



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FRANCISCO JOSÉ DE ABREU OLIVEIRA

**EFEITO IMUNOPATOLÓGICO DE CO-INFECÇÃO DE
CAMUNDONGOS COM *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*
E COM *SCHISTOSOMA MANSONI***

Londrina
2014

FRANCISCO JOSÉ DE ABREU OLIVEIRA

**EFEITO IMUNOPATOLÓGICO DE CO-INFECÇÃO DE
CAMUNDONGOS COM *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS*
E COM *SCHISTOSOMA MANSONI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano.

Londrina
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

O48e Oliveira, Francisco José de Abreu.

Efeito imunopatológico de co-infecção de camundongos com *Paracoccidioides brasiliensis* e com *Schistosoma mansoni* / Francisco José de Abreu Oliveira.
– Londrina, 2014.
93 f. : il.

Orientador: Eiko Nakagawa Itano.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina,
Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2014.
Inclui bibliografia.

1. Paracoccidioidomicose – Teses. 2. Esquistossomose mansonica – Teses.
3. Citocinas – Teses. 4. Fungos – Teses. 5. Helminto – Teses. I. Itano, Eiko Nagagawa.
II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 616.993

FRANCISCO JOSÉ DE ABREU OLIVEIRA

**EFEITO IMUNOPATOLÓGICO DE CO-INFECÇÃO DE
CAMUNDONGOS COM *PARACOCCIDIOIDES BRASILIENSIS* E COM
*SCHISTOSOMA MANSONI***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito final para obtenção do título de Doutor em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ana Lucia Falavigna Guilherme
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Profa. Dra. Maria Claudia Noronha Dutra de
Menezes
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Gerson Nakazato
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de abril de 2014.

O presente trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Imunologia Aplicada e de Parasitologia Experimental do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina com o apoio da Fundação Araucária/PR e CAPES.

Dedicatória

A minha família, em especial a minha esposa Vânia e a meus filhos, Pedro Antonio e Maria Julia que nas horas da minha ausência, com amor e compreensão me apoiaram para cumprir mais esta etapa da minha vida. Aos meus pais Antônio “in memorian” e Maria de Lourdes por terem me ensinado verdadeiros valores.

AGRADECIMENTOS

A **Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano**, pela aceitação de orientar-me, por suas considerações e críticas que permitiram a elaboração desta tese além da construção de um conhecimento científico, amizade e confiança.

A Profa. Dra. Maria Claudia Noronha Dutra de Menezes, pelas contribuições na banca de qualificação, pelas colaborações, carinho e respeito demonstrado pelo meu trabalho, que me fortaleceram com sua energia e incentivo constantes.

À Universidade Estadual de Londrina, ao Departamento de Ciências Patológicas e aos amigos da disciplina de Parasitologia Dra. Ivete Conchon Costa, Dra. Regina Mitsuka Breganó, Dr. Wander Pavanelli e Dra. Idessania Nazareth da Costa, pela oportunidade concedida.

A Mari Sumigawa Kaminami e Nilson de Jesus Carlos pelo incentivo, paciência, amizade e colaboração técnica, fatores inestimáveis na fase experimental do presente trabalho.

A Profa. Ms. Vânia Darlene Rampazzo Bachega de Oliveira, que além de esposa foi uma incentivadora e companheira constante durante a realização deste trabalho, pelo seu exemplo de ética e dedicação profissional.

Ao colega de laboratório Pedro Sebastião Raimundo Dionizio Filho, pela dedicação diária, colaboração sempre atenciosa e apoio técnico na realização da parte experimental deste trabalho.

Ao técnico Adernaldo dos Santos pela valorosa ajuda recebida durante a realização do presente trabalho.

A coordenação e aos membros do curso de Pós-graduação em Microbiologia pelo apoio nas horas mais difíceis, e aos professores que compreenderam a importância deste trabalho para a melhoria do ensino.

Aos colegas do curso de Doutorado em Microbiologia, pela convivência, solidariedade e amizade mútua.

À Paula Leonello Alvares e Silva, pela sua valorosa contribuição na realização da parte experimental do presente trabalho. Obrigado aos colegas do laboratório de Imunologia Luciene Nagashima Airy Nagashima, Fabiana Felipin Rigobello, João Paulo Assolini, Tânia Maris Pedrini Soares da Costa e Franciele Ayumi Semencio Chiyoda que possibilitaram a concretização do presente trabalho.

À Profa. Dra. Lucia Falavignha Guilherme da Universidade Estadual de Maringá por providenciar a cepa de *Schistosoma mansoni* e dos caramujos *Biomphalaria glabrata* nos momentos mais difíceis para a realização da parte experimental.

Ao médico patologista Dr. Jefferson Crespigio pela colaboração nos diagnósticos histopatológicos deste trabalho.

A Dra. Flavia Alessandra Guarnier pelo auxílio e no ensinamento nos programas em estatística.

E a cada um em especial, um desejo de expressar o meu carinho e gratidão pela conclusão deste trabalho.

OLIVEIRA, Francisco José Abreu. **Efeito imunopatológico de co-infecção de camundongos com *Paracoccidioides brasiliensis* e com *Schistosoma mansoni***. 2014. 93f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2014.

