de 1×10^3 - 1×10^4 células por poço. Estas culturas foram incubadas por 12 horas a 37° C, com 5% de CO₂. O meio de cultura foi ainda suplementado com citocinas estimuladoras de ILC2 (CCI) contendo IL-25, IL-33, IL-7, TSLP (10 ng/ml cada) e IL-2 (10 U/ml) (BARTEMES *et al.*, 2014; BOYD *et al.*, 2014). Esta suplementação é essencial para mimetizar condições semelhantes às dos tecidos onde estas células são encontradas. Após o período de incubação, os sobrenadantes destas culturas foram colhidos e armazenados para dosagem posterior das moléculas de interesse. De maneira geral, os procedimentos realizados para o enriquecimento de ILC2 combinadas com as separações realizadas por *sorting*, representaram um aumento de 102 vezes na frequência das células ILC2 em relação ao que era observada anteriormente ao procedimento (MANUSCRITO 3).

Avaliação da produção de citocinas por ILC2

Os sobrenadantes de cultura de ILC2 coletados foram utilizados para a dosagem de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17. As citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A foram avaliados pelo método de CBA (*Cytometric Bead Array*) (BD Biosciences, CA, USA). As dosagens das citocinas não contempladas no kit Th1/Th2/Th17 foi realizada por ELISA sanduíche, utilizando os kits DuoSet (R&D Systems), IL-13 e IL33, enquanto IL-9 foi avaliada através do kit Platinum (eBioscience). Após a obtenção dos valores brutos dados pelas técnicas de CBA (MFI) e ELISA (DO), foram realizadas análises estatísticas para a obtenção dos valores de concentração em pg (picograma).

Análises estatísticas

As variáveis obtidas foram analisadas quanto à sua normalidade, utilizando o teste de normalidade de D'Agostino e Pearson. Desse modo, os dados foram analisados levando-se em consideração se são ou não paramétricos e a natureza da análise. Para avaliar a associação entre variáveis de interesse, utilizou-se a correlação de Spearman, de acordo com a distribuição dos dados e tamanho da amostra. Sendo assim, as análises dos dados de citometria de fluxo foram analisados através do software FlowJo v10 (FlowJo, ASH, USA) e as análises estatísticas pelo GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Resultados

Avaliação da frequência de células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Foram selecionados 22 indivíduos residentes em uma área endêmica para a esquistossomose mansônica estudada pelo nosso grupo desde 2001 (Conde-BA), e 6 controles saudáveis, não residentes nesta região. Dentre os 22 indivíduos selecionados, 08 infectados foram recrutados após confirmação pelo método Kato-Katz e contemplação de algumas exigências técnicas quanto aos experimentos com ILC2. Os indivíduos recrutados no grupo controle foram pareados em relação à idade e gênero com o grupo de infectados para uma melhor avaliação. Uma tabela ilustrando as principais características epidemiológicas e clínicas de interesse da população estudada pode ser visualizada na tabela 1.

Como pode ser observado, o gênero masculino predominou na população estudada (6, masculino; 2, feminino). Os valores de carga parasitária encontrados apresentaram uma grande variação, o que é característico desta infecção (84 epg [234]) (Tabela 1). Apesar de a média de idade da população ser consideravelmente elevada (48 ± 14), não foi encontrada nenhuma associação entre a idade e os valores de carga parasitária encontrados no estudo ($r = -0,53$, $p = 0,17$).

Tabela 1. Aspectos epidemiológicos e clínicos dos indivíduos com esquistossomose

	Infectados <i>S. mansoni</i>	Controles saudáveis
Número	8	6
Idade (média, DP)	48 ± 14	33 ± 9
Gênero	6M; 2F	5M; 1F
Carga parasitária (mediana, AIQ)	84 epg (234)	-

NOTAS: DP, desvio-padrão; M, masculino; F, feminino; AIQ, amplitude interquartil.

As células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2), já tiveram a sua importância demonstrada na resposta imune do tipo 2 e proteção contra helmintíases e outras doenças que cursam com esse perfil imune (TURNER *et al.*, 2013; BARTEMES *et al.*, 2014; JACKSON *et al.*, 2014; MCSORLEY *et al.*, 2014; OLIPHANT *et al.*, 2014). Contudo, ainda existem lacunas no que diz respeito a participação destas células na infecção causada pelo *Schistosoma mansoni* em humanos.

Para avaliar a frequência destas células na população estudada, realizamos o isolamento de PBMC e, em seguida, as células que apresentavam marcadores de linhagem celular (CD3, CD14, CD16, CD19 e CD56) foram depletadas. Como as ILC2 não apresentam marcadores de linhagem, esperou-se uma pureza de cerca de 50% (BOYD *et al.*, 2014). Esse método permite que seja possível avaliarmos a frequência destas células e realizarmos o *sorting* asséptico das ILC2 para cultura. A definição fenotípica das ILC2 baseou-se no fato de que elas expressam CD127, assim como ILC1 e ILC3, mas apenas as ILC2 dentre as ILCs expressam a molécula CRTH2 na sua superfície. Desse modo, as ILC2 são definidas como células CD127⁺CRTH2⁺ (MJOSBERG *et al.*, 2011).

A frequência de ILC2, caracterizada por co-expressar CRTH2 e CD127, foi semelhante entre os grupos de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* e controles saudáveis (0,36% [0,52] *versus* 0,39% [0,89], $p = 0,82$) (Figura 1). Da mesma forma, a frequência de células linhagem negativas (Lin⁻) que expressam apenas CD127 (ILC1 ou ILC3) também foi semelhante entre os grupos estudados (6,8% [5,7] *versus* 5,6% [6,2], $p = 0,83$) (Figura 2E). Interessantemente, observamos ainda uma população de células que não expressam o CD127, mas expressam CRTH2, demonstrando um comprometimento com o perfil Th2. Esta população celular foi discretamente maior no grupo de infectados, quando comparado com os não infectados, apesar de não haver significância estatística (18,4% [24,6] *versus* 8,7% [17,5], $p = 0,08$) (Figura 2F). Além de os indivíduos com esquistossomose apresentarem uma maior frequência destas células, os valores de média da intensidade de fluorescência (MFI) mostram que as células ILC2 apresentam maior expressão do receptor CRTH2 (510,5 MFI [697,8] *versus* 187,5 [742,5], $p = 0,18$) (Figura 2F). Esses dados sugerem que as ILC2 de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* podem constituir uma importante fonte de IL-13 durante o curso da doença, visto que o CRTH2 é crucial para a produção de IL-13 por estas células.

A esquistossomose mansônica tem como uma das principais complicações o envolvimento de órgãos como intestino e a região hepatoesplênica. Diversos estudos têm relacionado o acometimento destes órgãos com resposta desenvolvida pelo hospedeiro em uma tentativa de eliminação do parasito. Estes estudos relacionam os danos ocasionados como

resultado da produção de anticorpos contra antígenos dos ovos do *S. mansoni*, que acontece sobretudo na fase crônica, e a produção de IL-13 (LA FLAMME *et al.*, 2001; PATTON *et al.*, 2002; CHIARAMONTE *et al.*, 2003). Apesar destas relações existirem, não encontramos nenhuma correlação entre a frequência de ILC2 (Figura 3A) ou de células expressando CRTH2⁺ (Figura 3B e 3C) e os valores de carga parasitária observados no estudo. Esses resultados sugerem que a frequência destas populações celulares no sangue periférico independe dos valores de carga parasitária apresentados pelos indivíduos infectados.

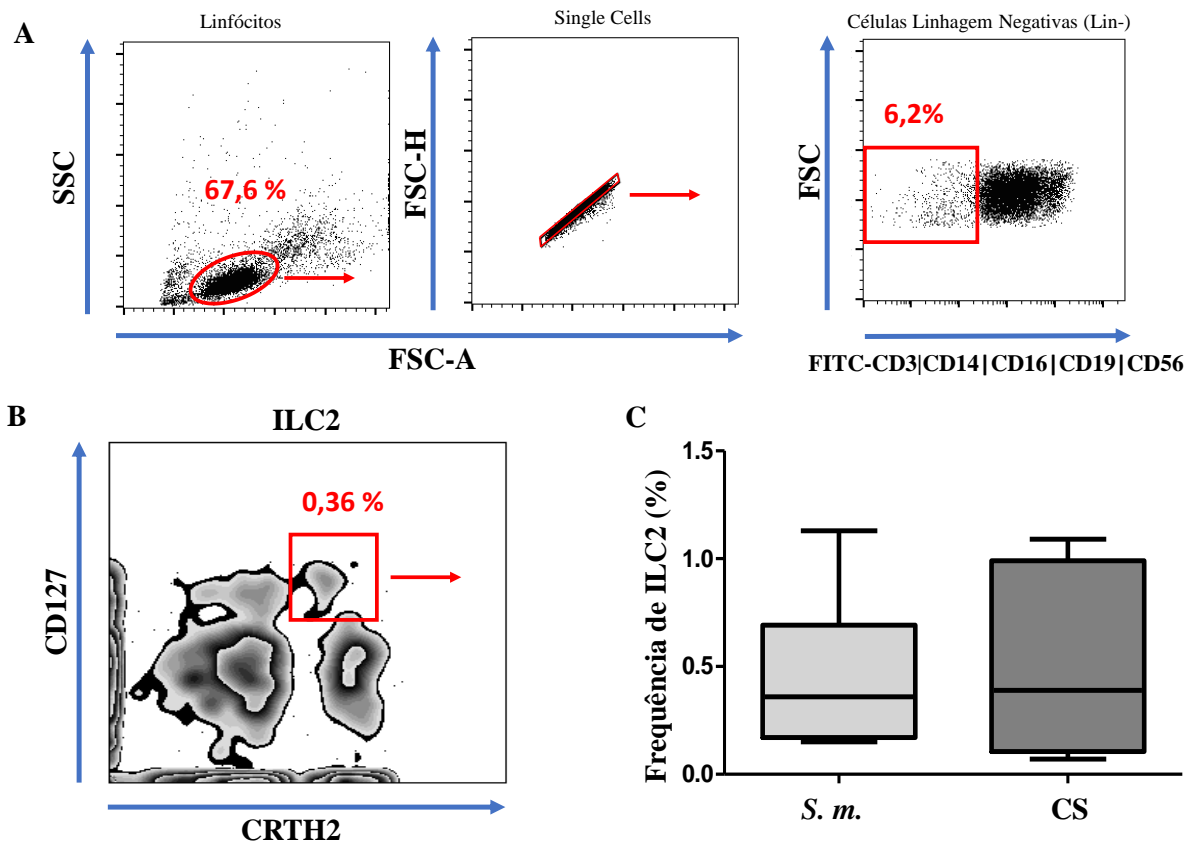


Figura 1. Avaliação da frequência de células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. PBMCs de indivíduos com esquistossomose mansônica foram purificadas para a depleção de células de linhagem (CD3, CD14, CD16, CD19 e CD56). Após o processo de enriquecimento das células em ILC2, foi realizada a análise da frequência de ILC2 por citometria de fluxo. Uma criteriosa estratégia de *gates* para assim selecionar apenas as células que co-expressavam os marcadores CD127 e CRTH2 foi utilizada. A figura A ilustra a estratégia utilizada com a seleção dos *gates* para que fossem analisadas apenas as células que apresentavam uma baixa expressão de marcadores de linhagem (Lin⁻). A figura B mostra a expressão de CD127 e CRTH2 e destaca as células que expressam estes dois marcadores (ILC2). Por sua vez, a figura C representa a comparação da frequência de ILC2 entre os grupos com esquistossomose (S.m.) e controles saudáveis (CS). Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil e a análise estatística entre os grupos foi realizada através do teste de Mann-Whitney.

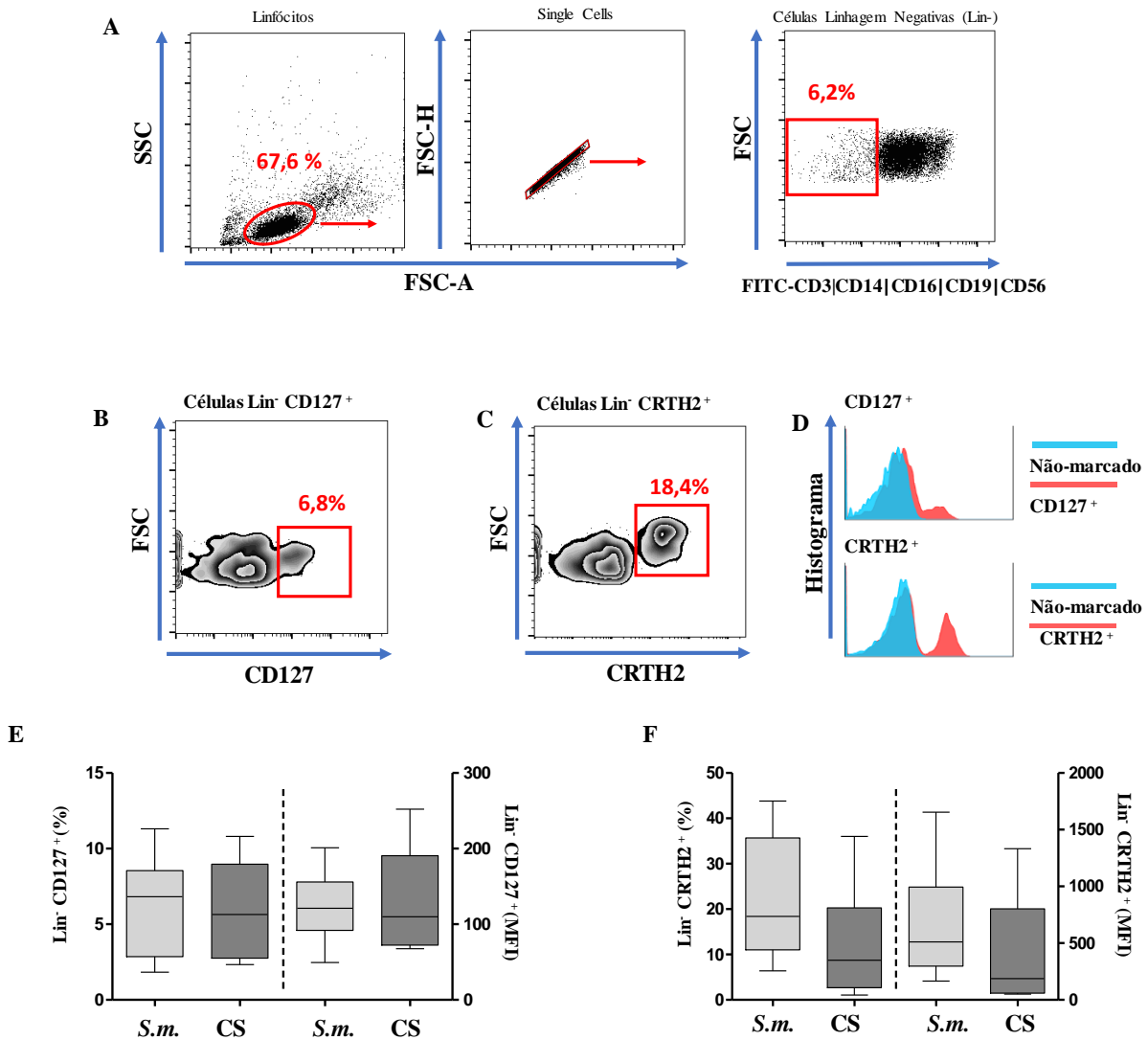


Figura 2. Avaliação da frequência das células CD127 e CRTH2 em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. PBMCs de indivíduos com esquistossomose mansônica sofreram um processo de purificação para a depleção de células de linhagem (CD3, CD14, CD16, CD19 e CD56). Após o processo de enriquecimento das células em ILC2, foi realizada a análise da frequência de ILC2 por citometria de fluxo. Uma criteriosa estratégia de *gates* para selecionar apenas as células que co-expressavam os marcadores CD127 e CRTH2 foi utilizada. A figura A ilustra a estratégia utilizada com a seleção dos *gates* para que fossem analisadas apenas as células que apresentavam uma baixa expressão de marcadores de linhagem (Lin⁻). A figura B mostra a expressão de CD127. Por sua vez, a figura C mostra a expressão de CRTH2. As figuras E e F representam a comparação da frequência e da média de intensidade de fluorescência (MFI) de CD127 e CRTH2 entre os grupos com esquistossomose (S.m.) e controles saudáveis (CS). Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil e a análise estatística entre os grupos foi realizada através do teste de Mann-Whitney.

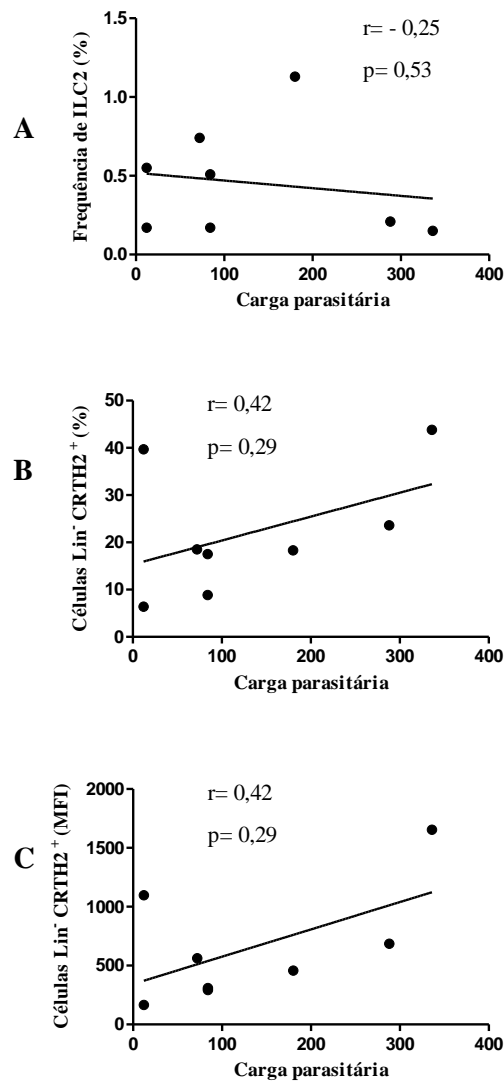


Figura 3. Correlação entre a frequência de ILC2 e de células expressando CRTH2⁺ e a carga parasitária de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. PBMCs de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* foram isoladas. Após o isolamento dos PBMCs estas células passaram por um processo no qual as células que expressavam marcadores de linhagem celular foram depletadas – enriquecimento celular da população de ILC2. As células obtidas foram analisadas por citometria de fluxo em relação à expressão dos marcadores que definem as ILC2 (CD127⁺ CRTH2⁺). Os valores de carga parasitária foram obtidos pelo método de Kato-Katz. A figura A ilustra a análise de correlação entre a frequência de ILC2 e a carga parasitária. As figuras B e C mostram a análise de correlação entre frequência de células expressando CRTH2 e a MFI, respectivamente. O valor de “r” representa o coeficiente de correlação de Spearman.

Avaliação da produção de citocinas por ILC2 de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Para avaliar o perfil de citocinas produzidas pelas ILC2 de indivíduos com esquistossomose, realizamos a cultura dessas células isoladas por sorting asséptico, como descrito no MANUSCRITO 3. Desse modo, foram sorteadas células que co-expressavam os marcadores CD127 e CRTH2, uma característica fenotípica das ILC2 (MANUSCRITO 3).

As células linfóides inatas do tipo 2 de indivíduos com esquistossomose mansônica ao serem estimuladas com CCI produziram uma menor quantidade de IL-4 do que os controles saudáveis (11,3 pg/mL [6,8] *versus* 24,7 pg/mL [50,5], $p=0,01$). Por outro lado, a produção da citocina IL-13 foi maior nos indivíduos com esquistossomose, quando comparados com os controles (38,4 pg/mL [25,2] *versus* 10,9 pg/mL [14,2], $p=0,02$) (Figura 4). Em contrapartida, as citocinas IL-9 e IL-10 não apresentaram concentrações detectáveis aos testes utilizados.

Os dados referentes à produção de citocinas deste estudo, juntamente com os dados sobre a expressão de marcadores de superfície estudados, mostram que os indivíduos com esquistossomose apresentam uma elevação na expressão da molécula CRTH2, um receptor de prostaglandina D2. Adicionalmente, as suas ILC2 também apresentaram uma destacada produção de IL-13, sugerindo que esse mecanismo pode contribuir para o que se observa em termos de patogênese na esquistossomose. Além disso, as citocinas do tipo 2 investigadas não apresentaram correlação com os valores de carga parasitária nestes indivíduos (Figura 5).

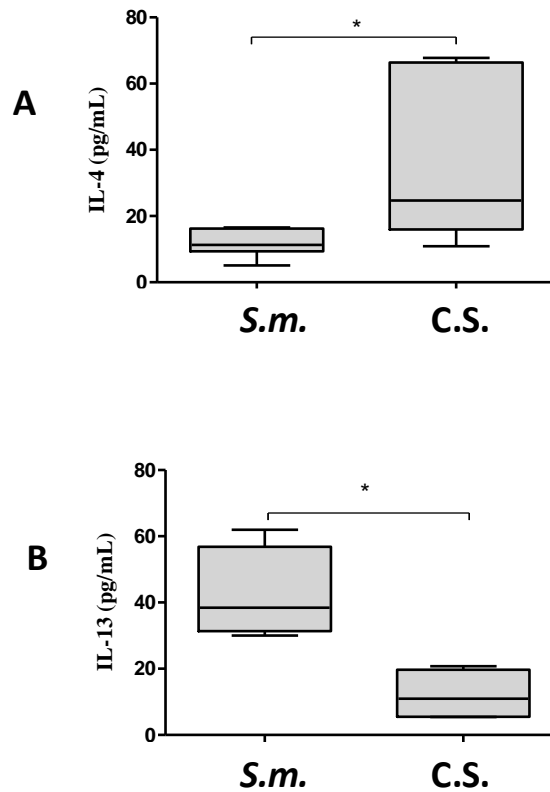


Figura 4. Avaliação do perfil Th2 de citocinas produzidas por ILC2 de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. Os gráficos A e B são representativos da produção das citocinas IL-4 e IL-13, respectivamente, em indivíduos com esquistossomose (*S.m.*) e controles saudáveis (CS). Após o sorting de ILC2, as células foram cultivadas na presença de CCI por 12 anos a fim de se avaliar a produção específica de citocinas por estas células. Os valores de concentração da citocina IL-4 foram obtidos após dosagens realizadas pela técnica de CBA (Cytometric Bead Array; BD) utilizando o kit Th1/Th2/Th17 (BD Bioscience). Em alternativa, a citocina IL-13 foi avaliada por ELISA sanduíche, utilizando kit DuoSet (R&D Systems). Todos os valores estão representados em mediana e amplitude interquartil. As comparações entre os diferentes grupos foram feitas com o teste de Mann-Whitney (* $p < 0,05$).

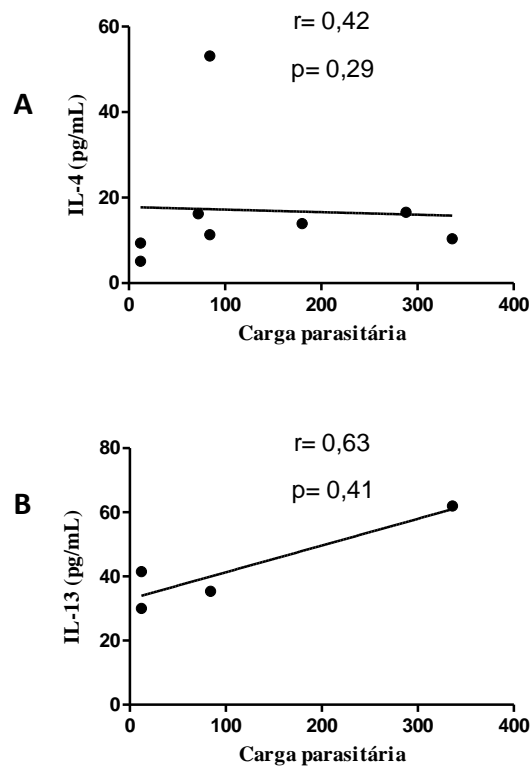


Figura 5. Correlação entre a produção de citocinas do tipo 2 por ILC2 de indivíduos com esquistossomose e a carga parasitária. Células linfóides inatas do tipo 2 foram isoladas pelo método de *sorting*. As células sorteadas foram cultivadas por 12 horas, estimuladas com um coquetel de citocinas (CCI) estimuladoras de ILC2. Após as culturas os sobrenadantes foram coletados e as citocinas produzidas avaliadas. Os valores de carga parasitária foram obtidos pelo método de Kato-Katz. As figuras A e B ilustram as análises de correlação entre a produção de IL-4 e IL-13 por ILC2 e a carga parasitária, respectivamente. O valor de “r” representa o coeficiente de correlação de Spearman.

Discussão

Os indivíduos com esquistossomose mansônica humana caracterizam-se por terem uma resposta imune do tipo 2 relacionada com a infecção. Estudos apontam que esta resposta a longo prazo acaba por levar a danos teciduais nos órgãos envolvidos com a infecção, incluindo a região intestinal e hepatoesplênica. Isso se dá pelo fato de existir um constante processo de formação e resolução de granuloma, com consequentes danos (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; HOFFMANN *et al.*, 2002; WYNN, 2003). Além disso, os ovos depositados pelo parasito, que são constantemente associados com a patogênese da doença, conseguem resistir aos mecanismos de defesa desenvolvidos. Durante esse importante processo de exposição aos ovos do parasito, que se inicia durante a oviposição, as células epiteliais provavelmente participam liberando citocinas conhecidas como alarminas – IL-33, IL-25, TSLP. Esta sinalização, que é realizada por meio das alarminas, indica que há algum tipo de agressão às células do epitélio (NATHAN, 2002; OPPENHEIM e YANG, 2005; BIANCHI, 2007; CHEN e NUNEZ, 2010). A partir daí, uma série de eventos são desencadeados na tentativa de conter os agentes agressores. Estudos recentes já mostraram que as células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) – uma das principais fontes de citocinas do tipo 2 em modelos de doenças que cursam com essa resposta - participam dessa tentativa de expulsão de patógenos (BOYD *et al.*, 2014; OLIPHANT *et al.*, 2014).

Desde que foram descobertas, as ILC2 sempre foram referenciadas como uma das principais células na defesa de diversos tecidos à infecções parasitárias ou resposta à alérgenos, produzindo, sobretudo, citocinas do tipo 2 em resposta às alarminas epiteliais (NEILL *et al.*, 2010; PRICE *et al.*, 2010). A partir de então, diversos estudos sobre doenças que envolvem a participação de uma resposta imune do tipo 2 foram desenvolvidos para se conhecer o envolvimento destas células nessas condições. Alguns estudos têm demonstrado que estas células estão envolvidas com a resposta imune do tipo 2 e patogênese de algumas doenças inflamatórias das vias aéreas, como asma e rinite, por exemplo (DOHERTY *et al.*, 2014; DHARIWAL *et al.*, 2017; KATO, 2019). Na asma, condição crônica que cursa com uma resposta imune do tipo 2, já foi demonstrado que as ILC2 são uma das principais fontes de citocinas do tipo 2 (KLEIN WOLTERINK *et al.*, 2012). Em geral, esses estudos sempre mostram as ILC2 como importantes personagens da imunidade inata. Nesse cenário, as ILC2 atuam como uma fonte muito rápida de citocinas do tipo 2 e são essenciais na comunicação com diversas células imunes (CHANG *et al.*, 2011; NUSSBAUM *et al.*, 2013).

No entanto, em relação às doenças que envolvem a participação de parasitos, ainda existem poucos estudos elucidando o papel destas células, sendo a maioria deles experimentais. Em um desses estudos, OLIPHANT *et al.* (2014) evidenciaram que as ILC2 são essenciais para a comunicação com células Th2 e contribuem para a eliminação do helminto *Nippostrongylus brasiliensis*, através da produção de citocinas do tipo 2. Adicionalmente, um outro estudo envolvendo helmintíases demonstrou que os indivíduos infectados por filária apresentavam maior frequência de ILCs cKIT+ (ILC2 ou ILC3) no sangue periférico, em comparação aos não infectados (BOYD *et al.*, 2014).

Não obstante, ainda existe uma lacuna sobre a participação dessas células em algumas parasitoses, como na esquistossomose, uma das principais doenças tropicais negligenciadas (DTNs), que sabidamente cursa com uma resposta com o mesmo perfil imune Th2. Dentre os poucos trabalhos realizados, podemos destacar um modelo experimental realizado por BOURKE *et al.* (2015), no qual foi mostrado que a infecção percutânea por cercárias do *S. mansoni* leva a uma produção transitória de TSLP e IL-33. Em outro estudo, realizado em escolares do Zimbábue, foi verificado que o tratamento curativo do *Schistosoma haematobium* consegue restaurar a frequência das ILC2s circulantes nestes pacientes (NAUSCH *et al.*, 2015). Apesar desse resultado ser sugestivo que as ILC2 possam estar mais localizadas nos tecidos durante a infecção, esses resultados poderiam ser mais bem compreendidos se houvesse um grupo de indivíduos não infectados para que fosse possível estabelecer uma melhor associação entre esse aumento na frequência das ILC2 com o tratamento. Contudo, ainda existe uma carência de estudos envolvendo as ILC2 e a infecção pelo *S. mansoni* em humanos para um melhor entendimento das características imunológicas e como elas participam na patogênese da doença.

Desse modo, o presente estudo foi pioneiro em mostrar a frequência das ILC2 circulantes de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, bem como isolar e estudar o seu perfil imune nesses indivíduos. Neste estudo, pudemos evidenciar que não existe diferença na frequência das ILC2 circulantes de indivíduos infectados, quando comparado com os controles. Todavia, as ILC2 do grupo dos indivíduos infectados apresentam uma maior frequência do receptor CRTH2, um receptor associado à produção da citocina IL-13, como demonstrado por BARNIG *et al.* (2013). Apesar dessa diferença não ser estatisticamente significativa, os percentuais de expressão desse receptor e as MIFs apresentadas se mostraram bastante diferentes. Provavelmente, a alta variabilidade desses dados possa justificar a não ocorrência dessa inferência. Entretanto, as MIFs, que traduzem o quanto cada célula expressou aquela molécula, ajudam a reforçar ainda mais essa diferença existente entre os grupos avaliados.

O receptor CRTH2 é uma molécula homóloga do receptor quimioatraente de células Th2 que possui como ligante a prostaglandina D₂ (PGD₂). Classicamente, esse receptor é expresso por células Th2 e sua função está relacionada à quimiotaxia de leucócitos na mediação de respostas alérgicas, como eosinófilos, basófilos e células Th2 (OGUMA *et al.*, 2008). Alguns estudos mostram que agonistas desse receptor induzem o aumento da mobilidade e degranulação, e aumento da expressão de moléculas de adesão em eosinófilos e basófilos (HIRAI *et al.*, 2001; MONNERET *et al.*, 2001; YOSHIMURA-UCHIYAMA *et al.*, 2004). Além disso, o CRTH2 também induz a produção de citocinas do tipo 2, incluindo IL-4, IL-5 e IL-13 (TANAKA *et al.*, 2004). Apesar de, outrora, ter sido considerado um receptor exclusivo de células Th2, eosinófilos e basófilos, o CRTH2 também passou a ser descrito em um grupo de células não-T e não-B, que tinham a capacidade de produzir citocinas do tipo 2 em resposta aos danos epiteliais de uma maneira antígeno-independente (NAGATA *et al.*, 1999; COSMI *et al.*, 2000; SHIRASAKI *et al.*, 2009; MJOSBERG *et al.*, 2011). Especialmente na esquistossomose, o receptor CRTH2 merece uma atenção especial, pois algumas evidências também mostram que tanto cercárias, quanto os ovos do *S. mansoni* são capazes de produzir PGD₂ (HERVE *et al.*, 2003; GIERA *et al.*, 2018). Esses dados sugerem que, em um momento inicial, PGD₂ das cercárias, pode impedir que o hospedeiro consiga montar uma resposta protetora. Adicionalmente, a PGD₂ derivada do ovo, pode ter um importante papel na imunopatologia, sobretudo induzindo ILC2 a produzir IL-13 via CRTH2.

Atualmente, sabe-se que essas células são as células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) e a importância desse receptor nas suas funções apresenta grande relevância em diversas situações clínicas (JANDL e HEINEMANN, 2017). Contudo, a maior parte dos estudos que interpolam ILC2 e o receptor CRTH2 ainda são de caráter alérgico/inflamatório - principalmente nos problemas envolvendo alergias e doenças das vias aéreas. Esses estudos foram os que ajudaram a entender que o acúmulo de células Th2 nos pulmões e o desenvolvimento de uma resposta imune do tipo 2 é dependente da via PGD₂-CRTH2 (WOJNO *et al.*, 2015). Posteriormente, Jiang e colaboradores (2019) descreveram em dois elegantes trabalhos sobre doença obstrutiva crônica (DPOC), que os pacientes com esta condição apresentavam altas concentrações de IL-33 no soro e uma elevada frequência de ILC2. Segundo as observações de Jiang e colaboradores, esses níveis de IL-33 estão relacionados a um aumento da proliferação das células ILC2, bem como a produção de citocinas do tipo 2 por elas. Além disso, as ILC2 desses indivíduos têm a capacidade de induzir uma mudança das células T CD4 para o polo Th2. Esses estudos evidenciam o comprometimento das ILC2 com a resposta imune do tipo 2, principalmente por meio do seu receptor CRTH2 que tem uma intrínseca relação com

a liberação de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 (JIANG, LIU, *et al.*, 2019; JIANG, TAO, *et al.*, 2019).

Como mencionado anteriormente, os danos sofridos pelas células epiteliais estimulam a liberação de alarminas (TSLP, IL-25 e IL-33) (LICONA-LIMON *et al.*, 2013). Desse modo, as ILC2 funcionam como células vigilantes que atuam prontamente em resposta a esses danos liberando citocinas do tipo 2. A infecção pelo *Schistosoma* caracteriza-se por uma fase aguda, com a presença de citocinas inflamatórias do tipo 1 (NEILL *et al.*, 2010; PRICE *et al.*, 2010). Todavia, após a sexta semana de infecção o verme adulto inicia a oviposição, liberando ovos que migram para diversos tecidos. Adicionalmente, esse momento da infecção possui grande relevância, pois após entrar em contato com os antígenos do ovo do parasito, as células do hospedeiro iniciam uma transição para uma resposta imune do tipo 2, que contribui muito mais para a cronicidade da doença e dano ao tecido envolvido. O desenvolvimento de uma resposta imune do tipo 2 surge com o intuito de se combater os ovos do *Schistosoma*, mas essa resposta de forma crônica, como a que pode ser observada em indivíduos cronicamente expostos em áreas endêmicas, parece contribuir muito mais para a patogênese da infecção e sobrevivência do parasito (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; HOFFMANN *et al.*, 2002; CHIARAMONTE *et al.*, 2003; WYNN, 2003).

O perfil da resposta imune do tipo 2 relatada na infecção pelo *Schistosoma mansoni* envolve principalmente a liberação de IL-4 e IL-13. Essas citocinas objetivam contribuir para a eliminação do parasito, mas o que se observa é uma evolução para uma forma crônica (GRZYCH *et al.*, 1991; PEARCE *et al.*, 1991). Um dos eventos mais interessantes em relação à resposta montada pelo hospedeiro para a eliminação do *Schistosoma* é a formação do granuloma, mas essa tentativa, quando induzida inúmeras vezes em um contexto de doença crônica com potencial lesão ao tecido, e a ocorrência de fibrose em um dos principais órgãos afetados, o fígado (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; HOFFMANN *et al.*, 2002; CHIARAMONTE *et al.*, 2003; WYNN, 2003). Neste estudo, encontramos que as ILC2 de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* produzem mais IL-13 do que os controle saudáveis. Esse achado, de certa maneira, confirma os achados da literatura em que doenças que cronicamente cursam com uma resposta imune do tipo 2 também apresentam elevada produção de IL-13. Possivelmente, as ILC2 podem migrar para os tecidos envolvidos, causando os danos mencionados, uma vez que a liberação de IL-13 nesses locais induz o desenvolvimento de fibrose. A propósito, CHIARAMONTE *et al.* (1999) conseguiram mostrar que inibidores de IL-13 controla o desenvolvimento de fibrose nos camundongos C57BL/6 infectados pelo

Schistosoma. Essa intervenção também resultou em uma menor mortalidade, sugerindo que IL-13 também pode ter um papel na sobrevivência desses animais.

Neste estudo, IL-4 esteve com maior concentração em sobrenadantes de ILC2 dos indivíduos controles. Apesar de alguns estudos mostrarem que a produção de IL-4 por ILC2 é necessária para que células TCD4⁺ assumam um perfil Th2 em algumas helmintíases, como na infecção por *H. polygyrus* (PELLY *et al.*, 2016), observamos, neste estudo, um discreto perfil produtor de IL-4 por ILC2 de indivíduos infectados pelo *S. mansoni*, uma vez que, de maneira inesperada, as ILC dos controles apresentaram uma maior produção dessa citocina. Como os indivíduos infectados já passaram por um processo de exposição aos antígenos do *Schistosoma* e, possivelmente, indução de uma resposta Th2, também é possível que estes indivíduos estejam passando por processos regulatórios exercidos pelo parasito. Alguns estudos já demonstraram que após o tratamento da esquistossomose, existe um aumento da resposta imune do tipo 2 (GROGAN *et al.*, 1998), o que pode explicar o fato de termos visto uma menor produção de IL-4 por ILC2 de indivíduos infectados.

O tratamento da esquistossomose baseia-se na utilização de um antiparasitário, praziquantel, em uma dose única. Em áreas endêmicas de esquistossomose, esse tratamento tem o objetivo de reduzir surgimento de formas graves da doença, prevalência de infecção, risco de expansão geográfica e adotar medidas de controle em tempo oportuno (SAÚDE, 2017). Porém, o tratamento tem um mecanismo de ação direcionado apenas ao parasito, interferindo na sua capacidade de aderir aos tecidos do hospedeiro. Por ser uma doença que também possui um caráter imune, alguns artifícios poderiam ser oportunamente lançados como adjuvantes no tratamento. No modelo de infecção por *Nippostrongylus brasiliensis* desenvolvido por (HUANG *et al.*, 2016), a depleção de células que expressavam o receptor CRTH2 (eosinófilos, basófilos e ILC2), por meio de anticorpos anti-hCRTH2, resultou em uma eliminação específica dos eosinófilos, basófilos e ILC2 dos tecidos onde esse parasito se expande. Em outro modelo de infecção por helmintos, também com *N. brasiliensis*, os animais deficientes do receptor CRTH2 apresentam ILC2 menos responsivas e com menor poder inflamatório. Entretanto, quando ILC2 que expressam CRTH2 são transplantadas para esses animais, a capacidade inflamatória é restaurada nesses animais (WOJNO *et al.*, 2015). Além disso, o tratamento com inibidores de CRTH2 também vem sendo avaliado com bastante cautela em pacientes com asma grave, devido à comprovada associação entre as frequências de CRTH2 com os piores desfechos clínicos (ROYER *et al.*, 2007; PETTIPHER *et al.*, 2012; SCHMIDT *et al.*, 2013; STINSON *et al.*, 2015). Alternativamente a esses inibidores, outros estudos envolvendo

principalmente doenças alérgicas, tem mostrado que os ligantes dos toll like receptors 7/8/9 levam a produção de IFN- γ , que culmina na supressão das ILC2.

Destaca-se que, sobretudo, o caráter pioneiro do estudo em mostrar que as ILC2 de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* são importantes fontes da citocina IL-13 durante a infecção. Além disso, esse dado se torna ainda mais evidente quando o grupo de infectados também é o que apresenta uma maior expressão do receptor CRTH2, um receptor que se relaciona diretamente com a produção de IL-13, importante na imunopatologia da doença.

Referências

- ABT, M. C. *et al.* Innate Immune Defenses Mediated by Two ILC Subsets Are Critical for Protection against Acute *Clostridium difficile* Infection. **Cell Host Microbe**, v. 18, n. 1, p. 27-37, Jul 8 2015.
- ARAÚJO, M. I. *et al.* Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 6, p. 1399-403, Jun 1996.
- ARAÚJO, M. I. *et al.* Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. **J Infect Dis**, v. 190, n. 10, p. 1797-803, Nov 15 2004.
- BARNIG, C. *et al.* Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 174, p. 174ra26, Feb 27 2013.
- BARTEMES, K. R. *et al.* Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 134, n. 3, p. 671-678 e4, Sep 2014.
- BEZMAN, N. A. *et al.* Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells. **Nat Immunol**, v. 13, n. 10, p. 1000-9, Oct 2012.
- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J Leukoc Biol**, v. 81, n. 1, p. 1-5, Jan 2007.
- BOURKE, C. D. *et al.* Epidermal keratinocytes initiate wound healing and pro-inflammatory immune responses following percutaneous schistosome infection. **Int J Parasitol**, v. 45, n. 4, p. 215-24, Mar 2015.
- BOYD, A. *et al.* Pleural cavity type 2 innate lymphoid cells precede Th2 expansion in murine *Litomosoides sigmodontis* infection. **Exp Parasitol**, v. 159, p. 118-26, Dec 2015.
- BOYD, A.; RIBEIRO, J. M.; NUTMAN, T. B. Human CD117 (cKit)⁺ innate lymphoid cells have a discrete transcriptional profile at homeostasis and are expanded during filarial infection. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108649, 2014.
- CAMELO, A. *et al.* IL-33, IL-25, and TSLP induce a distinct phenotypic and activation profile in human type 2 innate lymphoid cells. **Blood Adv**, v. 1, n. 10, p. 577-589, Apr 11 2017.
- CHANG, Y. J. *et al.* Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. **Nat Immunol**, v. 12, n. 7, p. 631-8, May 29 2011.
- CHEEVER, A. W.; HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis *mansoni* in mice and men. **Immunol Today**, v. 21, n. 9, p. 465-6, Sep 2000.
- CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 12, p. 826-37, Dec 2010.
- CHIARAMONTE, M. G. *et al.* An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. **J Clin Invest**, v. 104, n. 6, p. 777-85, Sep 1999.