RESUMO

A Paracoccidioidomicose (PCM), uma das mais importantes micoses da América Latina, é uma doença sistêmica de natureza granulomatosa, causada pelo fungo dimórfico *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), e a sua principal defesa está ligada ao padrão Th1 da resposta imune. A esquistossomose é considerada uma das doenças endêmicas mais importantes e mais difundidas do mundo, constituindo-se de um grande problema de saúde pública. No Brasil, a doença é causada por *Schistosoma mansoni* (Sm), e é caracterizada por resposta imune Th2. As principais lesões patológicas na esquistossomose mansônica são decorrentes de desenvolvimento de granulomas em torno de ovos no fígado devido à resposta imune do hospedeiro. Ambas as doenças são crônicas, com sobreposição geográfica em várias regiões no Brasil, possibilitando assim a co-infecção com esses agentes. Considerando a inexistência de dados sobre efeito imunopatológico na PCM e na esquistossomose, associada à infecção crônica com *P. brasiliensis* e com *S. mansoni* na fase de oviposição, caracterizada pela resposta Th2, o presente trabalho investigou efeito dessa associação utilizando modelo experimental murino. Camundongos Balb/c foram infectados com *P. brasiliensis* durante 70 (Pb70) ou 80 dias (Pb80) e associados com *S. mansoni* infectados durante 42 (Pb70Sm42) e ou 52 dias (Pb80Sm52) ou somente com *S. mansoni* durante 42 (Sm42) ou 52 dias (Sm52). Para a investigação de efeito da co-infecção na PCM, foram realizadas determinação da carga fúngica por CFU no fígado e pulmão, histopatologia de fígado e determinação de níveis de citocinas (IFN- γ , TGF- β , TNF- α , IL-4, IL-10 e IL-17) no fígado e determinação de níveis séricos de anticorpos IgG anti-*P. brasiliensis* (ExoAg) e citocinas séricas (IFN- γ , IL-4, TGF- β e IL-10), por ELISA, tendo como controles grupos Pb70 e Pb80. Para a investigação de efeito de co-infecção na esquistossomose foram determinados números de ovos no fígado e intestino (grosso e delgado) e de ovos fecais, análise histopatológica do fígado, determinação das citocinas no fígado e soro e níveis séricos de anticorpos IgG para antígeno solúvel de ovos (SEA), tendo como controles os grupos Sm42 e Sm52. Os resultados obtidos demonstraram aumento nos números de CFUs de *P. brasiliensis* no fígado (Pb70Sm42 e Pb80Sm52) e no pulmão (Pb80Sm52) em relação ao controle mono-infectado, Pb70 ou Pb80, ($p < 0,05$). Os níveis de todas as citocinas no fígado foram maiores no grupo Pb70Sm42 que o controle Sm42 ($p < 0,05$), exceto IFN- γ que resultou em menor nível ($p < 0,05$). Na fase mais prolongada de infecção, foi detectada alteração nesse perfil, resultando em menor nível de IL-10 e TNF- α em Pb80Sm52, mantendo o perfil para IL-4 e IL-17. Os níveis séricos de IL-4 e IL-10 demonstraram perfil similar ao de fígado, enquanto que o nível de IFN- γ , de forma distinta ao de fígado, foi maior em ambos os grupos co-infectadas (Pb70Sm42 e Pb80Sm52), em relação aos seus controles ($p < 0,05$). Foi detectado também aumento no nível sérico de TGF- β em grupo Pb80Sm52 em relação ao controle ($p < 0,05$). O nível sérico de IgG anti-ExoAg foi maior apenas no grupo Pb70Sm42 em relação ao Pb70 ($p < 0,05$). Os resultados de co-infecção na esquistossomose demonstraram reduções nos números de ovos no fígado, intestino e fezes ($p < 0,05$), diminuição no número e no tamanho de granulomas hepáticos ($p < 0,05$). Os níveis de citocinas IL-4, IL-10 e de TNF- α no fígado foram menores em ambos os grupos co-infectados (Pb70Sm42 e Pb80Sm52) e o de TGF- β somente no grupo Pb70Sm42, em relação aos seus respectivos controles ($p < 0,05$). Por outro lado o nível de IFN- γ foi maior no grupo co-infectado Pb80Sm52, em relação ao Sm52 ($p < 0,05$). Os níveis séricos de IFN- γ e IL-10

demonstraram perfil similar ao de fígado em ambos os grupos co-infectados, o mesmo ocorrendo com TGF- β , no grupo Pb70Sm52, todavia foi observado aumento significativo de TGF- β em co-infecção mais prolongada (Pb80Sm52), em relação ao controle ($p < 0,05$). Em contraste com o de fígado, foi detectado nível sérico elevado de IL-4 no grupo co-infectado (Pb80Sm52) em relação ao controle ($p < 0,05$). O nível sérico de IgG anti-SEA foi maior no grupo Pb70Sm42 e menor no Pb80Sm52 em relação a cada controle ($p < 0,05$). Em conclusão, a forma crônica de PCM doença se torna mais grave quando associada à infecção com *S. mansoni* principalmente na fase de oviposição de *S. mansoni* e, a co-infecção a induz modulação distinta de níveis de citocinas no fígado e no soro. Além disso, a co-infecção na fase inicial de oviposição de *S. mansoni* pode induzir aumento na resposta imune humoral específica aos antígenos de *P. brasiliensis*. Se essas modulações de resposta imune estão associadas com a gravidade da PCM doença, requer estudos adicionais. Na esquistossomose mansônica, a co-infecção com *P. brasiliensis* induz redução no número de ovos no fígado, com diminuição no tamanho de granulomas hepático bem como decréscimo no número de ovos nas mucosas intestinais ou nas fezes, o que poderia favorecer o hospedeiro. Por outro lado, também induz modulação de citocinas local (fígado) ou sistêmica e supressão de resposta humoral aos antígenos de ovos de *S. mansoni* o que poderia ser prejudicial ao hospedeiro, o que requer também estudos adicionais. Em conjunto, a co-infecção de *P. brasiliensis* e *S. mansoni* induz mutuamente modulações de citocinas e anticorpos que podem afetar ambas as doenças, PCM e esquistossomose.