CHIARAMONTE, M. G. *et al.* Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. **J Exp Med**, v. 197, n. 6, p. 687-701, Mar 17 2003.

COSMI, L. *et al.* CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 10, p. 2972-9, Oct 2000.

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

DHARIWAL, J. *et al.* Mucosal Type 2 Innate Lymphoid Cells Are a Key Component of the Allergic Response to Aeroallergens. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 195, n. 12, p. 1586-1596, Jun 15 2017.

DOHERTY, T. A. *et al.* Allergen challenge in allergic rhinitis rapidly induces increased peripheral blood type 2 innate lymphoid cells that express CD84. **J Allergy Clin Immunol**, v. 133, n. 4, p. 1203-5, Apr 2014.

FALLON, P. G. *et al.* Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. **J Exp Med**, v. 203, n. 4, p. 1105-16, Apr 17 2006.

FALLON, P. G. *et al.* Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **J Immunol**, v. 164, n. 5, p. 2585-91, Mar 1 2000.

GENTEK, R. *et al.* Modulation of Signal Strength Switches Notch from an Inducer of T Cells to an Inducer of ILC2. **Front Immunol**, v. 4, p. 334, 2013.

GERBE, F. *et al.* Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. **Nature**, v. 529, n. 7585, p. 226-30, Jan 14 2016.

GIERA, M. *et al.* The Schistosoma mansoni lipidome: Leads for immunomodulation. **Anal Chim Acta**, v. 1037, p. 107-118, Dec 11 2018.

GOMES CASAVECHIA, M. T. *et al.* Systematic review and meta-analysis on Schistosoma mansoni infection prevalence, and associated risk factors in Brazil. **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1000-1014, Jul 2018.

GROGAN, J. L. *et al.* Antigen-specific proliferation and interferon-gamma and interleukin-5 production are down-regulated during Schistosoma haematobium infection. **J Infect Dis**, v. 177, n. 5, p. 1433-7, May 1998.

GRZYCH, J. M. *et al.* Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v. 146, n. 4, p. 1322-7, Feb 15 1991.

HAMS, E. *et al.* Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. **J Immunol**, v. 191, n. 11, p. 5349-53, Dec 1 2013.

HERVE, M. *et al.* Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 10, p. 2764-72, Oct 2003.

HIRAI, H. *et al.* Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. **J Exp Med**, v. 193, n. 2, p. 255-61, Jan 15 2001.

HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A.; DUNNE, D. W. Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. **Adv Parasitol**, v. 52, p. 265-307, 2002.

HOPKINS, D. R. *et al.* Dracunculiasis, onchocerciasis, schistosomiasis, and trachoma. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1136, p. 45-52, 2008.

HOWITT, M. R. *et al.* Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. **Science**, v. 351, n. 6279, p. 1329-33, Mar 18 2016.

HUANG, T. *et al.* Depletion of major pathogenic cells in asthma by targeting CRTh2. **JCI Insight**, v. 1, n. 7, p. e86689, May 19 2016.

JACKSON, D. J. *et al.* IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 190, n. 12, p. 1373-82, Dec 15 2014.

JANDL, K.; HEINEMANN, A. The therapeutic potential of CRTH2/DP2 beyond allergy and asthma. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 133, p. 42-48, Nov 2017.

JIANG, M. *et al.* ILC2s Induce Adaptive Th2-Type Immunity in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Mediators Inflamm**, v. 2019, p. 3140183, 2019.

JIANG, M. *et al.* Type 2 innate lymphoid cells participate in IL-33-stimulated Th2-associated immune response in chronic obstructive pulmonary disease. **Exp Ther Med**, v. 18, n. 4, p. 3109-3116, Oct 2019.

KATO, A. Group 2 Innate Lymphoid Cells in Airway Diseases. **Chest**, v. 156, n. 1, p. 141-149, Jul 2019.

KIM, C. H.; HASHIMOTO-HILL, S.; KIM, M. Migration and Tissue Tropism of Innate Lymphoid Cells. **Trends Immunol**, v. 37, n. 1, p. 68-79, Jan 2016.

KLEIN WOLTERINK, R. G. *et al.* Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 5, p. 1106-16, May 2012.

KLOSE, C. S. N. *et al.* Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. **Cell**, v. 157, n. 2, p. 340-356, Apr 10 2014.

LA FLAMME, A. C. *et al.* IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. **J Immunol**, v. 166, n. 3, p. 1903-11, Feb 1 2001.

LICONA-LIMON, P. *et al.* TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. **Nat Immunol**, v. 14, n. 6, p. 536-42, Jun 2013.

MCHEDLIDZE, T. *et al.* Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 357-71, Aug 22 2013.

MCSORLEY, H. J. *et al.* Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. **Mucosal Immunol**, v. 7, n. 5, p. 1068-78, Sep 2014.

MJOSBERG, J. M. *et al.* Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CRTH2 and CD161. **Nat Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1055-62, Sep 11 2011.

MOHAPATRA, A. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells utilize the IRF4-IL-9 module to coordinate epithelial cell maintenance of lung homeostasis. **Mucosal Immunol**, v. 9, n. 1, p. 275-86, Jan 2016.

MONNERET, G. *et al.* Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1942-8, Sep 15 2001.

MONTENEGRO, S. M. *et al.* Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis**, v. 179, n. 6, p. 1502-14, Jun 1999.

MORO, K. *et al.* Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 540-4, Jan 28 2010.

NAGATA, K. *et al.* CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s). **FEBS Lett**, v. 459, n. 2, p. 195-9, Oct 8 1999.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, Dec 19-26 2002.

NAUSCH, N. *et al.* Group 2 innate lymphoid cell proportions are diminished in young helminth infected children and restored by curative anti-helminthic treatment. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. e0003627, Mar 2015.

NEILL, D. R. *et al.* Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1367-70, Apr 29 2010.

NUSSBAUM, J. C. *et al.* Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. **Nature**, v. 502, n. 7470, p. 245-8, Oct 10 2013.

OGUMA, T.; ASANO, K.; ISHIZAKA, A. Role of prostaglandin D(2) and its receptors in the pathophysiology of asthma. **Allergol Int**, v. 57, n. 4, p. 307-12, Dec 2008.

OLIPHANT, C. J. *et al.* MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. **Immunity**, v. 41, n. 2, p. 283-95, Aug 21 2014.

OPPENHEIM, J. J.; YANG, D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, p. 359-65, Aug 2005.

PATTON, E. A. *et al.* Central role for interleukin-4 in regulating nitric oxide-mediated inhibition of T-cell proliferation and gamma interferon production in schistosomiasis. **Infect Immun**, v. 70, n. 1, p. 177-84, Jan 2002.

PEARCE, E. J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite Immunol**, v. 27, n. 7-8, p. 265-70, Jul-Aug 2005.

PEARCE, E. J. *et al.* Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J Exp Med**, v. 173, n. 1, p. 159-66, Jan 1 1991.

PELLY, V. S. *et al.* IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. **Mucosal Immunol**, v. 9, n. 6, p. 1407-1417, Nov 2016.

PETTIPHER, R. *et al.* Pharmacologic profile of OC000459, a potent, selective, and orally active D prostanoid receptor 2 antagonist that inhibits mast cell-dependent activation of T helper 2 lymphocytes and eosinophils. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 340, n. 2, p. 473-82, Feb 2012.

PRICE, A. E. *et al.* Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 25, p. 11489-94, Jun 22 2010.

ROYER, J. F. *et al.* A novel antagonist of CRTH2 blocks eosinophil release from bone marrow, chemotaxis and respiratory burst. **Allergy**, v. 62, n. 12, p. 1401-9, Dec 2007.

SAÚDE, M. D. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília. Volume único 2017.

SCHMIDT, J. A. *et al.* Biochemical and pharmacological characterization of AZD1981, an orally available selective DP2 antagonist in clinical development for asthma. **Br J Pharmacol**, v. 168, n. 7, p. 1626-38, Apr 2013.

SHIRASAKI, H. *et al.* Accumulation of CRTH2-positive leukocytes in human allergic nasal mucosa. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 102, n. 2, p. 110-5, Feb 2009.

SPITS, H. *et al.* Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 2, p. 145-9, Feb 2013.

STEINMANN, P. *et al.* Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 7, p. 411-25, Jul 2006.

STINSON, S. E.; AMRANI, Y.; BRIGHTLING, C. E. D prostanoid receptor 2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells) protein expression in asthmatic

patients and its effects on bronchial epithelial cells. **J Allergy Clin Immunol**, v. 135, n. 2, p. 395-406, Feb 2015.

TAKATORI, H. *et al.* Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. **J Exp Med**, v. 206, n. 1, p. 35-41, Jan 16 2009.

TANAKA, K. *et al.* Effects of prostaglandin D2 on helper T cell functions. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, n. 4, p. 1009-14, Apr 16 2004.

TANRIVER, Y.; DIEFENBACH, A. Transcription factors controlling development and function of innate lymphoid cells. **Int Immunol**, v. 26, n. 3, p. 119-28, Mar 2014.

TURNER, J. E. *et al.* IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. **J Exp Med**, v. 210, n. 13, p. 2951-65, Dec 16 2013.

VIVIER, E. *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-9, Jan 7 2011.

VOSSHENRICH, C. A. *et al.* A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. **Nat Immunol**, v. 7, n. 11, p. 1217-24, Nov 2006.

WHO. Status of schistosomiasis endemic countries: 2016. Map and Statistics 2016. Disponível em: < http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html >. Acesso em: nov. 2019.

_____. Schistosomiasis. World Health Organization, 2019 2019. Disponível em: < <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis> >. Acesso em: nov. 2019.

WOJNO, E. D. *et al.* The prostaglandin D(2) receptor CRTH2 regulates accumulation of group 2 innate lymphoid cells in the inflamed lung. **Mucosal Immunol**, v. 8, n. 6, p. 1313-23, Nov 2015.

WYNN, T. A. IL-13 effector functions. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 425-56, 2003.

XUE, L. *et al.* Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. **J Allergy Clin Immunol**, v. 133, n. 4, p. 1184-94, Apr 2014.

YOSHIMURA-UCHIYAMA, C. *et al.* Differential modulation of human basophil functions through prostaglandin D2 receptors DP and chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells/DP2. **Clin Exp Allergy**, v. 34, n. 8, p. 1283-90, Aug 2004.

YUDANIN, N. A. *et al.* Spatial and Temporal Mapping of Human Innate Lymphoid Cells Reveals Elements of Tissue Specificity. **Immunity**, v. 50, n. 2, p. 505-519 e4, Feb 19 2019.

ZHAO, A. *et al.* Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. **J Immunol**, v. 171, n. 2, p. 948-54, Jul 15 2003.

5.3 APRESENTAÇÃO DO CAPÍTULO 3

Este capítulo será dedicado à apresentação do manuscrito 3 sobre “Isolation of Human Group 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2) from peripheral blood by Fluorescence Activated Cell Sorting”. Os recentes estudos relacionando as ILC2 com doenças alérgicas e infecções por patógenos impulsionaram uma gama de outros trabalhos sobre as suas contribuições nestas doenças. As evidências trazendo as principais descobertas para o contexto das helmintíases, por exemplo, permitiram que hoje soubéssemos que as ILC2 possuem uma fundamental contribuição na resposta aos danos epiteliais através da produção de citocinas Th2. Contudo, essas evidências também mostram que as ILC2 participam dos processos fibróticos e patogênese dessas doenças. Apesar de haver um número significativo de trabalhos sobre as ILC2 nas helmintíases, com alguns deles inclusive já abordando a infecção pelo *Schistosoma*, ainda são poucos os que abordam a infecção em humanos. Sobre isso, salienta-se que as condições relacionadas à dinâmica entre parasita e hospedeiro, o ambiente, e o contexto de exposição crônica ao *Schistosoma* em áreas endêmicas, fazem necessário também ter a infecção em humanos como um objeto de estudo. Entretanto, como os próprios estudos prévios mostram, além das dificuldades de acesso a esses indivíduos, também existe uma notável dificuldade em se obter as ILC2 para estudo devido a sua baixa frequência no sangue periférico. Isso ocorre porque estas células, em indivíduos infectados, provavelmente estão mais localizadas nas regiões em que se fazem necessárias. Desse modo, este manuscrito teve como objetivo padronizar e descrever procedimento de isolamento de células linfóides inatas do tipo 2 (ILC2) por *sorting*. Este método tem a proposta de aumentar a frequência de ILC2 para que sejam mais bem avaliadas por citometria de fluxo, mas também sorteadas para que sejam cultivadas e, desse modo, seja possível descrever o seu perfil imunológico.

Manuscrito 3

“Isolation of Human Group 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2) from peripheral blood by Fluorescence Activated Cell Sorting”. **(Manuscrito submetido ao periódico Bio-protocol)**

Isolation of Human Group 2 Innate Lymphoid Cells (ILC2) from Peripheral Blood by Fluorescence Activated Cell Sorting

Michael Nascimento Macedo^{1, 2, #}, Yuri Tabajara^{1, 2, #}, Thairone Moura¹, and Ricardo Riccio Oliveira^{1, 2, *}

¹Laboratório de Patologia Experimental, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Salvador-BA, Brazil; ²Programa de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador-BA, Brazil

*For correspondence: ricardo.riccio@fiocruz.br

#Contributed equally to this work

[Abstract] The group 2 innate lymphoid cells (ILC2) are a group of cells that act mainly in the tissue maintenance and homeostasis. These cells can rapidly secrete large amounts of type 2 cytokines, like interleukins 5 and 13, in response to tissue damages which release interleukins 25, 33 and thymic stromal lymphopoietin (TSLP). The knowledge of these novel immune character has been increasing all over the years, but the study in uncounted diseases and models by different worldwide groups generate so many different protocols that difficult the reproducibility and study interpretation. Here we propose a methodology to isolate and culture ILC2 from an initial high concentrated peripheral blood cells suspension. In this study, a cell enrichment method was used to deplete cells expressing cell lineage markers (Lin⁺) to increase the frequencies of ILC2 for their study. Thus, for the ILC2 enrichment steps, the EasySep FITC Positive Selection Kit was performed. For the analysis of the frequency of the ILC2 and its isolation by sorting, the BD FACSAria II system was used, associated with a set of strategies for proper setting of the cytometry device, gain in cell viability, reduction of doublets and optimization of its culture. The experiments described in this study allowed a standardization of the methods used for flow cytometry analysis and sorting of ILC2. The strategies used were efficient in reducing the occurrence of doublets, improving cell frequency, isolation, and viability. Therefore, it is suggested that this methodological proposal can be used for phenotypic analysis and isolation of these cells.

Keywords: Group 2 innate lymphoid cells, ILC2, Flow cytometry, Sorting.

[Background] The classical immune system division comprehends innate and adaptive response. While the innate immune system is characterized by an initial and nonspecific immune response, adaptive response is much specific and generates a strong immune response. The study of this adaptive immune system increased when Mosmann et al. (1986-1989) described groups of lymphocytes competent to secrete different types of proteins and, posteriorly, these profiles help to understand the different functions of these cells (MOSMANN *et al.*, 1986; MOSMANN e COFFMAN, 1989). Nevertheless, such immunology paradigms seem to be in continuous changes as new discoveries are come out, mainly when it proposes new classifications, whether in innate or adaptive immunity. In addition, recent discoveries that lymphoid cells participate in innate immune responses have also contributed to these topics being further explored.

At First, NK cells were the first innate lymphoid cells to be found. The main characteristic that allow differentiate a NK cell is the lack of a T cell receptors (TCR), a feature that is shared by all innate lymphoid cells, in addition to the expression of markers also present in T cells, $\gamma\delta$ T cells (gamma delta) and NKTi cells (VIVIER *et al.*, 2011; BEZMAN *et al.*, 2012). Although NK cells were the prototype of innate lymphoid cells, other groups of cells have attracted attention and together with NK cells, they form the large group of innate lymphoid cells, divided into: group 1 innate lymphoid cells (ILC1 and NK cells), group 2 innate lymphoid cells (ILC2) and group 3 innate lymphoid cells (ILC3). (SPITS *et al.*, 2013). These cells have a canonical division and mirrors the profiles of auxiliary T cells. As ILC1 are known by the production of Th1 cytokines, ILC2 produce Th2 cytokines and ILC3, Th17 cytokines (SPITS *et al.*, 2013). The idea of unifying a nomenclature by Spits group was essential to further investigations involving ILC, since they were known diffusely by a variety of denominations.

ILCs are responsible for being vigilant in many tissues releasing its specific cytokines. These cells are in strategic regions, mainly on the epithelial surfaces, which gives an advantage to behave in the maintenance of tissue homeostasis. Despite the lack of antigen recognition receptors, as T and B lymphocytes, ILCs respond to a well-defined group of cytokines, depending on the type of ILC. These cells also have no cell lineage markers (CD3, CD19, CD56, CD68 and CD205), which designates them as negative cell lines (Lin⁻) (SPITS e DI SANTO, 2011; SPITS *et al.*, 2013).

As mentioned, many different groups, driven by recent discoveries, have started reporting evidence from ILCs. One of the main investigated were the ILC2. Initially, studies referred to these cells as a group of non-T and non-B lymphocytes, type 2 cytokine-secreting. In these first discoveries, ILC2 were described to its ability to release high concentrations of

cytokines IL-5 and IL-13 (production dependent on IL-25) (FORT *et al.*, 2001). Then, ALLAKHVERDI *et al.* (2009) demonstrated that the production of Th2 cytokines by ILC2 also depended on the cytokines IL-33 and TSLP. However, in 2010, three different groups explored the ILC2 better, describing the way they are distributed in tissues and confirmed their commitment to the Th2 pole (MORO *et al.*, 2010; NEILL *et al.*, 2010; PRICE *et al.*, 2010).

Despite their low frequency in peripheral blood (0.01%-0.03%), ILC2 is the better studied group of ILCs, most likely because they are the most frequent among ILC in the blood (MJOSBERG *et al.*, 2011). The ILCs are important in inflammatory processes contexts as allergic diseases and defense against helminths (TURNER *et al.*, 2013; BARTEMES *et al.*, 2014; JACKSON *et al.*, 2014; MCSORLEY *et al.*, 2014; OLIPHANT *et al.*, 2014). Despite its suggestive role as important in the resolution of these situations, this response - usually in the long term - induce fibrotic processes (mainly due to the action of IL-13) (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; LA FLAMME *et al.*, 2001; HOFFMANN *et al.*, 2002; PATTON *et al.*, 2002; CHIARAMONTE *et al.*, 2003; WYNN, 2003).

However, most studies are performed in experimental models and the role of ILC2 in human pathogens infections still needs to be further investigated. In addition, the main issue in ILC2 study is its low frequency and the absence of better-defined protocols. In addition, many studies that assess important characteristics of ILC2, as their frequency, do not use cell enrichment methods, which increase purity by depleting Lin⁻ cells. At the same time, its isolation by sorting and culturing needs special attention, as this knowledge is disseminated. Thus, the present study aimed standardizing and describing the ILC2 isolation procedure by sorting, as well as defining strategies to optimize this procedure.

Materials and Reagents

1. 0,9% NaCl solution (see Recipes)
2. Ficol Hystopaque (Sigma Aldrich, catalog number: 10771)
3. EDTA (see Recipes)
4. Recommended Medium (see Recipes)
5. EasySep™ Human FITC Positive Selection Kit (Stem Cell Technologies, Vancouver BC, Canada, Cat. no. 18552)
6. Pluronic Reagent (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 24040032)
7. FITC Conjugated Antibodies
8. Falcon® Round-Bottom Tubes with Cell Strainer Cap (Stem Cell Technologies, catalog number: 38030)
9. Human anti-CD127 Antibody
10. Human anti-CRTH2 Antibody
11. Trypan Blue
12. Pen-Strep
13. Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 16000044)
14. Recombinant Human IL-17E Protein (IL-25)
15. Recombinant Human IL-33 Protein
16. Recombinant Human IL-7 Protein
17. Recombinant Human TSLP Protein
18. Recombinant Human IL-2 Protein

Equipment

1. Eppendorf Centrifuge
2. Optical Microscope
3. FACS ARIA II
4. Inverted Microscope
5. Incubater
6. EasySep Magnet (Stem Cell Technologies, catalog number: 18000)

Software

1. BD FACSDiva™ (BD Biosciences, www.bdbiosciences.com)
2. GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, www.graphpad.com)
3. FlowJo v10 (FlowJo, www.flowjo.com)

Procedure

A. Depletion of lineage cells and enrichment of ILC2

1. ILC2 enrichment

a. For this depletion it is necessary to use a positive selection kit, EasySep FITC Positive Selection Kit (Figure 1) (supplied with Catalog #18552), and an antibody cocktail with anti-CD3, CD14, CD16, CD19 e CD56, conjugated with FITC fluorochrome (MJOSBERG *et al.*, 2011).

Note: During this procedure, the Lin⁻ cells, that were supposed discarded in the method, are recovered for its future use. Our experiments show that cell enrichment results in an 8.6x increase in these cell frequencies. When the ILC2 frequency was analyzed without this enrichment method, we found a median of 0,03% cells, while lineage depletion resulted in a considerably higher frequency, 0,26% (Figure 2). The ILC2 frequency enhancement also facilitates the ILC2 visualization since it can be a difficult task to sort a population with frequencies as low as that observed without the enrichment method.