Palavras-chave: imunomodulação, paracoccidiodomicoses, esquistossomose, citocinas, fungo, helminto.

OLIVEIRA, Francisco José Abreu. **Immunopathological effect of co-infection of mice with *Paracoccidioides brasiliensis* and *Schistosoma mansoni***. 2014. 93f. Thesis in Microbiology – State University of Londrina, Londrina. 2014.

ABSTRACT

The paracoccidioidomycosis (PCM), one of the most important mycosis in Latin America, is a systemic granulomatous nature disease caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb), and their main defense is linked to Th1 immune response. Schistosomiasis is considered one of the most important and widespread endemic diseases in the world, becoming a major public health problem. In Brazil, the disease is caused by *Schistosoma mansoni* (Sm), and is characterized by Th2 immune response. The main pathological lesions in schistosomiasis are due to development of granulomas around eggs in the liver owing to the host immune response. Both diseases are chronic, with geographical overlap in several regions in Brazil, thus enabling co-infection with these agents. Considering the lack of data on immunopathological effect on PCM and schistosomiasis associated with chronic infection with *P. brasiliensis* and *S. mansoni* oviposition phase, characterized by Th2 response, this study investigated the effect of this association using murine experimental model. Balb/c mice were infected with *P. brasiliensis* for 70 (Pb70) or 80 days (Pb80) and associated with *S. mansoni* infected for 42 (Pb70Sm42) and or 52 days (Pb80Sm52) or only with *S. mansoni* for 42 (Sm42) or 52 days (Sm52). To investigate the effect of co-infection in PCM, it was performed the fungal burden by CFU in the liver and lung, liver histopathology and determination of liver cytokines levels (IFN- γ , TGF- β , TNF- α , IL-4, IL-10 e IL-17), and serum IgG anti-*P. brasiliensis* (ExoAg) and serum cytokines (IFN- γ , IL-4, TGF- β and IL-10) levels determination, by ELISA, by using Pb70 and Pb80 as control groups. To investigate the effect of co-infection in schistosomiasis, it was performed the eggs counts on the liver and intestine (thick and thin) and stool samples, liver histopathological analysis, determination of liver and serum cytokines levels and serum antibodies IgG to soluble egg (SEA) antigen levels by using Sm42 and Sm52 as control groups. The results showed an increase in the number of liver (Pb70Sm42 and Pb80Sm52) and lung (Pb80Sm52) *P. brasiliensis* CFUs in co-infected than mono-infected, control Pb70 or Pb80 group ($p < 0.05$). The levels of all liver cytokines analyzed were higher in co-infected Pb70Sm42 group ($p < 0.05$), except IFN- γ which resulted in lower than control ($p < 0.05$). In more prolonged phase of infection, we detected alterations in this profile. The lower levels of IL-10 and TNF- α in Pb80Sm52 than control were detected, while the profile for IL-4 and IL-17 was maintained. Serum levels of IL-4 and IL-10 showed similar profile to the liver, but the serum IFN- γ level was higher in both co-infected groups (Pb70Sm42 and Pb80Sm52) compared to each control ($p < 0.05$). Increased TGF- β (Pb80Sm52) and also IgG anti-ExoAg (Pb70Sm42) serum levels ($p < 0.05$) were detected in comparison to each control group. The co-infection in schistosomiasis resulted in reductions of the numbers of eggs in the liver, intestines and stool ($p < 0.05$) and also decreasing in the number and size of hepatic granulomas ($p < 0.05$). The levels of IL-4, IL-10 and TNF- α in the liver were lower in both co-infected groups (Pb70Sm42 and Pb80Sm52) and for TGF- β only in Pb70Sm42 group as compared to respective controls ($p < 0.05$). On the other hand, the IFN- γ level was higher in co-infected group Pb80Sm52 in relation to Sm52 ($p < 0.05$). Serum IFN- γ and IL-10 levels presented a similar profile to the liver in both co-infected groups, the same occurring with TGF- β in Pb70Sm52 group, but significant increase of TGF- β was observed in more prolonged period of co-infection (Pb80Sm52), compared to control ($p < 0.05$). Unlike liver, higher serum IL-4 level was detected in co-infected group

(Pb80Sm52) compared to control ($p < 0.05$). Serum IgG anti-SEA was higher in Pb70Sm42 and lower in Pb80Sm52 group compared to its respective control ($p < 0.05$). In conclusion, the PCM chronic form of the disease becomes more severe when associated with *S. mansoni* co-infection, especially during *S. mansoni* oviposition phase and, co-infection induces a different modulation of cytokine levels in liver and serum. In addition, co-infection at the early stage of *S. mansoni* oviposition may induce increased humoral immune response to specific antigens of *P. brasiliensis*. If these immune responses modulations are associated with PCM disease severity, requires additional studies. In schistosomiasis mansoni, the co-infection with *P. brasiliensis* induces a reduction in eggs number as well as a decrease in the size of granulomas in the liver. This occurrence could favor the host. On the other hand, the cytokines modulation and suppression of antibody response to *S. mansoni* eggs antigens could be harmful to the host, which requires further study. Taken all together, the co-infection of *P. brasiliensis* and *S. mansoni* mutually induces modulations of cytokines and antibodies that could affect both disease, PCM and schistosomiasis.

Key-words: immune modulation, paracoccidioidomycosis, schistosomiasis, cytokines, fungus, helminth.