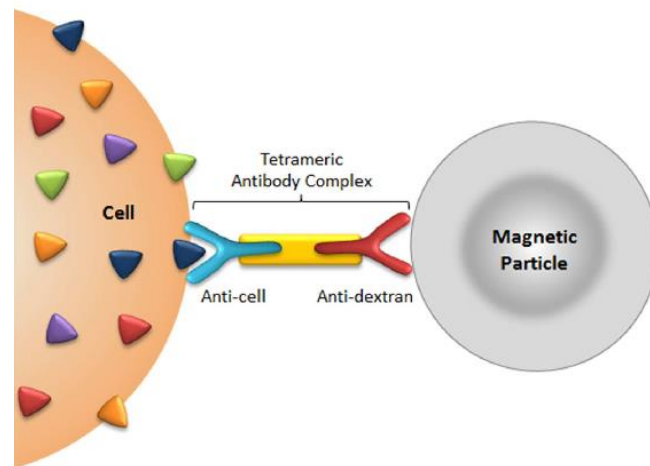


Figure 1. Magnetic selection using EasySep FITC Positive Selection Kit. Antibody complexes bind the target cells to dextran covered magnetic beads (Stem Cell, 2013). Since it is a positive selection kit, the cells that are trapped in the magnetic selection column are positive for the lineage markers. This procedure is possible because FITC selection kit allows to form antibody tetrameric complexes. One of these present antibodies has affinity for magnetic particles covered by dextran. The complexes formed by FITC stained antibody conjugated cells, anti-dextran antibodies and the dextran covered magnetic particles, are magnetically attracted by the magnetic support (EasySep Purple Magnet), being retained and, thus, facilitating its depletion.

Simplified demonstration of ILC2 enrichment

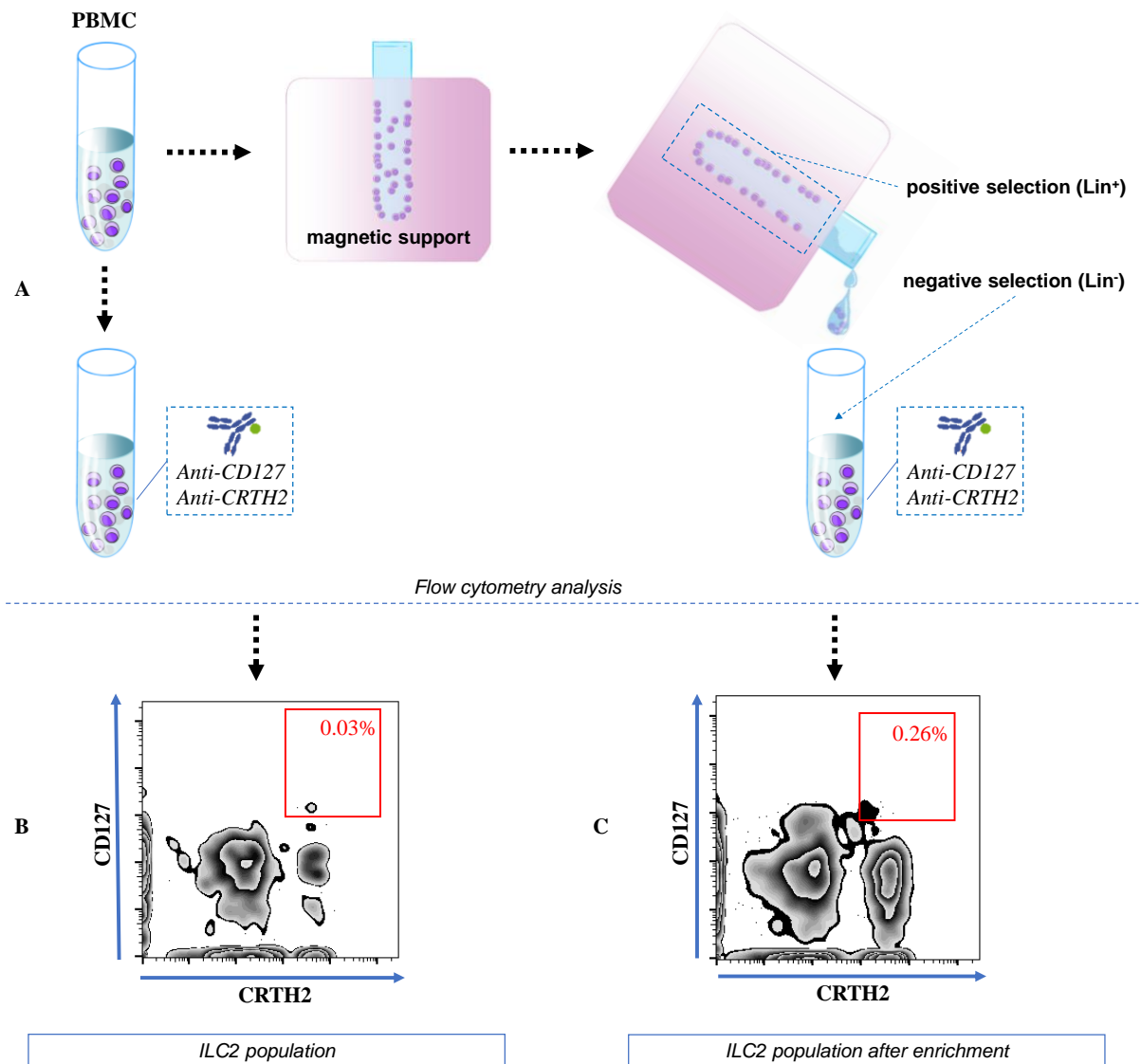


Figure 2. ILC2 enrichment. (A) Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) went through an enrichment process in which lineage cells (Lin⁺ [CD3, CD14, CD16, CD19 e CD56]) were depleted and lineage negative cells (Lin⁻) were recovered for post use. The Lin⁻ cell suspension and another suspension that did not undergo enrichment were labeled with anti-CD127 and CRTH2 antibodies, phenotypic definition of ILC2. After labeling with the antibodies, both the cells that did not undergo enrichment (B) and the enriched suspension (C) were analyzed in the flow cytometry device for the analysis of ILC2 frequency.

2. Strategies for doublets reduction

- a. The isolation of rare populations, as ILC2, generally involves the use of a remarkably high initial concentration (starting concentration) of cells (recommended around 1×10^8 cells/mL). Because the existing attractive forces between cells, many end up forming large cell aggregates in the early stages of the experiment, or even at acquisition time. The presence of these cell aggregates can also be a significant issue in the end cell frequencies. This happens due to these aggregates that in cytometry we call doublets. The doublets can pass through the detectors and be identified as a single cell or take cells that are not of experimenter interest. Therefore, reducing its presence is so necessary for an even purer result.
- b. Add 1 mM of EDTA to each used solution. EDTA is a substance that sequesters Ca^{2+} and acts as an integrin blocker in leukocytes (e.g. CD11b, which performs adhesion), preventing cell aggregation and reducing the incidence of doublets.
- c. Add 0,1% of Pluronic F-68 Reagent to each used solution (reduce: lather, cell adhesion) (THARMALINGAM *et al.*, 2008);
- c. Use 5 mL Falcon tubes with a 35 μm nylon mesh filter cap. As large leukocytes generally reach a diameter of up to 20 μm , the passage of the cell suspension through this mesh makes these aggregates fall apart. Working with large quantities of cells will continue to aggregate-forming.
- d. Therefore, it is recommended that Lin^- cells be distributed in polystyrene tubes with a filter cap at a concentration of 1×10^7 cells/mL before analysis by cytometry.

3. Procedure description of A (depletion of lineage cells and enrichment of ILC2)

- a. Prepare a cell suspension at a concentration of 1×10^8 cells/mL in Recommended Medium. The cells should be in a 5 mL polystyrene tube for the use in the EasySep Magnet (Catalog #18000).
- b. Add 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of the FcR Blocking Antibody (supplied with Catalog # 18552) and mix.
- c. Add 21 μL of FITC-Conjugated Antibody. Mix well and incubate at room temperature for 15 minutes.
- d. Add 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of the EasySep® FITC Selection Cocktail (supplied with Catalog # 18552). Mix well and incubate at room temperature for 15 minutes.
- e. **(CRITICAL STEP ⚠)** Vortex Magnetic Nanoparticles (supplied with Catalog # 18552) well to ensure they are in a uniform suspension, and pipette vigorously for approximately 5

times. Add 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$ of the Nanoparticles. Homogenize and incubate at room temperature for 10 minutes.

f. Adjust the total volume of the suspension to 2.5 mL by adding the Recommended Medium. Homogenize the cells gently by pipetting 2-3 times. Place the tube (without the cap) on the Magnet. Leave the tube in the Magnet for 5 minutes.

g. Take the Magnet and, with a continuous movement, invert the Magnet and the tube, decanting the fraction of the supernatant. The magnetically marked cells will remain in the tube, carried out by the Magnet EasySep® magnetic field. Stay with the magnet and tube inverted for 2 - 3 seconds, then return to the vertical position. Do not shake or attempt to remove any drops that remain in the tube border.

h. Remove the tube from the magnet and add 2.5 mL of the recommended medium. Gently homogenize the cell suspension by pipetting 2-3 times. Place the tube back on the Magnet and leave for 5 minutes.

i. Repeat steps 7 and 8, and then 7 again, for a total of 3 separations of 5 minutes on the Magnet. Remove the tube from the Magnet and resuspend the cells in an appropriate volume of the desired medium. The negatively selected cells will be in a 15 mL Falcon tube.

l. Centrifuge the selected cells negatively (1290 rpm, 25° C, 10'). Perform the labeling with the phenotypic characterization antibodies of type 2 innate lymphoid cells.

B. ILC2 labeling with characterization antibodies

Desired cells are the type 2 innate lymphoid cells, which express the CD127 receptors and chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells (CRTH2). Thus, we should label them with antibodies against these two surface molecules to later assess their frequency in the investigated subjects and isolate them using the aseptic sort technique.

1. Quantify the negative selected cells using a hemocytometer. After quantification, divide the cells into tubes with a filter cap containing 1×10^7 cells per tube to proceed with the labeling process - this procedure is part of a set of strategies previously mentioned for the reduction of cell aggregates.

2. Prepare a battery of tubes for calibration in according to used markers - the calibration tubes will contain cells that have not undergone the enrichment process, so they must be destined for this purpose even before the enrichment process starts. The tubes for flow cytometry calibration must receive a volume that will later be supplemented to 20 μL with saline (NaCl) to ensure

- that the cells are kept in a uniform suspension (for example, 5 μ L antibody + 15 μ L of saline).
3. Add the antibody mix to the Lin⁻ cells and adjust the volume to 20 μ L.
 4. (PAUSE ⌚) Incubate for 15 minutes (minimum time) under 2 to 8 ° C (protected from light).
 5. Add 200 μ L of saline to each tube, and centrifuge at 1450 rpm for 10 minutes.
 6. Discard the supernatant and detach the cell pellet and add 400 μ L of saline per tube.
 7. (IMPORTANT ⚠) It is recommended that Lin⁻ cells receive the Recommended Medium solution instead of saline so that it is possible to reduce cell aggregates.
 8. Accommodate tubes containing Lin⁻ cells at a temperature of 2-8°C until the moment of use (recommended until ILC2 sort).
 9. (prior to acquisition) Pass the Lin⁻ cells through the cell strainer cap to reduce aggregates and optimize the method.
 10. (CRITICAL STEP ⚠) Designate the sorted cells to a receiving tube, previously blocked with SFB, and the cells must remain refrigerated throughout the sorting process (e.g. in a box with ice). A diagram summarizing the procedure can be seen in Figure 3.

Procedure summary

- Centrifuge at 1450 rpm, 10'. Discard the supernatant;
- Add the antibody mix and incubate for 15', 2 to 8°C (protected from light);
- Add 200 μ L of saline to each tube;
- Centrifuge at 1450 rpm, 10';
- Discard the supernatant and detach the cell pellet;
- Add 400 μ L of saline to each tube;
- Perform FACS analysis.

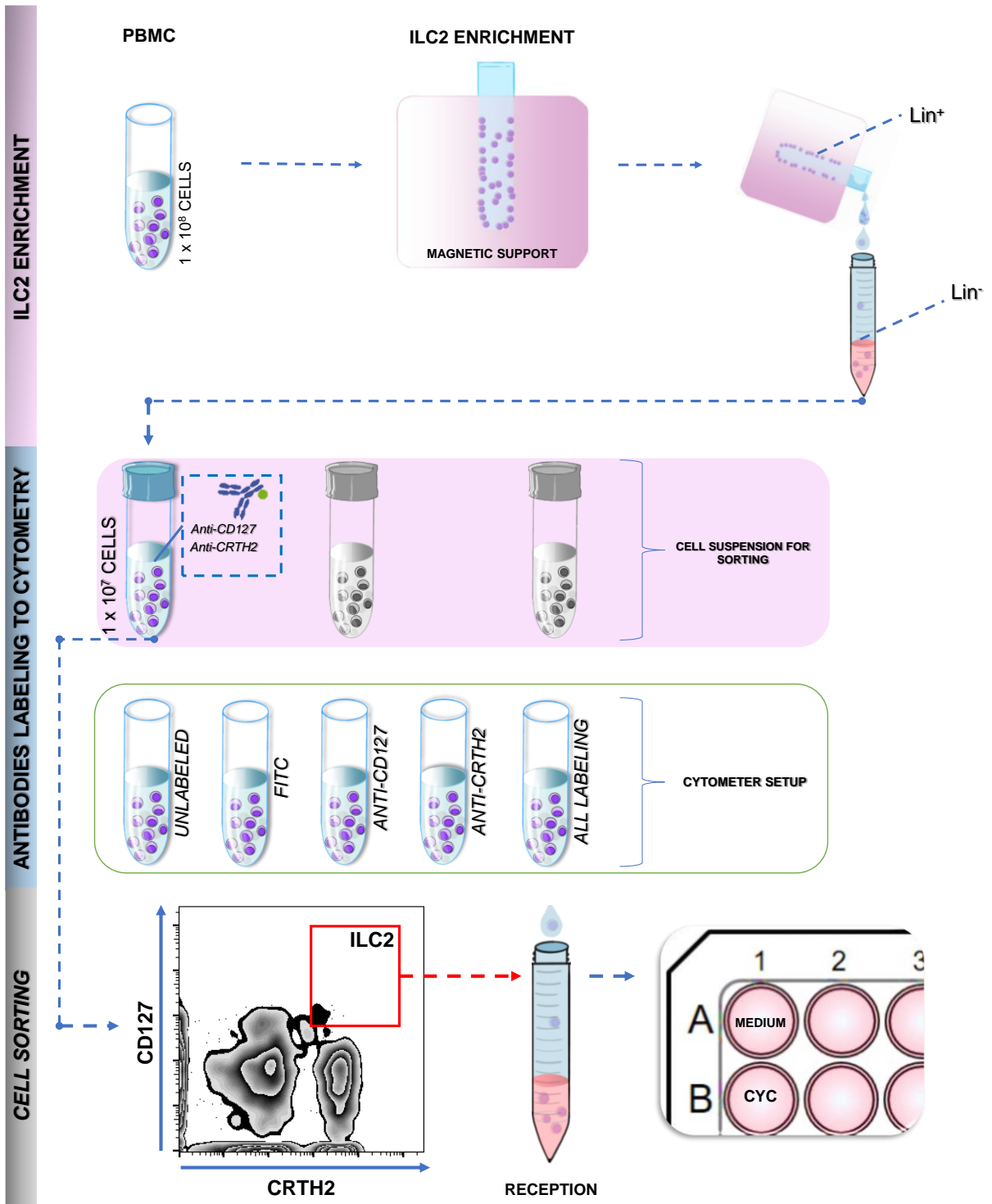


Figure 3. Simplified scheme of the methods used for enrichment and sorting of ILC2.

C. Flow cytometer setting

1. Overall, there is a rule that the nozzle size should be at least 5-6 times the diameter of the studied cell (COSSARIZZA *et al.*, 2017). Because ILC2 have a diameter of about 10 μm , the best choice will be a nozzle of 70 μm .

Note: Basically, after initial lasers analysis, each cell is separated and enter a single drop while leaving the tip of the nozzle. At that point, interest cell separation will depend on the cytometer's ability to impart an electrical charge to this drop that has just left the nozzle. Then, the drop will be directed to collecting tubes, depending on the attributed charge. During this process, a series of precautions must be held, as the acquisition speed, nozzle's size, as well as some fine adjustments that alter the interval between the drops and their frequency (Figure 4).

2. Use a pressure of 70 psi (appropriate for 70 μm nozzle), a frequency of 90-95 kHz and a flow rate adjusted to speed 1 (higher resolution, where greater clarity is essential) (KUKA e ASHWELL, 2013).

Note: Opportunely, it is emphasized that the flow rate chosen will determine how many cells will pass through the laser when they are "interrogated" by the device. This is because the cells, when injected in the form of a liquid beam in sheath fluid center, will encounter a pressure exerted by that sheath. Therefore, for results that require greater resolution and clarity, it is always recommended to choose the low-pressure mode (Figure 5).

3. Select the purity mode as sort mode, which sorts with high purity only positive events in the absence of negative events. The single cell mode has the same purity as the purity; however, it is more recommended for use in sorting using culture plates (Figure 6).

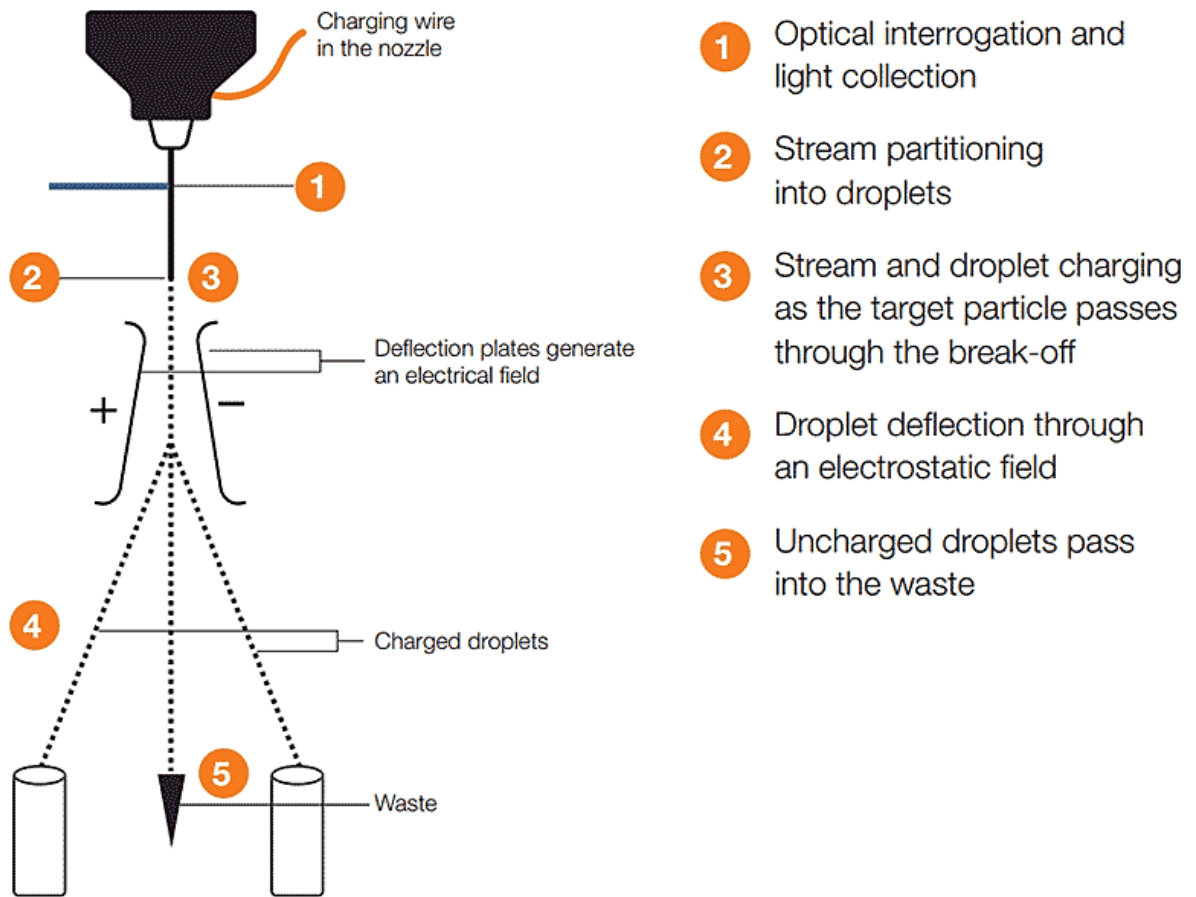


Figure 4. Functioning of cell sorting mechanism (BIO-RAD, 2019)

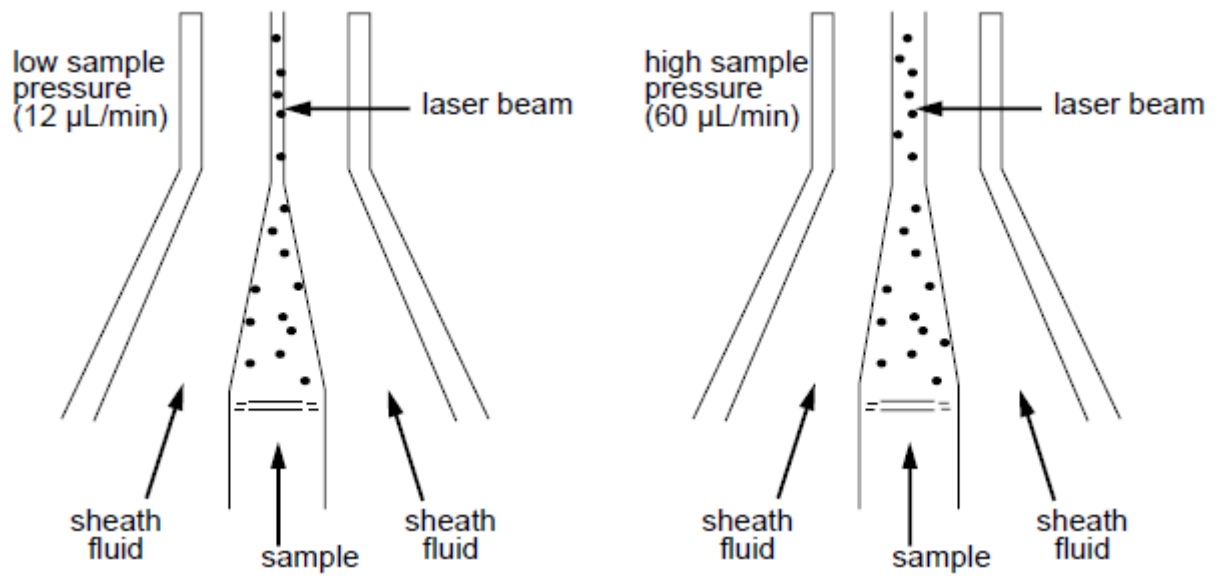
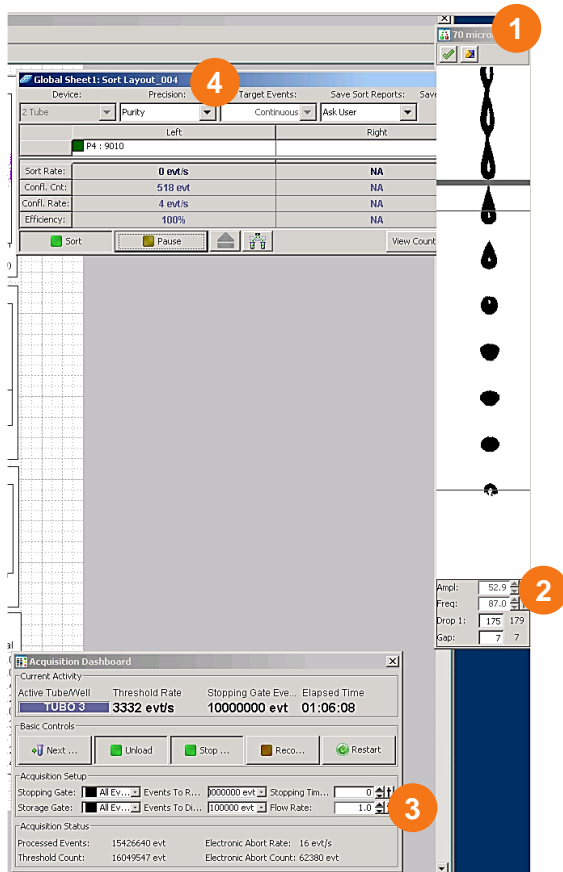


Figure 5. Hydrodynamics of sample through the flow cell (BECTON, 2007).



- 1 Nozzle indicator
- 2 Frequency (*drop-drive frequency*)
- 3 System speed (*flow rate*)
- 4 Sort mode (*precision*)

Figure 6. Illustration of the work screen at FACSARIA II (BD FACSDiva Software).

Source: Personal (2019).

D. Strategies for gates selection and ILC2 sorting

1. Since ILC2 do not express lineage markers, it will be possible to view two cells groups in the FACS DIVA software graphics: Lin^- cells and another well-defined population, highlighted with greater expression of these markers (Lin^+) (Figure 7).

2. As a complementary strategy to that already mentioned in section A-2 (Strategies for doublets reduction), create gates by interpolating the Forward Scatter-H (FSC-H), which refers to the height of what is being analyzed, and Forward Scatter-A (FSC-A) parameters, which translates the event area (Figure 8).

Note: These gates speculate that only single cells are selected by the cytometry device at acquisition time (which should always occur at the lowest possible speed).

3. After selection with Lin^- population gates help, select the population that co-expresses the CD127 and CRTH2 markers (Figure 7).

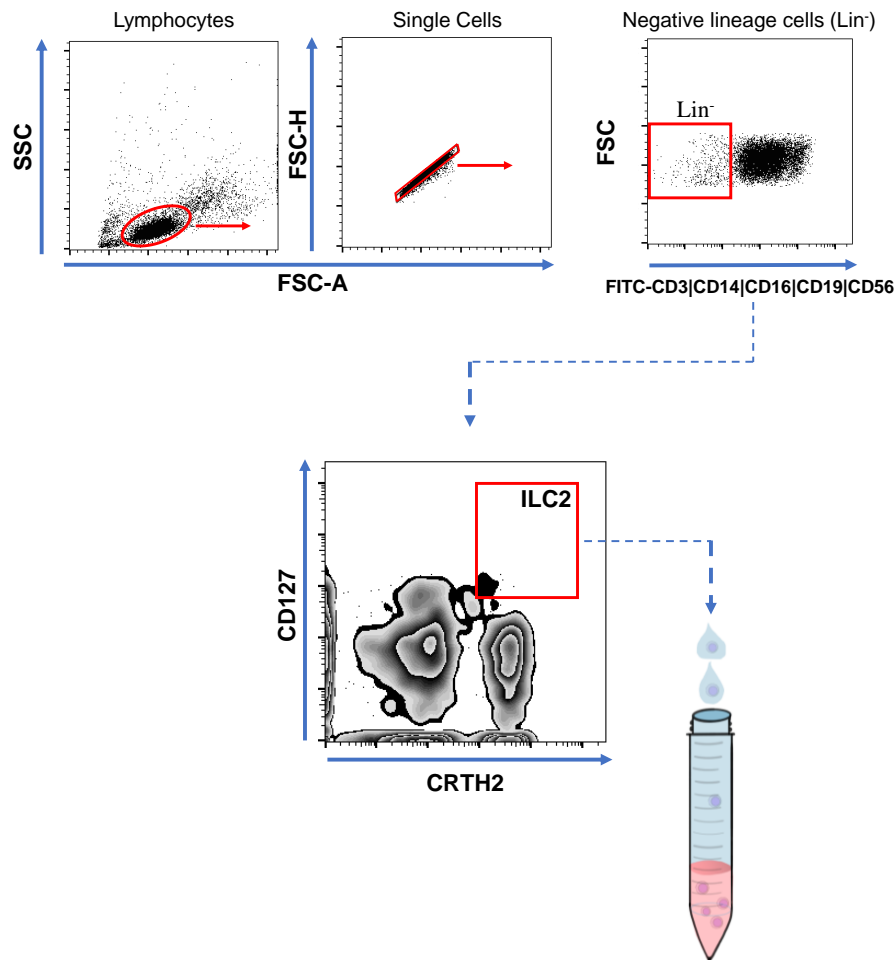


Figure 7. Strategy for gates selection and ILC2 sorting. After isolating the PBMCs and enriching ILC2, by depleting the Lin⁺ cells, the cells were analyzed by flow cytometry. The analysis strategy involves performing gates to include only single cells, and then another analysis is done in which only Lin⁻ cells will be included. By selecting only the Lin⁻ cells in graph, the ILC2 is even more pure. Again, another gate must be performed, but this time in the subgroup of cells that co-express CD127 and CRTH2, allowing the cytometer to select only these cells and transfer them to an appropriate recipient for experimenter's interest.

Gates strategy for single cell selection

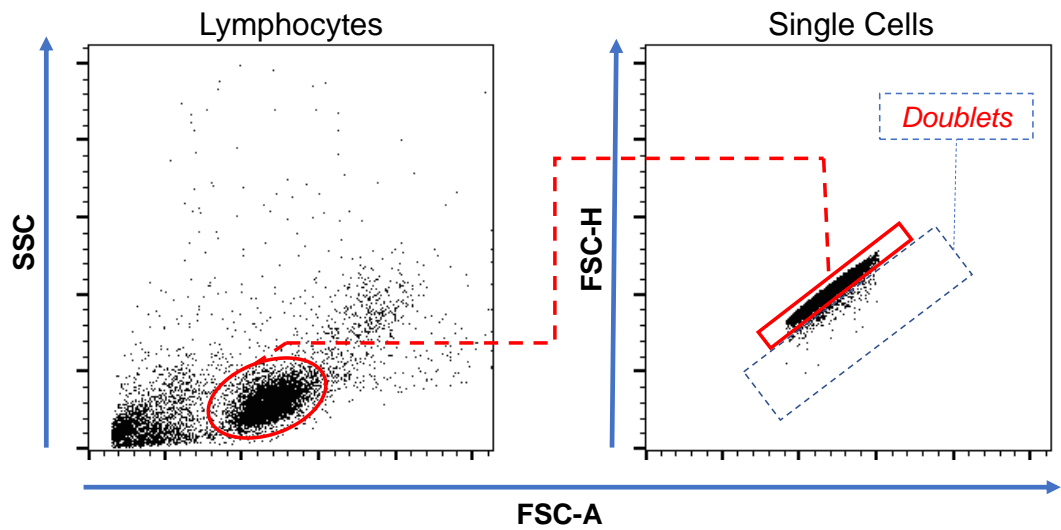



Figure 8. Strategy for doublets reduction by single cell gates. After separating the PBMCs, the cells were destined to flow cytometry system for analysis of the populations of interest. The selection of FCS-H (which refers to the height of the event) and FSC-A (area) parameters, allows the visualization of single cells. Whether only these cells, that appear as a fillet, are selected, the doublets can significantly be reduced.

E. Receipt of sorted ILC2

1. (CRITICAL STEP ) Since the selected cells will remain in the receiving tube for some time, it will be necessary to create an environment that minimizes cell death. Therefore, it is recommended that:

- a. Keep the receiving tubes at a temperature of approximately 4°C (e.g. on ice) during the entire cell sorting process.
- b. Block receiving tubes wall with Inactivated Fetal Bovine Serum (FBS).

Note: This strategy contributes to the reduction of adherence to tubes wall, increasing its viability.

2. Supplement the reception medium with antibiotic solution containing penicillin and streptomycin (Pen-Strep). This medium must still be supplemented with 20% SFB to provide greater cell viability.

Note: Although the procedure is an “aseptic” sorting because the device performs an internal cleaning of its compartments, the cells will eventually interact with environment, for example when opening and closing the tubes.

F. ILC2 culture and collection of supernatants for cytokine dosage

1. Prepare a culture medium supplemented with a cytokine cocktail (CYC) containing important cytokines for their expansion and activation (IL-25, IL-33, IL-7, TSLP [10 ng/ml each] e IL-2 [10 U/ml]) (BARTEMES *et al.*, 2014; BOYD *et al.*, 2014).

Note: It is considered important to have a condition without the presence of the CCI with the purpose of control the experiment.

2. Quantify the selected cells with a dye that allows visualization of both healthy and dead cells (Trypan Blue) and determine their viability - only consider the viable cells for cultures.
3. Add 1×10^4 cells/well (96-well culture plates with “U” bottom).
4. After the culture period (in this experiment we recommend 12 hours), collect the culture supernatants and stock for cytokines and other molecules analysis.

Data analysis

1. These procedures aim to increase the method efficiency and increase the number of sorted cells. Our results showed that the ILC2 enrichment method, combined with the recommended

optimization procedures, can increase the final frequency of ILC2. The absence of this method leads to a frequency of 0.03% of ILC2, while its execution generates a frequency of 0.26%, an increase of about 8 times (Figure 2). Increasing in ILC2 frequency is essential when aiming to obtain cells for culture.

a. To analyze the efficiency of the procedures used by the enrichment method, compare the frequency of the cells that co-express CD127 and CRTH2 markers, with those without cell enrichment.

2. The recently sorted cells can also be re-analyzed on the flow cytometer for ILC2 frequency assessment and to evaluate the method efficiency. The sorting experiments showed that the use of the EasySep Positive Selection kit associated with the previous recommended optimization procedures, resulted in a 102-fold increase in the frequency of ILC2 cells as compared to that was observed before the sorting (Figure 9). Therefore, the procedures lead to a significant increase, allowing these cells to be available in satisfactory amounts for culture ($1 \times 10^3 - 1 \times 10^4$). An image illustrating the aspect of the ILC2 culture prior to supernatants collection can be seen in figure 10.

3. Overall, the number of sorted cells will depend directly on the efficiency of ILC2 enrichment. Likewise, the recommended steps for method optimizing will contribute to post-sorting cells viability. In these experiments, cells viability in suspension was 81.1%. It is recommended perform the cultures immediately after sorting isolation so that this viability is not affected.

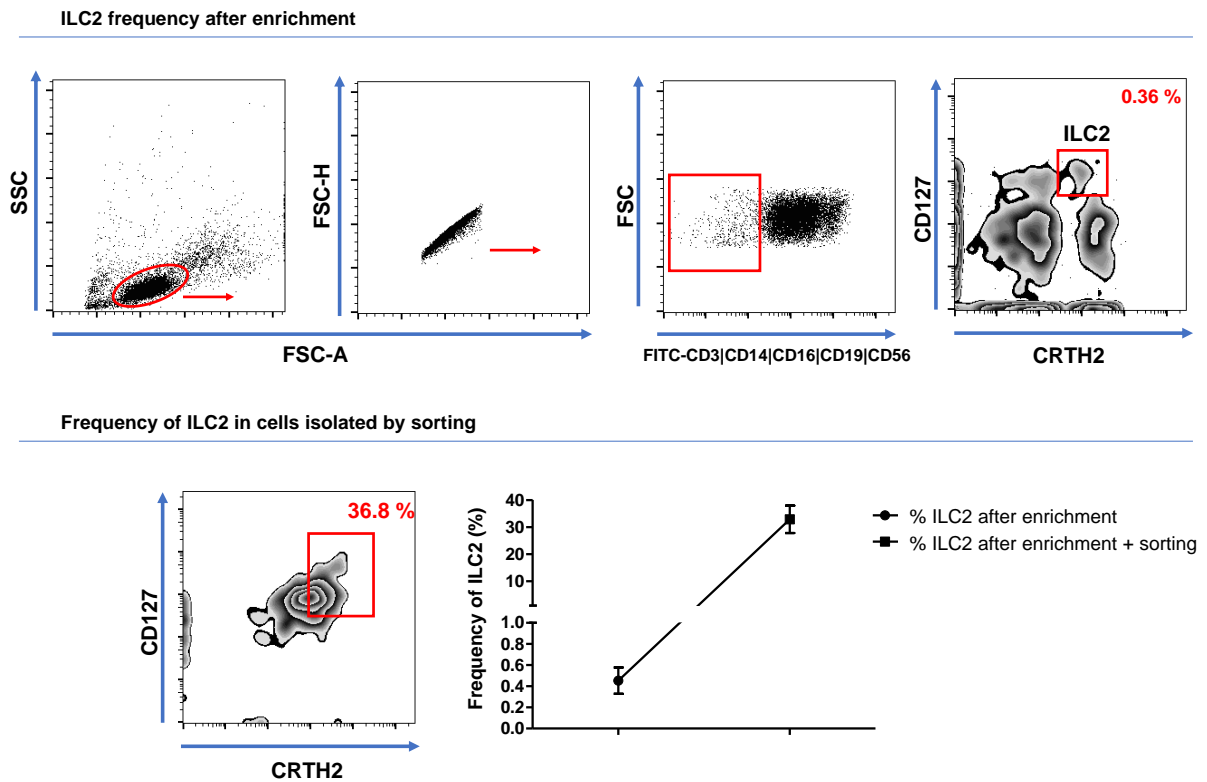


Figure 9. ILC2 frequency in sorting isolated cells. PBMCs were isolated for subsequent depletion of cells that expressed lineage markers (Lin^-). This enrichment method allows to increase the frequency of ILC2 for subsequent analysis and isolation by flow cytometry. During the cell sorting procedure, only Lin^- cells were selected, those that co-expressed the CD127 and CRTH2 markers, markers that distinguish ILC2 from other innate lymphoid cells. After sorting, the frequency of ILC2 among these isolated cells was verified.



Figure 10. ILC2 isolated by sorting in 96-well plates. The figure illustrates the ILC2 concentrated at the culture plate well bottom at 20x magnification. The ILC2 were sorted from lineage cells obtained by ILC2 enrichment method. The selected cells were cultured for 12 hours in the presence or absence of CYC. After cultured, supernatants were collected for cytokine evaluation.

Recipes

1. 0,9% NaCl solution (1 L)

9 g NaCl (mw 58.44) in 700 mL deionized or distilled water in clean container

Add water to bring total solution volume to 1000 mL

2. Phosphate Buffered Saline (PBS) 10x (1L stock)

80g of NaCl

2.0g of KCl

14.4g of Na₂HPO₄

2.4g of KH₂PO₄

Adjust pH to 7.4.

Adjust volume to 1L with additional distilled H₂O.

Sterilize by autoclaving

3. EDTA 0.5 M (500 mL stock, pH 8.0)

93.0 g EDTA (disodium ethylenediaminetetra-acetate·2H₂O) in 400 ml of H₂O

Adjust pH to 8.0, it dissolves when pH is right

Add H₂O to 500 mL

4. Recommended Medium

PBS 1x

2% Fetal Bovine Serum (FBS)

1 mM EDTA

Medium should be Ca⁺⁺ and Mg⁺⁺ free

Acknowledgments

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), Edital Jovem Cientista Baiano N° 008/2015, Programa de Mobilidade Acadêmica da Fiocruz, Edital 2017, and Laboratório de Patologia Experimental do Instituto Gonçalo Moniz (IGM). This work was adapted from previous work (BARTEMES *et al.*, 2014).

Competing interests

The authors declare no conflict of interest.

Ethics

This work was approved by the Research Ethics Committee of the Instituto Gonçalo Moniz (IGM-FIOCRUZ), approval number: 1.139.846. For this work, the volunteers signed a free and clarified consent term.