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito 1

Figure 1.	Liver (1A) and Lung (1B) <i>P. brasiliensis</i> Colony-Forming Units in group of mice infected with <i>P. brasiliensis</i>	68
Figure 2.	Diameter of <i>P. brasiliensis</i> granulomas in liver tissue	68
Figure 3.	Serum IgG Anti- <i>P. brasiliensis</i> ExoAg Levels	69
Figure 4.	Cytokines profile in the serum	70
Figure 5.	Cytokines profile in liver tissue samples	71
Figure 6.	Liver histopathology	72

Manuscrito 2

Figure 1.	<i>S. mansoni</i> egg load	85
Figure 2.	<i>S. mansoni</i> egg granuloma number and size and liver mass	86
Figure 3.	Liver cytokine levels	87
Figure 4.	Serum cytokine levels	88
Figure 5.	Serum anti- <i>S. mansoni</i> soluble egg antigen (SEA) IgG levels	89
Figure 6.	<i>S. mansoni</i> and <i>P. brasiliensis</i> granulomas in the liver	90

LISTA DE SIGLAS

%	Porcentagem
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
Aids	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
CD4⁺	Marcador de superfície celular da sub-população de linfócito T. auxiliar
CFU	Unidade formadora de colônias
D.O.	Densidade óptica
Dcs	Celulas dendríticas
DHT	Reação de hipersensibilidade tardia
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ExoAg	Exoantígeno
Fc	Fragmento cristalizável da molécula de imunoglobulina
gp30	Glicoproteína de 30 kDa de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
gp43	Glicoproteína de peso molecular 43 kDa de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
gp70	Glicoproteína de 70 kDa de <i>Paracoccidioides brasiliensis</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HCV	Vírus da Hepatite C
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
IFN-γ	Interferon – gamma
IgE	Imunoglobulina da classe E
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG1	Imunoglobulina subclasse 1
IgG4	Imunoglobulina subclasse 4
IL	Interleucina
kDa	Quilodalton
m	Metro
MEC	Matriz Extracelular
MHC-II	Molécula do complexo principal de histocompatibilidade classe II
mm	Milímetro

mm³	Milímetro cúbico
NK	Células matadoras naturais - Célula “Natural Killer”
NO	Óxido nítrico
°C	Graus Celsius
OPD	O-fenileno-diamina
P.	<i>Paracoccidoides</i>
Pb	<i>Paracoccidoides brasiliensis</i>
Pb18	<i>Paracoccidoides brasiliensis</i> cepa 18
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCM	Paracoccidiodomicose
S.	<i>Schistosoma</i>
SEA	Antígeno solúvel do ovo de <i>Schistosoma mansoni</i>
Sm	<i>Schistosoma mansoni</i>
SWAP	Antígeno solúvel do verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>
TGF-β	Fator de transformação do crescimento Beta
Th1	Linfócitos T auxiliares que secretam citocinas do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares que secretam citocinas do tipo 2.
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
WHO	World Health Organization - Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Aspectos Gerais da Paracoccidiodomicose	16
1.2. Agente Etiológico e Fatores de Virulência	16
1.3. Manifestações Clínicas	20
1.4. Aspectos Imunológicos	23
1.5. Modelos experimentais utilizados no estudo da PCM	26
1.6. Paracoccidiodomicoses e doenças associadas	27
1.7. Aspectos gerais da Esquistossomose mansoni	29
1.8. Aspectos imunológicos	33
1.9. Modelos experimentais utilizados no estudo da Esquistossomose mansoni	35
1.10. Esquistossomose mansoni e doenças associadas	37
2. OBJETIVOS	42
2.1. Objetivo Geral	42
2.2. Objetivos Específicos	42
3. REFERÊNCIAS	43
4. MANUSCRITO 1	58
5. MANUSCRITO 2	73
6. CONCLUSÕES	91
7. ANEXO	93

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais da Paracoccidioidomicose

Os fungos são caracterizados por serem agentes comuns em todo ecossistema, onde são organismos de vida livre e saprobiótica, desempenhando um papel fundamental ao ser um dos constituintes da base das cadeias e teias alimentares, fazendo a decomposição da matéria orgânica. Estes microrganismos possuem um importante papel na saúde dos animais, causando desde micoses classificadas como cutâneas até micoses sistêmicas (MURRAY et al., 2004; SCHAECHTER et al., 2002).

Embora existam aproximadamente 100.000 espécies fúngicas, apenas um pequeno grupo causa micose sistêmica humana (SAN-BLAS; NIÑO-VEGA, 2004). Os fungos dimórficos são os responsáveis pela maior parte das infecções fúngicas sistêmicas de humanos e outros mamíferos (RAPPEYE; GOLDMAN, 2006).

A partir de 1930, os estudos sobre paracoccidioidomicose (PCM) e seu agente etiológico o fungo *Paracoccidioides brasiliensis*, intensificaram-se devido a vários fatores, como: os avanços da imunologia; o aparecimento de drogas para o tratamento da doença; e a descoberta do dimorfismo do fungo, o qual passou a ser analisado também por microscopia eletrônica, o que possibilitou melhor compreensão de sua biologia celular (LACAZ, 1994).

1.2. Agente Etiológico e Fatores de Virulência

O fungo *Paracoccidioides brasiliensis* (Pb) apresenta duas formas: a forma de micélio (M) e a forma de levedura (Y). A forma de micélio, é encontrada na natureza, a uma temperatura de 25°C, produz colônias de crescimento lento (3-4 semanas) que, sob o microscópio, apresentam-se como hifas septadas com clamidósporos. Essa forma é a infectante do fungo. A forma de levedura está presente no tecido do hospedeiro, exsudado e cresce em cultura a 37°C (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008), que ao exame do microscópico apresenta-se como estruturas ovóides ou arredondadas, de dupla parede refringente, com aspecto morfológico característico de “roda de leme” e com diâmetro

variável de 1-30 μm (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991; LACAZ et al., 2002) e se reproduzem por gemulação. Esta transição morfológica é determinada pela temperatura ambiente e está correlacionado com a invasão do hospedeiro (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

A diferença de micélio para levedura, *in vitro*, se inicia com um aumento de diâmetro e nos espaços intraseptais das hifas. Há o espaçamento da parede celular da levedura, as células apresentam brotamentos múltiplos e se multiplicam rapidamente. Na diferenciação inversa, hifas alongadas são formadas a partir de leveduras ovaladas. Nos dois casos as células não se diferenciam todas ao mesmo tempo, podendo ser encontradas formas de transição (SAN-BLAS; NIÑO-VEJA; ITURRIAGA, 2002).

A PCM foi descoberta há quase um século, mas o habitat natural do fungo *P. brasiliensis* e sua ecologia continuam a ser um enigma. Solo ou plantas são acreditados serem o habitat natural do *P. brasiliensis*, e os trabalhadores rurais parecem ser infectados por inalação de poeira contendo os propágulos infectantes (COSTA et al., 2010).

P. brasiliensis foi isolado a partir de tatus (*Dasypus novemcinctus*) e diretamente a partir do solo. Morcegos e sagüis, pequenos macacos da floresta do sudeste do Brasil, são os possíveis reservatórios naturais. Infecção por *P. brasiliensis* também tem sido relatada em espécies de animais domésticos, como cães, galinhas, gados e cavalos por meio de detecção de anticorpos específicos a *P. brasiliensis* (LUPI et al., 2005; CONTI-DIAZ, 2007; OLIVEIRA et al., 2011). Segundo Lupi et al. (2005) os mesmos devem ser considerados hospedeiros acidentais e não reservatórios naturais do fungo, pois os mesmos podem ser acometidos com a doença. E ambos os animais e homens adquirirão o patógeno por aspiração.

A parede celular de *P. brasiliensis* varia em composição segundo sua forma, e é constituída de lipídios e proteínas, com proporção maior de cisteína/cistina na fase miceliar em relação à fase leveduriforme (MARQUES, 1998). Além desses constituintes existem, também, os polissacarídeos α - (1,3) – glucana e β - (1,3) – glucana e os antígenos extracelulares como as glicoproteínas de 43 kDa (gp43), de 70 kDa (gp70) e de 30 kDa (gp30), todos considerados exemplos de importantes fatores de virulência (HOGAN; KLEIN; LEVITZ, 1996; MATTOS GROSSO et al., 2003; ANDREOTTI et al., 2005, MARQUES, 2012).

O polissacarídeo α - (1,3) – glucana predomina na forma leveduriforme, enquanto que na morfologia micelial ocorre principalmente a β - (1,3) – glucana. Estudos sugerem que a α - (1,3) – glucana protege o fungo de enzimas digestivas presentes em macrófagos e outros leucócitos (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008), sendo sua presença correlacionada com a virulência do fungo ao promover o mecanismo de escape do hospedeiro (MARQUES, 2012) e que a β - (1,3) – glucana é digerida pela enzima β – glucanase produzida pelos fagócitos humanos (SAN-BLAS, 1993).

A gp43 é um importante fator de virulência de *P. brasiliensis*. Além de se ligar a laminina, aumentando a aderência do fungo à matriz extracelular contribuindo com a invasão tecidual (MARQUES, 2012), inibe a expressão do MHC-II e a função macrofágica, sendo, assim, importante para a sua evasão da resposta imunológica do hospedeiro (FERREIRA; ALMEIDA, 2006). A gp43 funciona como um antígeno reconhecido pela maior parte dos pacientes (100% dos soros) com PCM, apresentando-se em altas concentrações na forma aguda (juvenil) e desaparecendo do sangue circulante nas condições em que é favorável a evolução do quadro clínico do hospedeiro (MARTINEZ, 2004), sendo assim considerado um relevante marcador sorológico para o diagnóstico e para o acompanhamento dos pacientes submetidos a tratamento farmacológico e monitoramento de pacientes com PCM (MARTINEZ, 2004, MARQUES et al., 2004).

Outro fator de virulência é a gp70 reconhecida por 96% dos soros de pacientes. Esse constituinte inibi a fagocitose do fungo, induzida pela via receptor de manose e receptor de porção Fc de imunoglobulina (FcR), e induz diminuição na liberação de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (MATTOS GROSSO et al., 2003).

A gp30 e suas características de adesão foram publicadas pela primeira vez por Andreotti et al. (2005) que evidenciaram que a gp30 tem a capacidade de adesão e está relacionada com a virulência de *P. brasiliensis*.

A PCM tem sido relatada como uma doença autóctone do sul do México até o norte da Argentina, restrita ao continente Americano. Não há relato de casos autóctones em Belize e Nicarágua, na América Central, ou no Chile, Guiana, Guiana Francesa e Suriname, na América do Sul (MARQUES, 2012a; MARQUES 2012). É a infecção fúngica sistêmica mais prevalente no Brasil, mas seu impacto sobre a saúde pública não foi totalmente avaliada devido à falta de dados disponíveis (BELLISSIMO-RODRIGUES; MACHADO; MARTINEZ, 2011).

Testes de sensibilidade intradérmica com paracoccidioidina mostram níveis de cerca de 10% da população dos países mais afetados; outros dados estimam que a incidência anual em áreas endêmicas varie de 1 a 3 casos novos para 100.000 habitantes. A ausência de uma notificação compulsória dos casos de PCM impede a existência de dados precisos sobre a gravidade da doença no Brasil. As informações disponíveis baseiam-se em relatos de inquéritos e de séries de casos. (COUTINHO et al., 2002; SHIKANAI-YASUDA et al., 2006). As taxas de mortalidade e letalidade atribuídas à PCM torna possível estimar que 3.360 novos casos ocorram anualmente no Brasil (BELLISSIMO-RODRIGUES; MACHADO; MARTINEZ, 2011).