References

- Allakhverdi, Z.; Comeau, M. R.; Smith, D. E.; Toy, D.; Endam, L. M.; Desrosiers, M.; Liu, Y. J.; Howie, K. J.; Denburg, J. A.; Gauvreau, G. M.; Delespesse, G. (2009). CD34+ hemopoietic progenitor cells are potent effectors of allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 123 (2): 472-8.
- Bartemes, K. R.; Kephart, G. M.; Fox, S. J.; Kita, H. (2014). Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 134 (3): 671-678 e4.
- Becton, D. a. C. **BD LSR II User's Guide**. USA: BD Biosciences 2007.
- Bezman, N. A.; Kim, C. C.; Sun, J. C.; Min-Oo, G.; Hendricks, D. W.; Kamimura, Y.; Best, J. A.; Goldrath, A. W.; Lanier, L. L.; Immunological Genome Project, C. (2012). Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells. *Nat Immunol* 13 (10): 1000-9.
- Bio-Rad. Functioning of cell sorting mechanism. Bio-rad-antibodies.com, 2019. Disponível em: < <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-electrostatic-cell-sorting.html> >. Acesso em: 2019.
- Boyd, A.; Ribeiro, J. M.; Nutman, T. B. (2014). Human CD117 (cKit)+ innate lymphoid cells have a discrete transcriptional profile at homeostasis and are expanded during filarial infection. *PLoS One* 9 (9): e108649.
- Chiaramonte, M. G.; Donaldson, D. D.; Cheever, A. W.; Wynn, T. A. (1999). An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. *J Clin Invest* 104 (6): 777-85.
- Chiaramonte, M. G.; Mentink-Kane, M.; Jacobson, B. A.; Cheever, A. W.; Whitters, M. J.; Goad, M. E.; Wong, A.; Collins, M.; Donaldson, D. D.; Grusby, M. J.; Wynn, T. A. (2003). Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. *J Exp Med* 197 (6): 687-701.
- Cossarizza, A.; Chang, H. D.; Radbruch, A.; Akdis, M.; Andra, I.; Annunziato, F.; Bacher, P.; Barnaba, V.; Battistini, L.; Bauer, W. M.; Baumgart, S.; Becher, B.; Beisker, W.; Berek, C.; Blanco, A.; Borsellino, G.; Boulais, P. E.; Brinkman, R. R.; Buscher, M.; Busch, D. H.; Bushnell, T. P.; Cao, X.; Cavani, A.; Chattopadhyay, P. K.; Cheng, Q.; Chow, S.; Clerici, M.; Cooke, A.; Cosma, A.; Cosmi, L.; Cumanò, A.; Dang, V. D.; Davies, D.; De Biasi, S.; Del Zotto, G.; Della Bella, S.; Dellabona, P.; Deniz, G.; Dessing, M.; Diefenbach, A.; Di Santo, J.; Dieli, F.; Dolf, A.; Donnenberg, V. S.; Dorner, T.; Ehrhardt, G. R. A.; Endl, E.; Engel, P.; Engelhardt, B.; Esser, C.; Everts, B.; Dreher, A.; Falk, C. S.; Fehniger, T. A.; Filby, A.; Fillatreau, S.; Follo, M.; Forster, I.; Foster, J.; Foulds, G. A.; Frenette, P. S.; Galbraith, D.; Garbi, N.; Garcia-Godoy, M. D.; Geginat, J.; Ghoreschi, K.; Gibellini, L.; Goettlinger, C.; Goodyear, C. S.; Gori, A.; Grogan, J.; Gross, M.; Grutzkau, A.; Grummitt, D.; Hahn, J.; Hammer, Q.; Hauser, A. E.; Haviland, D. L.; Hedley, D.; Herrera, G.; Herrmann, M.; Hiepe, F.; Holland, T.; Hombrink, P.; Houston, J. P.; Hoyer, B. F.; Huang, B.; Hunter, C. A.; Iannone, A.; Jack, H. M.; Javega, B.; Jonjic, S.; Juelke, K.; Jung, S.; Kaiser, T.; Kalina, T.; Keller, B.; Khan, S.; Kienhofer, D.; Kroneis, T.; Kunkel, D.; Kurts, C.; Kvistborg, P.; Lannigan, J.; Lantz,

O.; Larbi, A.; Leibundgut-Landmann, S.; Leipold, M. D.; Levings, M. K.; Litwin, V.; Liu, Y.; Lohoff, M.; Lombardi, G.; Lopez, L.; Lovett-Racke, A.; Lubberts, E.; Ludewig, B.; Lugli, E.; Maecker, H. T.; Martrus, G.; Matarese, G.; Maueroder, C.; Mcgrath, M.; Mcinnes, I.; Mei, H. E.; Melchers, F.; Melzer, S.; Mielenz, D.; Mills, K.; Mirrer, D.; Mjosberg, J.; Moore, J.; Moran, B.; Moretta, A.; Moretta, L.; Mosmann, T. R.; Muller, S.; Muller, W.; Munz, C.; Multhoff, G.; Munoz, L. E.; Murphy, K. M.; Nakayama, T.; Nasi, M.; Neudorfl, C.; Nolan, J.; Nourshargh, S.; O'connor, J. E.; Ouyang, W.; Oxenius, A.; Palankar, R.; Panse, I.; Peterson, P.; Peth, C.; Petriz, J.; Philips, D.; Pickl, W.; Piconese, S.; Pinti, M.; Pockley, A. G.; Podolska, M. J.; Pucillo, C.; Quataert, S. A.; Radstake, T.; Rajwa, B.; Rebhahn, J. A.; Recktenwald, D.; Remmerswaal, E. B. M.; Rezvani, K.; Rico, L. G.; Robinson, J. P.; Romagnani, C.; Rubartelli, A.; Ruckert, B.; Ruland, J.; Sakaguchi, S.; Sala-De-Oyanguren, F.; Samstag, Y.; Sanderson, S.; Sawitzki, B.; Scheffold, A.; Schiemann, M.; Schildberg, F.; Schimisky, E.; Schmid, S. A.; Schmitt, S.; Schober, K.; Schuler, T.; Schulz, A. R.; Schumacher, T.; Scotta, C.; Shankey, T. V.; Shemer, A.; Simon, A. K.; Spidlen, J.; Stall, A. M.; Stark, R.; Stehle, C.; Stein, M.; Steinmetz, T.; Stockinger, H.; Takahama, Y.; Tarnok, A.; Tian, Z.; Toldi, G.; Tornack, J.; Traggiai, E.; Trotter, J.; Ulrich, H.; Van Der Braber, M.; Van Lier, R. a. W.; Veldhoen, M.; Vento-Asturias, S.; Vieira, P.; Voehringer, D.; Volk, H. D.; Von Volkman, K.; Waisman, A.; Walker, R.; Ward, M. D.; Warnatz, K.; Warth, S.; Watson, J. V.; Watzl, C.; Wegener, L.; Wiedemann, A.; Wienands, J.; Willimsky, G.; Wing, J.; Wurst, P.; Yu, L.; Yue, A.; Zhang, Q.; Zhao, Y.; Ziegler, S.; Zimmermann, J. (2017). Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur J Immunol* 47 (10): 1584-1797.

Fallon, P. G.; Richardson, E. J.; Mckenzie, G. J.; Mckenzie, A. N. (2000). Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J Immunol* 164 (5): 2585-91.

Fort, M. M.; Cheung, J.; Yen, D.; Li, J.; Zurawski, S. M.; Lo, S.; Menon, S.; Clifford, T.; Hunte, B.; Lesley, R.; Muchamuel, T.; Hurst, S. D.; Zurawski, G.; Leach, M. W.; Gorman, D. M.; Rennick, D. M. (2001). IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 15 (6): 985-95.

Hoffmann, K. F.; Wynn, T. A.; Dunne, D. W. (2002). Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. *Adv Parasitol* 52 265-307.

Jackson, D. J.; Makrinioti, H.; Rana, B. M.; Shamji, B. W.; Trujillo-Torralbo, M. B.; Footitt, J.; Jerico, D.-R.; Telcian, A. G.; Nikonova, A.; Zhu, J.; Aniscenko, J.; Gogsadze, L.; Bakhsoliani, E.; Traub, S.; Dhariwal, J.; Porter, J.; Hunt, D.; Hunt, T.; Hunt, T.; Stanciu, L. A.; Khaitov, M.; Bartlett, N. W.; Edwards, M. R.; Kon, O. M.; Mallia, P.; Papadopoulos, N. G.; Akdis, C. A.; Westwick, J.; Edwards, M. J.; Cousins, D. J.; Walton, R. P.; Johnston, S. L. (2014). IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. *Am J Respir Crit Care Med* 190 (12): 1373-82.

Kuka, M.; Ashwell, J. D. (2013). A method for high purity sorting of rare cell subsets applied to TDC. *J Immunol Methods* 400-401 111-6.

La Flamme, A. C.; Patton, E. A.; Bauman, B.; Pearce, E. J. (2001). IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. *J Immunol* 166 (3): 1903-11.

- Mcsorley, H. J.; Blair, N. F.; Smith, K. A.; Mckenzie, A. N.; Maizels, R. M. (2014). Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. *Mucosal Immunol* 7 (5): 1068-78.
- Mjosberg, J. M.; Trifari, S.; Crellin, N. K.; Peters, C. P.; Van Drunen, C. M.; Piet, B.; Fokkens, W. J.; Cupedo, T.; Spits, H. (2011). Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. *Nat Immunol* 12 (11): 1055-62.
- Moro, K.; Yamada, T.; Tanabe, M.; Takeuchi, T.; Ikawa, T.; Kawamoto, H.; Furusawa, J.; Ohtani, M.; Fujii, H.; Koyasu, S. (2010). Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)/Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature* 463 (7280): 540-4.
- Mosmann, T. R.; Cherwinski, H.; Bond, M. W.; Giedlin, M. A.; Coffman, R. L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 136 (7): 2348-57.
- Mosmann, T. R.; Coffman, R. L. (1989). TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 7 145-73.
- Neill, D. R.; Wong, S. H.; Bellosi, A.; Flynn, R. J.; Daly, M.; Langford, T. K.; Bucks, C.; Kane, C. M.; Fallon, P. G.; Pannell, R.; Jolin, H. E.; Mckenzie, A. N. (2010). Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* 464 (7293): 1367-70.
- Oliphant, C. J.; Hwang, Y. Y.; Walker, J. A.; Salimi, M.; Wong, S. H.; Brewer, J. M.; Englezakis, A.; Barlow, J. L.; Hams, E.; Scanlon, S. T.; Ogg, G. S.; Fallon, P. G.; Mckenzie, A. N. (2014). MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity* 41 (2): 283-95.
- Patton, E. A.; La Flamme, A. C.; Pedras-Vasoncelos, J. A.; Pearce, E. J. (2002). Central role for interleukin-4 in regulating nitric oxide-mediated inhibition of T-cell proliferation and gamma interferon production in schistosomiasis. *Infect Immun* 70 (1): 177-84.
- Price, A. E.; Liang, H. E.; Sullivan, B. M.; Reinhardt, R. L.; Eisle, C. J.; Erle, D. J.; Locksley, R. M. (2010). Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (25): 11489-94.
- Spits, H.; Artis, D.; Colonna, M.; Diefenbach, A.; Di Santo, J. P.; Eberl, G.; Koyasu, S.; Locksley, R. M.; Mckenzie, A. N.; Mebius, R. E.; Powrie, F.; Vivier, E. (2013). Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* 13 (2): 145-9.
- Spits, H.; Di Santo, J. P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol* 12 (1): 21-7.
- Tharmalingam, T.; Ghebeh, H.; Wuerz, T.; Butler, M. (2008). Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells. *Mol Biotechnol* 39 (2): 167-77.
- Turner, J. E.; Morrison, P. J.; Wilhelm, C.; Wilson, M.; Ahlfors, H.; Renauld, J. C.; Panzer, U.; Helmbj, H.; Stockinger, B. (2013). IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells

promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. *J Exp Med* 210 (13): 2951-65.

Vivier, E.; Raulet, D. H.; Moretta, A.; Caligiuri, M. A.; Zitvogel, L.; Lanier, L. L.; Yokoyama, W. M.; Ugolini, S. (2011). Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331 (6013): 44-9.

Wynn, T. A. (2003). IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 21 425-56.

6. DISCUSSÃO INTEGRADA

Inicialmente, destaca-se o caráter complementar que os artigos apresentados possuem, podendo esclarecer questionamentos que não seriam respondidas apenas com a clínica. No capítulo 1, foi demonstrado que o tratamento da esquistossomose induz uma diminuição gradual na concentração sérica da citocina IL-13. Esta citocina possui uma forte relação com os processos fibróticos em doenças que cursam com respostas imunes do tipo 2 (CHIARAMONTE *et al.*, 1999; FALLON *et al.*, 2000; HOFFMANN *et al.*, 2002; CHIARAMONTE *et al.*, 2003; WYNN, 2003). Essa relação entre fibrose e a resposta Th2 já foi demonstrada em algumas condições, como nas doenças alérgicas e em algumas infecções causadas por patógenos (TURNER *et al.*, 2013; BARTEMES *et al.*, 2014; JACKSON *et al.*, 2014; MCSORLEY *et al.*, 2014; OLIPHANT *et al.*, 2014). Nas helmintíases, por exemplo, recentes estudos têm demonstrado que além de a resposta Th2 estar relacionada com esses eventos danosos, as ILC2 provavelmente sejam as principais responsáveis por isso. Estudos mostrando a participação das ILC2 na infecção por helmintos, como o *N. brasiliensis* ou *H. polygyrus*, demonstraram que estas células aumentam a sua frequência local e que produzem elevadas concentrações de citocinas Th2, como a IL-13 (FALLON *et al.*, 2006; NEILL *et al.*, 2010; YASUDA *et al.*, 2012; HUNG *et al.*, 2013; MCHEDLIDZE *et al.*, 2013; TURNER *et al.*, 2013; WOJNO *et al.*, 2015; GERBE *et al.*, 2016; HOWITT *et al.*, 2016; RITTER *et al.*, 2017). Além disso, alguns estudos envolvendo modelos experimentais de esquistossomose, também associam os eventos fibróticos ocorridos com estas expansões celulares das ILC2 e as sua produção de citocinas (HAMS *et al.*, 2013; MCHEDLIDZE *et al.*, 2013).

Ressalta-se ainda que os experimentos realizados com as ILC2 isoladas e cultivadas só foram possíveis graças ao processo de padronização e descrição de um método otimizado para melhores resultados nos experimentos com estas células. Estudos que avaliem a frequência das ILC no sangue periférico, por exemplo, foram e ainda são de suma importância para que se adicione mais conhecimento ao tema. Contudo, deve-se considerar que na periferia a maior parte das células tende a ser Lin⁺ e que as ILC2 se encontram em uma baixíssima frequência. No capítulo 3, objetivou-se, através do isolamento das ILC2 por *sorting*, e enriquecimento prévio de ILC2, obter estas células para que fosse possível facear os principais questionamentos existentes no capítulo 1 e 2, uma vez que ainda não existe um método unificado para estes fins. Considera-se ainda que o método apresentou resultados muito interessantes, visto que todas as estratégias adotadas resultaram em ganhos significativos, incluindo o aumento da frequência de

ILC2 após o enriquecimento (8 vezes), células sorteadas com frequência 102 vezes maior do que era observado antes do sorteio, e uma viabilidade de 81,1% das células após o sorting.

Com o intuito de saber se as ILC2 de indivíduos infectados pelo *Schistosoma* possuem esse perfil de participação na imunopatologia da doença, no capítulo 2, foi mostrado que células linfoides inatas do tipo 2 isoladas de indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* produzem elevadas concentrações da citocina IL-13 após serem estimuladas pelas alarminas IL-25, IL-33 e TSLP. Considerando-se que esta citocina participa do processo de dano tecidual na fase crônica da doença, decidiu-se avaliar, indiretamente, o dano hepático nos indivíduos infectados residentes em área endêmica por meio das concentrações séricas das enzimas TGO, TGP, γ GT e ALP. Neste sentido, os resultados do capítulo 1, mostram que houve uma elevação em todas as enzimas avaliadas. Contudo, o coeficiente de Ritis, que permite prever a ocorrência de lesões profundas e crônicas, através de uma relação entre o TGO e TGP, sugeriu que 98,5% dos indivíduos estudados podem apresentar lesões crônicas a nível hepático (BOTROS e SIKARIS, 2013). Adicionalmente, estes indivíduos também apresentam outras evidências de processos danosos nessa região, que puderam também ser analisados através das enzimas γ GT e ALP. Neste estudo os valores elevados de γ GT também estiveram correlacionados com os valores de carga parasitária, especialmente nos homens que são os que apresentam maiores valores. Em relação à ALP, que permite a pesquisa de obstrução em ductos biliares, esta enzima também se mostrou elevada. Contudo, estes dados envolvendo γ GT e ALP, podem ser mais bem interpretados quando são analisados em conjunto. Assim como propuseram POPPER e SCHAFFNER (1970) e FONTANA e LOK (2002) estas duas enzimas possuem grande valia na determinação de dano celular hepático.

A hipótese de que as ILC2 participam da imunopatologia da doença também pode ser sugerida quando se analisa os resultados do capítulo 2, em que elas produzem elevadas concentrações de IL-13, juntamente com os resultados envolvendo a alarmina TSLP. Sempre referenciada como uma importante citocina na indução das ILC2, em conjunto com outras alarminas, o TSLP também sofreu uma redução após o tratamento da esquistossomose. Essa redução também se manteve com 180 dias após o tratamento. O TSLP é uma citocina que além de contribuir para a estimulação das ILC2 ao lado das outras alarminas, também contribui para o aumento da sobrevivência das ILC2, o que contribui para que elas possam causar ainda mais efeitos no tecido (CAMELO *et al.*, 2017). O fato de a citocina IL-13 produzida por ILC2 estar mais elevada no grupo de indivíduos infectados sugere que a elevação no TSLP sérico, que diminuiu após o tratamento, também possa contribuir para a doença.

Além da produção da citocina IL-13 por ILC2 estar mais elevada nos infectados pelo *S. mansoni*, como mostrado no capítulo 2, no capítulo 1 também foi possível encontrar esta citocina aumentada no soro dos indivíduos avaliados. Assim como ocorreu com o TSLP, a citocina IL-13 também sofreu uma diminuição após o tratamento. Outro dado muito interessante sobre estas ILC2, reside no fato de que o grupo de indivíduos infectados além de apresentar uma maior produção da citocina IL-13, também foi o que demonstrou maior expressão do receptor CRTH2. É importante ressaltar que a função deste receptor está diretamente relacionada com a produção de IL-13, mostrando o comprometimento dessas células com o perfil sugerido para elas em outras helmintíases (TANAKA *et al.*, 2004).

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Destaca-se o caráter pioneiro deste estudo em mostrar que o tratamento da esquistossomose, em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni* residentes em uma área endêmica, induz a redução da citocina TSLP, importante nos processos de tentativa de manutenção da homeostase tecidual.

Adicionalmente, a redução sérica da citocina IL-13, em indivíduos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, após o tratamento da esquistossomose sugere que ela provavelmente tenha um importante papel na imunopatologia da doença.

Conclui-se ainda que as ILC2 são uma importante fonte de IL-13 na esquistossomose mansônica humana, uma vez que as ILC2 de indivíduos infectados apresentam elevada produção da citocina *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ABT, M. C. *et al.* Innate Immune Defenses Mediated by Two ILC Subsets Are Critical for Protection against Acute Clostridium difficile Infection. **Cell Host Microbe**, v. 18, n. 1, p. 27-37, Jul 8 2015.

ALLAKHVERDI, Z. *et al.* CD34+ hemopoietic progenitor cells are potent effectors of allergic inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, v. 123, n. 2, p. 472-8, Feb 2009.

ALVES OLIVEIRA, L. F. *et al.* Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni in humans. **Infect Immun**, v. 74, n. 2, p. 1215-21, Feb 2006.

AMARAL, R. S. *et al.* An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 101 Suppl 1, p. 79-85, Sep 2006.

ANDRADE, Z. A. O problema da hepatite crônica na esquistossomose mansônica. **JB de Medicina Tropical**, v. 1, p. 19-26, 1965.

ARAUJO, M. I. *et al.* Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **Eur J Immunol**, v. 26, n. 6, p. 1399-403, Jun 1996.

ARAUJO, M. I. *et al.* Impaired T helper 2 response to aeroallergen in helminth-infected patients with asthma. **J Infect Dis**, v. 190, n. 10, p. 1797-803, Nov 15 2004.

BARNIG, C. *et al.* Lipoxin A4 regulates natural killer cell and type 2 innate lymphoid cell activation in asthma. **Sci Transl Med**, v. 5, n. 174, p. 174ra26, Feb 27 2013.

BARRETO, V. S. Alkaline phosphatase in schistosomiasis. **Ann Intern Med**, v. 74, n. 3, p. 450-1, Mar 1971.

BARTEMES, K. R. *et al.* Enhanced innate type 2 immune response in peripheral blood from patients with asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 134, n. 3, p. 671-678 e4, Sep 2014.

BECTON, D. A. C. **BD LSR II User's Guide**. USA: BD Biosciences 2007.

BERNINK, J. H. *et al.* Human type 1 innate lymphoid cells accumulate in inflamed mucosal tissues. **Nat Immunol**, v. 14, n. 3, p. 221-9, Mar 2013.

BEZMAN, N. A. *et al.* Molecular definition of the identity and activation of natural killer cells. **Nat Immunol**, v. 13, n. 10, p. 1000-9, Oct 2012.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J Leukoc Biol**, v. 81, n. 1, p. 1-5, Jan 2007.

BINA, J. C.; PRATA, A. [Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarèndi: I- Schistosoma mansoni infection and severe clinical forms]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 2, p. 211-6, Mar-Apr 2003.

BIO-RAD. Functioning of cell sorting mechanism. Bio-rad-antibodies.com, 2019. Disponível em: < <https://www.bio-rad-antibodies.com/flow-cytometry-electrostatic-cell-sorting.html> >. Acesso em: 2019.

BOOTH, M. *et al.* Micro-geographical variation in exposure to Schistosoma mansoni and malaria, and exacerbation of splenomegaly in Kenyan school-aged children. **BMC Infect Dis**, v. 4, p. 13, May 17 2004.

BOSSHARDT, S. C. *et al.* IL-10 deficit correlates with chronic, hypersplenomegaly syndrome in male CBA/J mice infected with Schistosoma mansoni. **Parasite Immunol**, v. 19, n. 8, p. 347-53, Aug 1997.

BOTROS, M.; SIKARIS, K. A. The de ritis ratio: the test of time. **Clin Biochem Rev**, v. 34, n. 3, p. 117-30, Nov 2013.

BOURKE, C. D. *et al.* Epidermal keratinocytes initiate wound healing and pro-inflammatory immune responses following percutaneous schistosome infection. **Int J Parasitol**, v. 45, n. 4, p. 215-24, Mar 2015.

BOYD, A. *et al.* Pleural cavity type 2 innate lymphoid cells precede Th2 expansion in murine Litomosoides sigmodontis infection. **Exp Parasitol**, v. 159, p. 118-26, Dec 2015.

BOYD, A.; RIBEIRO, J. M.; NUTMAN, T. B. Human CD117 (cKit)+ innate lymphoid cells have a discrete transcriptional profile at homeostasis and are expanded during filarial infection. **PLoS One**, v. 9, n. 9, p. e108649, 2014.

BRANDT, C. T. *et al.* Evaluation of the cytokines IL-10 and IL-13 as mediators in the progression of Symmers fibrosis in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Rev Col Bras Cir**, v. 37, n. 5, p. 333-7, Oct 2010.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação do Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose. Brasília, 2010. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinan/pce/cnv/pce.def> >. Acesso em: nov. 2019.

_____. Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos - 2017. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS), 2017. Disponível em: < <http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2017> >. Acesso em: nov. 2019.

BRAUN, L.; GRIMES, J. E. T.; TEMPLETON, M. R. The effectiveness of water treatment processes against schistosome cercariae: A systematic review. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 4, p. e0006364, Apr 2018.

BUONOCORE, S. *et al.* Innate lymphoid cells drive interleukin-23-dependent innate intestinal pathology. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1371-5, Apr 29 2010.

CAMELO, A. *et al.* IL-33, IL-25, and TSLP induce a distinct phenotypic and activation profile in human type 2 innate lymphoid cells. **Blood Adv**, v. 1, n. 10, p. 577-589, Apr 11 2017.

CELLA, M. *et al.* A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. **Nature**, v. 457, n. 7230, p. 722-5, Feb 5 2009.

CERNY, J.; STRIZ, I. Adaptive innate immunity or innate adaptive immunity? **Clin Sci (Lond)**, v. 133, n. 14, p. 1549-1565, Jul 31 2019.

CHANG, Y. J. *et al.* Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. **Nat Immunol**, v. 12, n. 7, p. 631-8, May 29 2011.

CHEEVER, A. W. Quantitative comparison of the intensity of *Schistosoma mansoni* infections in man and experimental animals. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 63, n. 6, p. 781-95, 1969.

CHEEVER, A. W.; DEWITT, W. B.; WARREN, K. S. Repeated Infection and Treatment of Mice with *Schistosoma Mansoni*: Functional, Anatomic and Immunologic Observations. **Am J Trop Med Hyg**, v. 14, p. 239-53, Mar 1965.

CHEEVER, A. W.; HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol Today**, v. 21, n. 9, p. 465-6, Sep 2000.

CHEEVER, A. W. *et al.* Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. **J Immunol**, v. 153, n. 2, p. 753-9, Jul 15 1994.

CHEN, G. Y.; NUNEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 12, p. 826-37, Dec 2010.

CHEVILLARD, C. *et al.* IFN-gamma polymorphisms (IFN-gamma +2109 and IFN-gamma +3810) are associated with severe hepatic fibrosis in human hepatic schistosomiasis (*Schistosoma mansoni*). **J Immunol**, v. 171, n. 10, p. 5596-601, Nov 15 2003.

CHIARAMONTE, M. G. *et al.* An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type 2-dominated inflammatory response. **J Clin Invest**, v. 104, n. 6, p. 777-85, Sep 1999.

CHIARAMONTE, M. G. *et al.* Regulation and function of the interleukin 13 receptor alpha 2 during a T helper cell type 2-dominant immune response. **J Exp Med**, v. 197, n. 6, p. 687-701, Mar 17 2003.

CHUAH, C. *et al.* Defining a pro-inflammatory neutrophil phenotype in response to schistosome eggs. **Cell Microbiol**, v. 16, n. 11, p. 1666-77, Nov 2014.

COSMI, L. *et al.* CRTH2 is the most reliable marker for the detection of circulating human type 2 Th and type 2 T cytotoxic cells in health and disease. **Eur J Immunol**, v. 30, n. 10, p. 2972-9, Oct 2000.

COSSARIZZA, A. *et al.* Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. **Eur J Immunol**, v. 47, n. 10, p. 1584-1797, Oct 2017.

CUPEDO, T. *et al.* Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells. **Nat Immunol**, v. 10, n. 1, p. 66-74, Jan 2009.

DALYS, G. B. D.; COLLABORATORS, H. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 333 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **Lancet**, v. 390, n. 10100, p. 1260-1344, Sep 16 2017.

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

DE MORAIS, C. N. *et al.* Studies on the production and regulation of interleukin, IL-13, IL-4 and interferon-gamma in human Schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97 Suppl 1, p. 113-4, 2002.

DE SOUZA RDA, P. *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. 394981, 2012.

DEELDER, A. M. *et al.* Detection of schistosome antigen in mummies. **Lancet**, v. 335, n. 8691, p. 724-5, Mar 24 1990.

DEMEURE, C. E. *et al.* Resistance to Schistosoma mansoni in humans: influence of the IgE/IgG4 balance and IgG2 in immunity to reinfection after chemotherapy. **J Infect Dis**, v. 168, n. 4, p. 1000-8, Oct 1993.

DHARIWAL, J. *et al.* Mucosal Type 2 Innate Lymphoid Cells Are a Key Component of the Allergic Response to Aeroallergens. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 195, n. 12, p. 1586-1596, Jun 15 2017.

DIEFENBACH, A.; COLONNA, M.; KOYASU, S. Development, differentiation, and diversity of innate lymphoid cells. **Immunity**, v. 41, n. 3, p. 354-65, Sep 18 2014.

DOHERTY, T. A. *et al.* Allergen challenge in allergic rhinitis rapidly induces increased peripheral blood type 2 innate lymphoid cells that express CD84. **J Allergy Clin Immunol**, v. 133, n. 4, p. 1203-5, Apr 2014.

DOUCET, C. *et al.* Interleukin (IL) 4 and IL-13 act on human lung fibroblasts. Implication in asthma. **J Clin Invest**, v. 101, n. 10, p. 2129-39, May 15 1998.

DUERR, C. U. *et al.* Type I interferon restricts type 2 immunopathology through the regulation of group 2 innate lymphoid cells. **Nat Immunol**, v. 17, n. 1, p. 65-75, Jan 2016.

DUNNE, D. W. *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, Jun 1992.

DUNNE, D. W.; COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune disease. **Nat Rev Immunol**, v. 5, n. 5, p. 420-6, May 2005.

EGESA, M. *et al.* Schistosoma mansoni schistosomula antigens induce Th1/Pro-inflammatory cytokine responses. **Parasite Immunol**, v. 40, n. 12, p. e12592, Dec 2018.

ELTAWIL, K. M. Theodor Maximillian Bilharz (1825-1862): the discover of schistosomiasis. **International Journal of Parasitology Research**, nov. 2019 2011.

EVERTS, B. *et al.* Schistosome-derived omega-1 drives Th2 polarization by suppressing protein synthesis following internalization by the mannose receptor. **J Exp Med**, v. 209, n. 10, p. 1753-67, S1, Sep 24 2012.

FAIRFAX, K. *et al.* Th2 responses in schistosomiasis. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 6, p. 863-71, Nov 2012.

FAIRFAX, K. C. *et al.* IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. **PLoS Pathog**, v. 8, n. 1, p. e1002490, Jan 2012.

FALLON, P. G. *et al.* Identification of an interleukin (IL)-25-dependent cell population that provides IL-4, IL-5, and IL-13 at the onset of helminth expulsion. **J Exp Med**, v. 203, n. 4, p. 1105-16, Apr 17 2006.

FALLON, P. G. *et al.* Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **J Immunol**, v. 164, n. 5, p. 2585-91, Mar 1 2000.

FAROOQ, M.; SAMAN, S. A.; NIELSEN, J. Assessment of severity of disease caused by Schistosoma haematobium and S. mansoni in the Egypt-49 project area. **Bull World Health Organ**, v. 35, n. 3, p. 389-404, 1966.

FERNANDES, J. S. *et al.* Monocyte subsets in schistosomiasis patients with periportal fibrosis. **Mediators Inflamm**, v. 2014, p. 703653, 2014.

FONTANA, R. J.; LOK, A. S. Noninvasive monitoring of patients with chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 36, n. 5 Suppl 1, p. S57-64, Nov 2002.

FORT, M. M. *et al.* IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. **Immunity**, v. 15, n. 6, p. 985-95, Dec 2001.

FUCHS, A. *et al.* Intraepithelial type 1 innate lymphoid cells are a unique subset of IL-12- and IL-15-responsive IFN-gamma-producing cells. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 769-81, Apr 18 2013.

GAFFEN, S. L. Structure and signalling in the IL-17 receptor family. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 8, p. 556-67, Aug 2009.

GAFFEN, S. L. *et al.* The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. **Nat Rev Immunol**, v. 14, n. 9, p. 585-600, Sep 2014.

GEIGER, T. L. *et al.* Nfil3 is crucial for development of innate lymphoid cells and host protection against intestinal pathogens. **J Exp Med**, v. 211, n. 9, p. 1723-31, Aug 25 2014.

GENTEK, R. *et al.* Modulation of Signal Strength Switches Notch from an Inducer of T Cells to an Inducer of ILC2. **Front Immunol**, v. 4, p. 334, 2013.

GERBE, F. *et al.* Intestinal epithelial tuft cells initiate type 2 mucosal immunity to helminth parasites. **Nature**, v. 529, n. 7585, p. 226-30, Jan 14 2016.

GIERA, M. *et al.* The Schistosoma mansoni lipidome: Leads for immunomodulation. **Anal Chim Acta**, v. 1037, p. 107-118, Dec 11 2018.

GODFRAIND, C. *et al.* Intraepithelial infiltration by mast cells with both connective tissue-type and mucosal-type characteristics in gut, trachea, and kidneys of IL-9 transgenic mice. **J Immunol**, v. 160, n. 8, p. 3989-96, Apr 15 1998.

GOMES CASAVECHIA, M. T. *et al.* Systematic review and meta-analysis on Schistosoma mansoni infection prevalence, and associated risk factors in Brazil. **Parasitology**, v. 145, n. 8, p. 1000-1014, Jul 2018.

GRANT, A. V. *et al.* Functional polymorphisms in IL13 are protective against high Schistosoma mansoni infection intensity in a Brazilian population. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35863, 2012.

GROGAN, J. L. *et al.* Antigen-specific proliferation and interferon-gamma and interleukin-5 production are down-regulated during Schistosoma haematobium infection. **J Infect Dis**, v. 177, n. 5, p. 1433-7, May 1998.

GRYSEELS, B. *et al.* Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, n. 9541, p. 1106-18, Sep 23 2006.

GRZYCH, J. M. *et al.* Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v. 146, n. 4, p. 1322-7, Feb 15 1991.

HAGAN, P. *et al.* Human IgE, IgG4 and resistance to reinfection with *Schistosoma haematobium*. **Nature**, v. 349, n. 6306, p. 243-5, Jan 17 1991.

HALIM, T. Y. *et al.* Lung natural helper cells are a critical source of Th2 cell-type cytokines in protease allergen-induced airway inflammation. **Immunity**, v. 36, n. 3, p. 451-63, Mar 23 2012.

HALIM, T. Y. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells are critical for the initiation of adaptive T helper 2 cell-mediated allergic lung inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 425-35, Mar 20 2014.

HAMS, E. *et al.* Cutting edge: IL-25 elicits innate lymphoid type 2 and type II NKT cells that regulate obesity in mice. **J Immunol**, v. 191, n. 11, p. 5349-53, Dec 1 2013.

HATZ, C. F. The use of ultrasound in schistosomiasis. **Adv Parasitol**, v. 48, p. 225-84, 2001.

HAZENBERG, M. D.; SPITS, H. Human innate lymphoid cells. **Blood**, v. 124, n. 5, p. 700-9, Jul 31 2014.

HEPWORTH, M. R. *et al.* Innate lymphoid cells regulate CD4⁺ T-cell responses to intestinal commensal bacteria. **Nature**, v. 498, n. 7452, p. 113-7, Jun 6 2013.

HERBERT, D. R. *et al.* IL-10 and TGF- β redundantly protect against severe liver injury and mortality during acute schistosomiasis. **J Immunol**, v. 181, n. 10, p. 7214-20, Nov 15 2008.

HERVE, M. *et al.* Pivotal roles of the parasite PGD2 synthase and of the host D prostanoid receptor 1 in schistosome immune evasion. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 10, p. 2764-72, Oct 2003.

HESSE, M. *et al.* NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. **Am J Pathol**, v. 157, n. 3, p. 945-55, Sep 2000.

HESSE, M. *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 the pattern of L-arginine metabolism. **J Immunol**, v. 167, n. 11, p. 6533-44, Dec 1 2001.

HIRAI, H. *et al.* Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. **J Exp Med**, v. 193, n. 2, p. 255-61, Jan 15 2001.

HOFFMANN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. 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. 6406-16, Jun 15 2000.

HOFFMANN, K. F.; WYNN, T. A.; DUNNE, D. W. Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. **Adv Parasitol**, v. 52, p. 265-307, 2002.

HOGG, K. G. *et al.* Interleukin-12 p40 secretion by cutaneous CD11c⁺ and F4/80⁺ cells is a major feature of the innate immune response in mice that develop Th1-mediated protective immunity to *Schistosoma mansoni*. **Infect Immun**, v. 71, n. 6, p. 3563-71, Jun 2003.

HOKKE, C. H.; FITZPATRICK, J. M.; HOFFMANN, K. F. Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of *Schistosoma* biology. **Trends Parasitol**, v. 23, n. 4, p. 165-74, Apr 2007.

HOPKINS, D. R. *et al.* Dracunculiasis, onchocerciasis, schistosomiasis, and trachoma. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1136, p. 45-52, 2008.

HOWITT, M. R. *et al.* Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. **Science**, v. 351, n. 6279, p. 1329-33, Mar 18 2016.

HUANG, T. *et al.* Depletion of major pathogenic cells in asthma by targeting CRTh2. **JCI Insight**, v. 1, n. 7, p. e86689, May 19 2016.

HUANG, Y. *et al.* IL-25-responsive, lineage-negative KLRG1(hi) cells are multipotential 'inflammatory' type 2 innate lymphoid cells. **Nat Immunol**, v. 16, n. 2, p. 161-9, Feb 2015.

HUANG, Y.; PAUL, W. E. Inflammatory group 2 innate lymphoid cells. **Int Immunol**, v. 28, n. 1, p. 23-8, Jan 2016.

HUGHES, T. *et al.* Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22⁺ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue. **Immunity**, v. 32, n. 6, p. 803-14, Jun 25 2010.

HUNG, L. Y. *et al.* IL-33 drives biphasic IL-13 production for noncanonical Type 2 immunity against hookworms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 1, p. 282-7, Jan 2 2013.

IWAKURA, Y. *et al.* Functional specialization of interleukin-17 family members. **Immunity**, v. 34, n. 2, p. 149-62, Feb 25 2011.

JACKSON, D. J. *et al.* IL-33-dependent type 2 inflammation during rhinovirus-induced asthma exacerbations in vivo. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 190, n. 12, p. 1373-82, Dec 15 2014.

JANDL, K.; HEINEMANN, A. The therapeutic potential of CRTH2/DP2 beyond allergy and asthma. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v. 133, p. 42-48, Nov 2017.

JANKOVIC, D. *et al.* Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. **J Immunol**, v. 163, n. 1, p. 337-42, Jul 1 1999.

JANKOVIC, D. *et al.* Optimal vaccination against *Schistosoma mansoni* requires the induction of both B cell- and IFN-gamma-dependent effector mechanisms. **J Immunol**, v. 162, n. 1, p. 345-51, Jan 1 1999.

JIANG, M. *et al.* ILC2s Induce Adaptive Th2-Type Immunity in Acute Exacerbation of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. **Mediators Inflamm**, v. 2019, p. 3140183, 2019.

JIANG, M. *et al.* Type 2 innate lymphoid cells participate in IL-33-stimulated Th2-associated immune response in chronic obstructive pulmonary disease. **Exp Ther Med**, v. 18, n. 4, p. 3109-3116, Oct 2019.

JIZ, M. *et al.* Immunoglobulin E (IgE) responses to paramyosin predict resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum* and are attenuated by IgG4. **Infect Immun**, v. 77, n. 5, p. 2051-8, May 2009.

KABATEREINE, N. B. *et al.* Epidemiology and morbidity of *Schistosoma mansoni* infection in a fishing community along Lake Albert in Uganda. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 98, n. 12, p. 711-8, Dec 2004.

KAMAL, S. M. *et al.* Kinetics of intrahepatic hepatitis C virus (HCV)-specific CD4+ T cell responses in HCV and *Schistosoma mansoni* coinfection: relation to progression of liver fibrosis. **J Infect Dis**, v. 189, n. 7, p. 1140-50, Apr 1 2004.

KATO, A. Group 2 Innate Lymphoid Cells in Airway Diseases. **Chest**, v. 156, n. 1, p. 141-149, Jul 2019.

KATZ, N. The discovery of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 69-71, Nov-Dec 2008.

KATZ, N. **Inquérito nacional de prevalência da esquistossomose mansoni e geo-helminthos**. FIOCRUZ, C.-. Belo Horizonte: 90 p. 2018.

KELLY, E. A.; COLLEY, D. G. In vivo effects of monoclonal anti-L3T4 antibody on immune responsiveness of mice infected with *Schistosoma mansoni*. Reduction of irradiated cercariae-induced resistance. **J Immunol**, v. 140, n. 8, p. 2737-45, Apr 15 1988.

KIM, C. H.; HASHIMOTO-HILL, S.; KIM, M. Migration and Tissue Tropism of Innate Lymphoid Cells. **Trends Immunol**, v. 37, n. 1, p. 68-79, Jan 2016.

KING, C. H. *et al.* Low heritable component of risk for infection intensity and infection-associated disease in urinary schistosomiasis among Wadigo village populations in Coast Province, Kenya. **Am J Trop Med Hyg**, v. 70, n. 1, p. 57-62, Jan 2004.

KING, C. L. *et al.* B cell sensitization to helminthic infection develops in utero in humans. **J Immunol**, v. 160, n. 7, p. 3578-84, Apr 1 1998.

KLEIN WOLTERINK, R. G. *et al.* Pulmonary innate lymphoid cells are major producers of IL-5 and IL-13 in murine models of allergic asthma. **Eur J Immunol**, v. 42, n. 5, p. 1106-16, May 2012.

KLOETZEL, K. A suggestion for the prevention of severe clinical forms of schistosomiasis mansoni. **Bull World Health Organ**, v. 37, n. 4, p. 686-7, 1967.

KLOSE, C. S. *et al.* Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. **Cell**, v. 157, n. 2, p. 340-56, Apr 10 2014.

KLOSE, C. S. *et al.* A T-bet gradient controls the fate and function of CCR6-RORgammat+ innate lymphoid cells. **Nature**, v. 494, n. 7436, p. 261-5, Feb 14 2013.

KLOSE, C. S. N. *et al.* Differentiation of type 1 ILCs from a common progenitor to all helper-like innate lymphoid cell lineages. **Cell**, v. 157, n. 2, p. 340-356, Apr 10 2014.

KOURILOVA, P. *et al.* Cercarial dermatitis caused by bird schistosomes comprises both immediate and late phase cutaneous hypersensitivity reactions. **J Immunol**, v. 172, n. 6, p. 3766-74, Mar 15 2004.

KOYASU, S.; MORO, K. Role of innate lymphocytes in infection and inflammation. **Front Immunol**, v. 3, p. 101, 2012.

KRUSCHEWSKY, R. A. *et al.* Immunological Profile in Individuals with Schistosomal Myeloradiculopathy. **Neuroimmunomodulation**, v. 23, n. 3, p. 157-167, 2016.

KUKA, M.; ASHWELL, J. D. A method for high purity sorting of rare cell subsets applied to TDC. **J Immunol Methods**, v. 400-401, p. 111-6, Dec 31 2013.

KUNTZ, R. E. Biology of the schistosome complexes. **Am J Trop Med Hyg**, v. 4, n. 3, p. 383-413, May 1955.

LA FLAMME, A. C. *et al.* IL-4 plays a crucial role in regulating oxidative damage in the liver during schistosomiasis. **J Immunol**, v. 166, n. 3, p. 1903-11, Feb 1 2001.

LEE, C. G. *et al.* Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). **J Exp Med**, v. 194, n. 6, p. 809-21, Sep 17 2001.

LEWIS, F. A.; TUCKER, M. S. Schistosomiasis. **Adv Exp Med Biol**, v. 766, p. 47-75, 2014.

LI, D. *et al.* IL-33 promotes ST2-dependent lung fibrosis by the induction of alternatively activated macrophages and innate lymphoid cells in mice. **J Allergy Clin Immunol**, v. 134, n. 6, p. 1422-1432 e11, Dec 2014.

LICONA-LIMON, P. *et al.* TH2, allergy and group 2 innate lymphoid cells. **Nat Immunol**, v. 14, n. 6, p. 536-42, Jun 2013.

LIEW, F. Y.; PITMAN, N. I.; MCINNES, I. B. Disease-associated functions of IL-33: the new kid in the IL-1 family. **Nat Rev Immunol**, v. 10, n. 2, p. 103-10, Feb 2010.