A distribuição geográfica desse fungo está diretamente relacionada com o clima. A maioria dos casos ocorre no trópico ou áreas subtropicais com solos ácidos e com temperaturas variando de 17°C a 24°C, em altitudes entre o nível do mar e 1.500 m, e com chuvas entre 500 e 2.500 mm/ano. Nesses ambientes, o fungo existe como um saprófita de plantas e solos (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008). Em países endêmicos, as residências dos pacientes podem ser associadas a áreas caracterizadas por uma atmosfera úmida (altos índices pluviométricos, presença de florestas úmidas, e hidrovias), mais estável e temperaturas amenas (suaves) (RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012).

A PCM é relativamente rara em crianças e adolescentes com aproximadamente 2% de todos os pacientes, sendo menor de 10 anos de idade e 8% menor de 20 anos de idade. Em uma contagem de crianças e adolescentes (menor de 14 anos de idade), menos de 15% de todos os casos, se enquadram nesta faixa etária. A PCM é a infecção mais comum em homens de meia-idade (40-60 anos). Um ligeiro desvio deste padrão é observado em pacientes co-infectados com HIV que são mais jovens do que os restantes adultos (RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012).

Em uma recente revisão de mais de 5.000 casos de PCM, Shankar et al. (2011) constataram que 91,8% eram do sexo masculino e apenas 8,2% do sexo feminino. Já em crianças com menos de 10 anos não foram notadas nenhuma diferença entre os gêneros em contradição com a predominância de pacientes adultos do sexo masculino. Embora a prevalência ligeiramente diferente por sexo fosse visto em uma série de mil casos do Brasil, com 85,8% do sexo masculino e 14,2% do sexo feminino, é claro que a predominância masculina é a regra. Sabe-se que os hormônios do sexo feminino, 17 β -estradiol, impede a conversão do fungo de micélio para levedura, indicando assim, a existência de influências

hormonais, provavelmente atuando em cooperação com as respostas imunitárias celulares mais fortes presentes nas fêmeas (RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012).

É difícil apontar uma tendência racial nas áreas endêmicas, pois são muito comuns raças mistas. Imigrantes em áreas endêmicas costumam desenvolver uma doença grave, indicativo de sua maior suscetibilidade ao fungo *P. brasiliensis* (RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012).

Dentre os indivíduos acometidos pela PCM, a maior incidência dos casos ocorre com maior predomínio em profissões ou atividades que tenham contato direto com o solo contaminado pelo fungo, observados principalmente em trabalhadores rurais, onde a grande maioria exerceu atividade agrícola nas duas primeiras décadas de vida (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008). Outros fatores de risco como alcoolismo e o tabagismo estão frequentemente associados, ao agravamento desta micose. A prevalência de tabagismo é de quase 100% em pacientes com a forma crônica do adulto da PCM. Além disso, chama a atenção à desnutrição associada à micose (WANKE et al., 2005).

1.3. Manifestações Clínicas

Ainda não foi determinada com precisão a via pela qual os indivíduos se infectam com o fungo *P. brasiliensis*, entretanto, várias evidências clínicas e experimentais indicam que a infecção ocorre por meio da inalação de propágulos da forma miceliana do fungo conhecidos como conídios (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; MARQUES, 1998). A PCM não é transmitida de pessoa a pessoa, pois na temperatura corporal, o fungo está na forma leveduriforme (RESTREPO-MORENO, 1993; SILVA et al., 2000; SOUTO et al., 2000, ALMEIDA, 2005).

Após a instalação, inicialmente nos pulmões, os conídios se transformam em leveduras e podem ser fagocitados por macrófagos residentes. A partir de então as leveduras podem ser eliminadas por células do sistema imune (macrófagos ativados); se multiplicar ativamente causando a morte das células hospedeiras, com liberação de inúmeras leveduras, assim poderão então infectar novas células; e por vias linfáticas e principalmente hematogênicas com possível disseminação para outros órgãos, ou então se manter em uma forma latente, que poderá se manifestar tardiamente (BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993; ALMEIDA, 2005; WANKE; AIDÊ, 2009).

No hospedeiro o sítio de infecção primária da PCM, que muitas vezes não é aparente, é o pulmão. A infecção primária é quase sempre subclínica em indivíduos imunocompetentes. Se o hospedeiro torna-se imunodeprimido, uma reativação tardia subsequente resulta em infecção crônica dos pulmões ou de outros órgãos, especialmente os tecidos mucoso e cutâneo, os linfonodos, as adrenais e o sistema nervoso central (ALMEIDA, 2005).

O fungo após atingir os pulmões, no hospedeiro, é drenado para os linfonodos regionais, estabelecendo uma lesão linfática satélite. As lesões de inoculações e linfática regional formam o chamado “complexo primário”, que pode: 1) regredir, com a destruição do fungo e a formação de cicatrizes estéreis; 2) regredir com a permanência de fungos viáveis no interior das cicatrizes, formando focos quiescentes, 3) progredir, com o aparecimento de sinais e sintomas da PCM (MONTENEGRO; FRANCO, 1994).

Quando baseada na resposta imunológica dos pacientes, a PCM tem sido classificada, sob duas formas polares: (1) o polo hiperérgico, benigna, apresentando uma infecção localizada com resposta imune celular intacta, e com o histopatológico mostrando granulomas epitelióides compactos com poucos fungos e (2) o polo anérgico, maligna, apresentando uma infecção disseminada com resposta imune celular deprimida e o histopatológico apresentando inflamação crônica granulomatosa supurativa com extensas áreas de necrose e um grande número de células fúngicas. Existem evidências que pacientes de formas crônicas que pertençam ao pólo hiperérgico apresentam predominantemente resposta tipo 1 (Th1), enquanto os do pólo anérgico apresentam a resposta predominantemente tipo 2 (Th2), representada pelas formas agudas (MUSATTI et al., 1994).

O amplo espectro de manifestações clínicas da PCM provocou o aparecimento de muitas classificações da doença, que são derivados principalmente dos órgãos ou sistemas infectados. Em 1987, foi proposta uma nomenclatura que se tornou uma referência para a doença, sendo a PCM classificada em: a) PCM infecção: subclínica, detectada apenas pela reação intradérmica positiva; b) PCM doença subdividida em: 1) forma aguda ou subaguda acometendo geralmente jovens, de ambos os sexos, com tropismo do fungo para o sistema retículo-endotelial; 2) forma crônica: mais frequente e que acomete geralmente indivíduo adulto do sexo masculino e que pode ser subdividida em: unifocal quando um único órgão é afectado, geralmente os pulmões e multifocal quando vários órgãos são afetados; c) PCM residual ou sequelar: geralmente a doença pulmonar obstrutiva crônica, disfonia, e cicatrizes na laringe (FRANCO et al., 1987; MARQUES, 2012).

A PCM infecção corresponde aos pacientes que se infectaram e desenvolveram o complexo primário, mas não desenvolveram a doença, sendo apenas identificados por reação intradérmica de paracoccidiodina positiva. A frequência da infecção é variável de acordo com a importância da área endêmica, não se observa de rotina, resíduo calcificado do complexo primário no parênquima pulmonar, podendo, entretanto, apresentar da imagem radiológica de linfonomegalia hilar (MARQUES, 1998; MARQUES, 2012a).

A forma aguda ou subaguda é também chamada de PCM juvenil (tipo juvenil) é responsável por 3 a 5% dos casos da doença, afeta predominantemente crianças e jovens, de ambos os sexos na mesma proporção. É a forma mais grave da infecção, com a supressão da resposta imune celular e altos títulos de anticorpos específicos. Nesta forma o desenvolvimento é ainda mais rápido no fígado, baço, medula óssea e nódulos linfáticos são comprometidos (SHIKANAI-YASUDA et al., 2006; ABREU E SILVA et al., 2013).

A forma crônica adulta da PCM acomete aproximadamente 90% de todos os casos, com predomínio no sexo masculino. Caracteriza-se por um envolvimento pulmonar primária e manifestações extra-pulmonares secundárias. Esta forma ocorre preferencialmente em pacientes adultos, especialmente os 30-50 anos de idade, seu curso é lento, levando anos ou mesmo décadas, para se manifestar e, em seguida, para ser diagnosticada corretamente, a doença crônica é muitas vezes confundida com tuberculose, câncer e outras doenças sistêmicas (RESTREPO; GÓMEZ; TOBÓN, 2012).

A forma crônica apresenta um comprometimento progressivo do estado geral, quer em unifocal ou multifocal. Na forma unifocal, apenas um órgão ou sistema é afetado, com imunidade celular e níveis de anticorpos moderados. No tipo multifocal, muitos órgãos (pele, mucosas, pulmões, glândulas supra-renais) e sistemas são afetados, com depressão variável da imunidade humoral e celular (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

PCM seqüelar ou residual são causadas por um processo inflamatório crônico, que, em fases mais avançadas da resposta inflamatória, conduz a um aumento da produção de citocinas, com acúmulo de colágeno e a formação da fibrose, que causam alterações anatômicas e funcionais dos órgãos afetados. A fibrose pulmonar foi avaliada em 50% dos casos de doença crônica, seguido por uma doença pulmonar obstrutiva crônica e as suas complicações (RAMOS-E-SILVA; SARAIVA, 2008).

1.4. Aspectos Imunológicos

O mecanismo de defesa do hospedeiro interage com o fungo no foco inicial da infecção. Se o fungo persiste, uma resposta imunológica específica é ativada para destruir o parasita. Se os mecanismos de defesa forem ineficientes ocorre à adaptação e transformação do fungo em leveduras e a instalação da doença (CAMARGO; FRANCO, 2000).

A imunidade inata tem sido definida como a primeira fase de resposta imune e baseia-se nos elementos pré-existentes do sistema imunitário, que interagem diretamente com todos os tipos de microrganismos, que conduzem à sua destruição ou inibição do crescimento. A imunidade inata, que não é específico a um patógeno em particular e não gera memória específica, são mediadas por barreiras, elementos físicos, químicos e de componentes celulares do sistema imunitário. A imunidade adaptativa, envolvendo linfócitos antígeno-específicas é mediada pela imunidade por linfócitos T que podem gerar linfócitos Th1 ou Th2, além de Th17 e linfócitos T reguladores e linfócitos com atividade citotóxica e por linfócitos B com produção de anticorpos. Vários elementos da imunidade inata atuam em conjunto para controlar o crescimento do patógeno inicial e têm efeito profundo sobre a resposta imune adaptativa que se desenvolve. Além disso, a maioria dos mecanismos efetores da imunidade inata é idêntica aos da imunidade adaptativa, que são ativados em fases posteriores da resposta imune (CALICH et al., 2008; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Alguns mecanismos naturais de defesa do hospedeiro têm sido investigados em PCM, tais como a fagocitose, a quimiotaxia de leucócitos, células matadoras naturais (NK), antecedentes genéticos e o sistema complemento (CAMARGO; FRANCO, 2000). Os macrófagos alveolares interagindo com o fungo devem induzir à liberação de peptídeos que atraem neutrófilos, amplificando desta forma a resposta inicial (FRANCO et al., 1987; CAMARGO; FRANCO, 2000).