- LIU, F. *et al.* New perspectives on host-parasite interplay by comparative transcriptomic and proteomic analyses of *Schistosoma japonicum*. **PLoS Pathog**, v. 2, n. 4, p. e29, Apr 2006.
- LUCI, C. *et al.* Influence of the transcription factor ROR γ on the development of NKp46⁺ cell populations in gut and skin. **Nat Immunol**, v. 10, n. 1, p. 75-82, Jan 2009.
- LUO, X. *et al.* Changes in NK and NKT cells in mesenteric lymph nodes after a *Schistosoma japonicum* infection. **Parasitol Res**, v. 113, n. 3, p. 1001-9, Mar 2014.
- MAAZI, H. *et al.* Activated plasmacytoid dendritic cells regulate type 2 innate lymphoid cell-mediated airway hyperreactivity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 141, n. 3, p. 893-905 e6, Mar 2018.
- MACHADO, P. A. The Brazilian program for schistosomiasis control, 1975-1979. **Am J Trop Med Hyg**, v. 31, n. 1, p. 76-86, Jan 1982.
- MAGALHAES, A. *et al.* Cytokine profile associated with human chronic schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 21-6, 2004.
- MALLEVAEY, T. *et al.* Activation of invariant NKT cells by the helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **J Immunol**, v. 176, n. 4, p. 2476-85, Feb 15 2006.
- MARTINS-MELO, F. R. *et al.* The burden of Neglected Tropical Diseases in Brazil, 1990-2016: A subnational analysis from the Global Burden of Disease Study 2016. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 6, p. e0006559, Jun 2018.
- MCHEDLIDZE, T. *et al.* IL-27 suppresses type 2 immune responses in vivo via direct effects on group 2 innate lymphoid cells. **Mucosal Immunol**, v. 9, n. 6, p. 1384-1394, Nov 2016.
- MCHEDLIDZE, T. *et al.* Interleukin-33-dependent innate lymphoid cells mediate hepatic fibrosis. **Immunity**, v. 39, n. 2, p. 357-71, Aug 22 2013.
- MCKEE, A. S.; PEARCE, E. J. CD25⁺CD4⁺ cells contribute to Th2 polarization during helminth infection by suppressing Th1 response development. **J Immunol**, v. 173, n. 2, p. 1224-31, Jul 15 2004.
- MCSORLEY, H. J. *et al.* Blockade of IL-33 release and suppression of type 2 innate lymphoid cell responses by helminth secreted products in airway allergy. **Mucosal Immunol**, v. 7, n. 5, p. 1068-78, Sep 2014.
- MJOSBERG, J. M. *et al.* Human IL-25- and IL-33-responsive type 2 innate lymphoid cells are defined by expression of CCR4 and CD161. **Nat Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1055-62, Sep 11 2011.
- MODOLELL, M. *et al.* Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. **Eur J Immunol**, v. 25, n. 4, p. 1101-4, Apr 1995.

MOHAPATRA, A. *et al.* Group 2 innate lymphoid cells utilize the IRF4-IL-9 module to coordinate epithelial cell maintenance of lung homeostasis. **Mucosal Immunol**, v. 9, n. 1, p. 275-86, Jan 2016.

MONNERET, G. *et al.* Prostaglandin D2 is a potent chemoattractant for human eosinophils that acts via a novel DP receptor. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1942-8, Sep 15 2001.

MONTENEGRO, S. M. *et al.* Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **J Infect Dis**, v. 179, n. 6, p. 1502-14, Jun 1999.

MONTICELLI, L. A. *et al.* Innate lymphoid cells promote lung-tissue homeostasis after infection with influenza virus. **Nat Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1045-54, Nov 2011.

MORO, K. *et al.* Interferon and IL-27 antagonize the function of group 2 innate lymphoid cells and type 2 innate immune responses. **Nat Immunol**, v. 17, n. 1, p. 76-86, Jan 2016.

MORO, K. *et al.* Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. **Nature**, v. 463, n. 7280, p. 540-4, Jan 28 2010.

MOSMANN, T. R. *et al.* Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol**, v. 136, n. 7, p. 2348-57, Apr 1 1986.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu Rev Immunol**, v. 7, p. 145-73, 1989.

MOUAHID, G. *et al.* Transplantation of schistosome sporocysts between host snails: A video guide. **Wellcome Open Res**, v. 3, p. 3, 2018.

NAGATA, K. *et al.* CRTH2, an orphan receptor of T-helper-2-cells, is expressed on basophils and eosinophils and responds to mast cell-derived factor(s). **FEBS Lett**, v. 459, n. 2, p. 195-9, Oct 8 1999.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, Dec 19-26 2002.

NAUSCH, N. *et al.* Group 2 innate lymphoid cell proportions are diminished in young helminth infected children and restored by curative anti-helminthic treatment. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 3, p. e0003627, Mar 2015.

NEILL, D. R. *et al.* Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. **Nature**, v. 464, n. 7293, p. 1367-70, Apr 29 2010.

NOVATO-SILVA, E.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D. G. Immune responses during human schistosomiasis mansoni. XVIII. Immunologic status of pregnant women and their neonates. **Scand J Immunol**, v. 35, n. 4, p. 429-37, Apr 1992.

NUSSBAUM, J. C. *et al.* Type 2 innate lymphoid cells control eosinophil homeostasis. **Nature**, v. 502, n. 7470, p. 245-8, Oct 10 2013.

OCHIAI, S. *et al.* Thymic stromal lymphopoietin drives the development of IL-13(+) Th2 cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 115, n. 5, p. 1033-1038, Jan 30 2018.

OESER, K.; SCHWARTZ, C.; VOEHRINGER, D. Conditional IL-4/IL-13-deficient mice reveal a critical role of innate immune cells for protective immunity against gastrointestinal helminths. **Mucosal Immunol**, v. 8, n. 3, p. 672-82, May 2015.

OGUMA, T.; ASANO, K.; ISHIZAKA, A. Role of prostaglandin D(2) and its receptors in the pathophysiology of asthma. **Allergol Int**, v. 57, n. 4, p. 307-12, Dec 2008.

OLIPHANT, C. J. *et al.* MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. **Immunity**, v. 41, n. 2, p. 283-95, Aug 21 2014.

OLIVEIRA, R. R. *et al.* Factors associated with resistance to *Schistosoma mansoni* infection in an endemic area of Bahia, Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 86, n. 2, p. 296-305, Feb 2012.

OLVEDA, D. U.; MCMANUS, D. P.; ROSS, A. G. Mass drug administration and the global control of schistosomiasis: successes, limitations and clinical outcomes. **Curr Opin Infect Dis**, v. 29, n. 6, p. 595-608, Dec 2016.

OPPENHEIM, J. J.; YANG, D. Alarmins: chemotactic activators of immune responses. **Curr Opin Immunol**, v. 17, n. 4, p. 359-65, Aug 2005.

ORIENTE, A. *et al.* Interleukin-13 modulates collagen homeostasis in human skin and keloid fibroblasts. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 292, n. 3, p. 988-94, Mar 2000.

PATTON, E. A. *et al.* Central role for interleukin-4 in regulating nitric oxide-mediated inhibition of T-cell proliferation and gamma interferon production in schistosomiasis. **Infect Immun**, v. 70, n. 1, p. 177-84, Jan 2002.

PEARCE, E. J. Priming of the immune response by schistosome eggs. **Parasite Immunol**, v. 27, n. 7-8, p. 265-70, Jul-Aug 2005.

PEARCE, E. J. *et al.* Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J Exp Med**, v. 173, n. 1, p. 159-66, Jan 1 1991.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 7, p. 499-511, Jul 2002.

PELLY, V. S. *et al.* IL-4-producing ILC2s are required for the differentiation of TH2 cells following *Heligmosomoides polygyrus* infection. **Mucosal Immunol**, v. 9, n. 6, p. 1407-1417, Nov 2016.

PEREIRA, L. F. *et al.* Clinical and laboratory evaluation of schistosomiasis mansoni patients in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 449-53, Jul 2010.

PEREIRA, L. M. *et al.* Specific liver autoreactivity in schistosomiasis mansoni. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 91, n. 3, p. 310-4, May-Jun 1997.

PESCE, J. *et al.* The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. **J Clin Invest**, v. 116, n. 7, p. 2044-55, Jul 2006.

PETTIPHER, R. *et al.* Pharmacologic profile of OC000459, a potent, selective, and orally active D prostanoid receptor 2 antagonist that inhibits mast cell-dependent activation of T helper 2 lymphocytes and eosinophils. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 340, n. 2, p. 473-82, Feb 2012.

POHL, A. *et al.* Serum aminotransferase levels and platelet counts as predictors of degree of fibrosis in chronic hepatitis C virus infection. **Am J Gastroenterol**, v. 96, n. 11, p. 3142-6, Nov 2001.

PONICHTERA, H. E. *et al.* CD209a expression on dendritic cells is critical for the development of pathogenic Th17 cell responses in murine schistosomiasis. **J Immunol**, v. 192, n. 10, p. 4655-65, May 15 2014.

POPPER, H.; SCHAFFNER, F. Pathophysiology of cholestasis. **Hum Pathol**, v. 1, n. 1, p. 1-24, Mar 1970.

POWELL, N. *et al.* The transcription factor T-bet regulates intestinal inflammation mediated by interleukin-7 receptor+ innate lymphoid cells. **Immunity**, v. 37, n. 4, p. 674-84, Oct 19 2012.

PRICE, A. E. *et al.* Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 25, p. 11489-94, Jun 22 2010.

QIU, J. *et al.* The aryl hydrocarbon receptor regulates gut immunity through modulation of innate lymphoid cells. **Immunity**, v. 36, n. 1, p. 92-104, Jan 27 2012.

RAMALINGAM, T. R. *et al.* Regulation of helminth-induced Th2 responses by thymic stromal lymphopoietin. **J Immunol**, v. 182, n. 10, p. 6452-9, May 15 2009.

RANKIN, L. C. *et al.* Complementarity and redundancy of IL-22-producing innate lymphoid cells. **Nat Immunol**, v. 17, n. 2, p. 179-86, Feb 2016.

REIMAN, R. M. *et al.* Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. **Infect Immun**, v. 74, n. 3, p. 1471-9, Mar 2006.

RIBEIRO DE JESUS, A. *et al.* Human immune responses to *Schistosoma mansoni* vaccine candidate antigens. **Infect Immun**, v. 68, n. 5, p. 2797-803, May 2000.

RIHET, P. *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, Nov 1991.

RINER, D. K. *et al.* Regulation of innate responses during pre-patent schistosome infection provides an immune environment permissive for parasite development. **PLoS Pathog**, v. 9, n. 10, p. e1003708, 2013.

RITTER, M. *et al.* IL-4/5 signalling plays an important role during *Litomosoides sigmodontis* infection, influencing both immune system regulation and tissue pathology in the thoracic cavity. **Int J Parasitol**, v. 47, n. 14, p. 951-960, Dec 2017.

RIVEAU, G. *et al.* Safety and immunogenicity of rSh28GST antigen in humans: phase 1 randomized clinical study of a vaccine candidate against urinary schistosomiasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 7, p. e1704, 2012.

ROCHMAN, Y. *et al.* Thymic stromal lymphopoietin-mediated STAT5 phosphorylation via kinases JAK1 and JAK2 reveals a key difference from IL-7-induced signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 45, p. 19455-60, Nov 9 2010.

ROSS, A. G. *et al.* Schistosomiasis. **N Engl J Med**, v. 346, n. 16, p. 1212-20, Apr 18 2002.

ROYER, J. F. *et al.* A novel antagonist of CRTH2 blocks eosinophil release from bone marrow, chemotaxis and respiratory burst. **Allergy**, v. 62, n. 12, p. 1401-9, Dec 2007.

SADLER, C. H. *et al.* IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *Schistosoma mansoni*. **Eur J Immunol**, v. 33, n. 4, p. 880-8, Apr 2003.

SATOH-TAKAYAMA, N. *et al.* Microbial flora drives interleukin 22 production in intestinal NKp46+ cells that provide innate mucosal immune defense. **Immunity**, v. 29, n. 6, p. 958-70, Dec 19 2008.

SATTI, M. Z. *et al.* Specific immunoglobulin measurements related to exposure and resistance to *Schistosoma mansoni* infection in Sudanese canal cleaners. **Clin Exp Immunol**, v. 106, n. 1, p. 45-54, Oct 1996.

SAÚDE, M. D. **Vigilância da esquistossomose mansoni - diretrizes técnicas**. TRANSMISSÍVEIS, D. D. V. D. D. Brasília: 140 p. 2014.

_____. **Guia de vigilância em saúde**. Brasília. Volume único 2017.

SAWA, S. *et al.* Lineage relationship analysis of ROR γ mat+ innate lymphoid cells. **Science**, v. 330, n. 6004, p. 665-9, Oct 29 2010.

SCHMIDT, J. A. *et al.* Biochemical and pharmacological characterization of AZD1981, an orally available selective DP2 antagonist in clinical development for asthma. **Br J Pharmacol**, v. 168, n. 7, p. 1626-38, Apr 2013.

SHER, A. *et al.* Production of IL-10 by CD4⁺ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. **J Immunol**, v. 147, n. 8, p. 2713-6, Oct 15 1991.

SHIRASAKI, H. *et al.* Accumulation of CRTH2-positive leukocytes in human allergic nasal mucosa. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 102, n. 2, p. 110-5, Feb 2009.

SILVA-TEIXEIRA, D. N. *et al.* Gender-related cytokine patterns in sera of schistosomiasis patients with Symmers' fibrosis. **Clin Diagn Lab Immunol**, v. 11, n. 3, p. 627-30, May 2004.

SONG, E. *et al.* Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. **Cell Immunol**, v. 204, n. 1, p. 19-28, Aug 25 2000.

SONNENBERG, G. F. *et al.* Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. **Science**, v. 336, n. 6086, p. 1321-5, Jun 8 2012.

SONNENBERG, G. F. *et al.* CD4(+) lymphoid tissue-inducer cells promote innate immunity in the gut. **Immunity**, v. 34, n. 1, p. 122-34, Jan 28 2011.

SPENCER, S. P. *et al.* Adaptation of innate lymphoid cells to a micronutrient deficiency promotes type 2 barrier immunity. **Science**, v. 343, n. 6169, p. 432-7, Jan 24 2014.

SPITS, H. *et al.* Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature. **Nat Rev Immunol**, v. 13, n. 2, p. 145-9, Feb 2013.

SPITS, H.; DI SANTO, J. P. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. **Nat Immunol**, v. 12, n. 1, p. 21-7, Jan 2011.

STEINMANN, P. *et al.* Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 7, p. 411-25, Jul 2006.

STINSON, S. E.; AMRANI, Y.; BRIGHTLING, C. E. D prostanoid receptor 2 (chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells) protein expression in asthmatic patients and its effects on bronchial epithelial cells. **J Allergy Clin Immunol**, v. 135, n. 2, p. 395-406, Feb 2015.

TAKATORI, H. *et al.* Lymphoid tissue inducer-like cells are an innate source of IL-17 and IL-22. **J Exp Med**, v. 206, n. 1, p. 35-41, Jan 16 2009.

TANAKA, K. *et al.* Effects of prostaglandin D2 on helper T cell functions. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 316, n. 4, p. 1009-14, Apr 16 2004.

TANRIVER, Y.; DIEFENBACH, A. Transcription factors controlling development and function of innate lymphoid cells. **Int Immunol**, v. 26, n. 3, p. 119-28, Mar 2014.

TAYLOR, B. C. *et al.* TSLP regulates intestinal immunity and inflammation in mouse models of helminth infection and colitis. **J Exp Med**, v. 206, n. 3, p. 655-67, Mar 16 2009.

TEMANN, U. A.; RAY, P.; FLAVELL, R. A. Pulmonary overexpression of IL-9 induces Th2 cytokine expression, leading to immune pathology. **J Clin Invest**, v. 109, n. 1, p. 29-39, Jan 2002.

TENDLER, M.; SIMPSON, A. J. The biotechnology-value chain: development of Sm14 as a schistosomiasis vaccine. **Acta Trop**, v. 108, n. 2-3, p. 263-6, Nov-Dec 2008.

THARMALINGAM, T. *et al.* Pluronic enhances the robustness and reduces the cell attachment of mammalian cells. **Mol Biotechnol**, v. 39, n. 2, p. 167-77, Jun 2008.

THIO, C. L. *et al.* Toll-like receptor 9-dependent interferon production prevents group 2 innate lymphoid cell-driven airway hyperreactivity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 144, n. 3, p. 682-697 e9, Sep 2019.

TOWNSEND, J. M. *et al.* IL-9-deficient mice establish fundamental roles for IL-9 in pulmonary mastocytosis and goblet cell hyperplasia but not T cell development. **Immunity**, v. 13, n. 4, p. 573-83, Oct 2000.

TROUILLER, P. *et al.* Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**, v. 359, n. 9324, p. 2188-94, Jun 22 2002.

TUNDUP, S. *et al.* CD14 influences host immune responses and alternative activation of macrophages during *Schistosoma mansoni* infection. **Infect Immun**, v. 82, n. 8, p. 3240-51, Aug 2014.

TURNER, J. E. *et al.* IL-9-mediated survival of type 2 innate lymphoid cells promotes damage control in helminth-induced lung inflammation. **J Exp Med**, v. 210, n. 13, p. 2951-65, Dec 16 2013.

VENNERVALD, B. J. *et al.* Detailed clinical and ultrasound examination of children and adolescents in a *Schistosoma mansoni* endemic area in Kenya: hepatosplenic disease in the absence of portal fibrosis. **Trop Med Int Health**, v. 9, n. 4, p. 461-70, Apr 2004.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. *et al.* Schistosome transcriptome: insights and perspectives for functional genomics. **Trends Parasitol**, v. 20, n. 7, p. 304-8, Jul 2004.

VIANA, M. *et al.* The effects of subcurative praziquantel treatment on life-history traits and trade-offs in drug-resistant *Schistosoma mansoni*. **Evol Appl**, v. 11, n. 4, p. 488-500, Apr 2018.

VIVIER, E. *et al.* Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44-9, Jan 7 2011.

VOSSHENRICH, C. A. *et al.* A thymic pathway of mouse natural killer cell development characterized by expression of GATA-3 and CD127. **Nat Immunol**, v. 7, n. 11, p. 1217-24, Nov 2006.

WALKER, A. J. Insights into the functional biology of schistosomes. **Parasit Vectors**, v. 4, p. 203, Oct 20 2011.

WARREN, K. S. The pathology, pathobiology and pathogenesis of schistosomiasis. **Nature**, v. 273, n. 5664, p. 609-12, Jun 22 1978.

WHO. **Diseases of poverty and the 10/90 gap**: World Health Organization: 3-12 p. 2004.

_____. Status of schistosomiasis endemic countries: 2016. Map and Statistics 2016. Disponível em: < http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/sch/sch.html >. Acesso em: nov. 2019.

_____. Schistosomiasis. World Health Organization, 2019 2019. Disponível em: < <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis> >. Acesso em: nov. 2019.

WILHELM, C. *et al.* An IL-9 fate reporter demonstrates the induction of an innate IL-9 response in lung inflammation. **Nat Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1071-7, Nov 2011.

WILLIAMS, A. L.; HOOFNAGLE, J. H. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. Relationship to cirrhosis. **Gastroenterology**, v. 95, n. 3, p. 734-9, Sep 1988.

WILSON, M. S. *et al.* IL-10 blocks the development of resistance to re-infection with *Schistosoma mansoni*. **PLoS Pathog**, v. 7, n. 8, p. e1002171, Aug 2011.

WILSON, M. S. *et al.* Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol**, v. 85, n. 2, p. 148-54, Feb-Mar 2007.

WOJNO, E. D. *et al.* The prostaglandin D(2) receptor CRTH2 regulates accumulation of group 2 innate lymphoid cells in the inflamed lung. **Mucosal Immunol**, v. 8, n. 6, p. 1313-23, Nov 2015.

WYNN, T. A. IL-13 effector functions. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 425-56, 2003.

WYNN, T. A. *et al.* An IL-12-based vaccination method for preventing fibrosis induced by schistosome infection. **Nature**, v. 376, n. 6541, p. 594-6, Aug 17 1995.

WYNN, T. A. *et al.* IL-10 regulates liver pathology in acute murine *Schistosomiasis mansoni* but is not required for immune down-modulation of chronic disease. **J Immunol**, v. 160, n. 9, p. 4473-80, May 1 1998.

XUE, L. *et al.* Prostaglandin D2 activates group 2 innate lymphoid cells through chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on TH2 cells. **J Allergy Clin Immunol**, v. 133, n. 4, p. 1184-94, Apr 2014.

YASUDA, K. *et al.* Contribution of IL-33-activated type II innate lymphoid cells to pulmonary eosinophilia in intestinal nematode-infected mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 109, n. 9, p. 3451-6, Feb 28 2012.

YOSHIMURA-UCHIYAMA, C. *et al.* Differential modulation of human basophil functions through prostaglandin D2 receptors DP and chemoattractant receptor-homologous molecule expressed on Th2 cells/DP2. **Clin Exp Allergy**, v. 34, n. 8, p. 1283-90, Aug 2004.

YU, Q. N. *et al.* ILC2 frequency and activity are inhibited by glucocorticoid treatment via STAT pathway in patients with asthma. **Allergy**, v. 73, n. 9, p. 1860-1870, Sep 2018.

YU, S. *et al.* Innate lymphoid cells and asthma. **J Allergy Clin Immunol**, v. 133, n. 4, p. 943-50; quiz 51, Apr 2014.

YUDANIN, N. A. *et al.* Spatial and Temporal Mapping of Human Innate Lymphoid Cells Reveals Elements of Tissue Specificity. **Immunity**, v. 50, n. 2, p. 505-519 e4, Feb 19 2019.

ZHANG, Z. *et al.* Association between IgE antibody against soluble egg antigen and resistance to reinfection with *Schistosoma japonicum*. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 91, n. 5, p. 606-8, Sep-Oct 1997.

ZHAO, A. *et al.* Dependence of IL-4, IL-13, and nematode-induced alterations in murine small intestinal smooth muscle contractility on Stat6 and enteric nerves. **J Immunol**, v. 171, n. 2, p. 948-54, Jul 15 2003.

ZIEGLER, S. F.; LIU, Y. J. Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. **Nat Immunol**, v. 7, n. 7, p. 709-14, Jul 2006.