Tem sido demonstrado que os neutrófilos e células circulantes do lavado bronquioalveolar de pacientes que apresentaram níveis normais de atividade fagocitária, como de fagocitar e digerir *Candida albicans*, não apresentaram a capacidade para digerir ambas as formas de levedura e conídios de *P. brasiliensis* sugerindo que isto pode representar uma importante via de escape para *P. brasiliensis* (CAMARGO; FRANCO, 2000).

Macrófagos têm sido apontados como tendo um papel essencial na imunidade ao *P. brasiliensis*. Em um estudo *in vitro* que avaliou a interação de monócitos ou

macrófagos humanos com *P. brasiliensis*, foi possível observar que as leveduras eram facilmente fagocitadas pelos monócitos ou macrófagos, preservando, todavia, sua capacidade de crescimento no ambiente intracelular. Entretanto, quando os macrófagos foram tratados com IFN- γ , houve uma acentuada restrição da multiplicação do fungo (95% das células), sugerindo que as leveduras de *P. brasiliensis* fagocitadas podem se multiplicar dentro de monócitos ou macrófagos humanos e que esta multiplicação pode ser inibida quando essas células estão ativadas (MOSCARDI-BACCHI; BRUMMER; STEVENS et al., 1994). Tanto macrófagos como monócitos podem produzir um grande repertório de citocinas e, os monócitos de pacientes com PCM produzem citocinas pró e anti-inflamatórias, como IL-1 β , IL-8, TNF- α , IL-6, IL-10 e TGF- β . Esse desequilíbrio na produção dessas citocinas pode ter uma influência negativa na interação monócito-fungo, o que conduz ao crescimento do fungo e sua habilidade de escapar do sistema imune do hospedeiro (KUROKAWA et al., 2007).

Os monócitos e os macrófagos também fagocitam, mas permitem a replicação de *P. brasiliensis*. Quando esses macrófagos são ativados por INF- γ , observa-se uma inibição significativa da replicação intracelular de partículas fagocitadas, embora não ocorra a eliminação total do agente infeccioso. Por outro lado, Calvi et al. (2003) observaram que os monócitos provenientes de pacientes, quando ativados, apresentavam atividade fungicida mesmo com a cepa altamente virulenta, Pb18, sendo esta atividade dependente de H₂O₂. Outra citocina que atua nos monócitos humanos induzindo atividade fungicida é o fator de necrose tumoral (TNF- α), produzido em nível elevado após pré-ativação com INF- γ em monócitos estimulados com *P. brasiliensis*. A sua atividade fungicida foi verificada pela neutralização dessa atividade quando tratada com anticorpos anti-TNF- α (CALVI et al., 2003).

As células NK que poderiam atuar na defesa possivelmente são moduladas na PCM. Estudos *in vitro*, mostraram um efeito inibitório direto nas células NK murina no crescimento de *P. brasiliensis* e em modelo animal de infecção foram demonstradas que as células NK são ativadas nas primeiras semanas de infecção, seguidas por uma diminuição da sua atividade associado à depressão da imunidade celular. Do mesmo modo, em pacientes com PCM, as células NK circulantes foram encontradas em número elevado, mas mostraram baixa atividade citotóxica (CALICH et al., 2008).

A imunidade adaptativa é para efeito didático, dividida em resposta celular ou humoral. A imunidade celular é coordenada principalmente pela subpopulação de linfócitos T auxiliar ou *helper* CD4⁺ (Th1), enquanto a humoral pela Th2 (ROMANI, 2004).

Os linfócitos Th1 e Th2 diferenciam-se a partir de uma célula T precursora denominada Th0, caracterizada por secretar interleucina IL-4 e o interferon gama (IFN- γ). A diferença deste precursor em Th1 ou Th2 é dirigida principalmente, mas, não unicamente pelas citocinas (IL-12 para Th1 e IL-4 para Th2), produzidas por células da imunidade inata no início da infecção. Desse modo, em uma resposta típica à infecção fúngica, ocorre uma produção de IL-12 pelas células dendríticas (DCs) e macrófagos seguidos pela produção de IFN- γ . Esse cenário induz uma resposta mediada por Th1, que caracteriza a imunidade celular. Por outro lado, a produção inicial de IL-4 pelas DCs ou por outros leucócitos como basófilos, mastócitos ou eosinófilos direcionam uma resposta do tipo Th2 (MALDONADO-LOPEZ; MOSER, 2001; KIDD, 2003; ROMANI, 2004).

Na PCM humana, pacientes que desenvolvem a forma crônica geralmente apresentam imunidade preservada, exceto em formas mais graves da doença onde a imunidade celular é deficiente. Análises histopatológicas de lesões de pacientes com PCM crônica mostram granulomas epitelióides típicos, que circulam as lesões e dificultam a multiplicação do fungo (MONTENEGRO, 1986). A PCM é caracterizada como uma doença de padrão granulomatoso, sendo o granuloma a lesão fundamental, apresentando-se como componente essencial na defesa anti-*P. brasiliensis*. Essa lesão resulta de uma reação de hipersensibilidade tardia (DHT) contra antígenos do agente infeccioso, ocorrendo também em outras doenças infecciosas, como tuberculose, hanseníase e histoplasmose. O desenvolvimento do granuloma permite a contenção do patógeno, impedindo sua disseminação pelo organismo (ROMANI, 1997). O macrófago é a principal célula integrante do granuloma, apresentando atividades microbicidas e de apresentador de antígeno, além de, juntamente com linfócitos T, produzir citocinas. Plasmócitos, eosinófilos e fibroblastos também estão presentes no granuloma (DE BRITO; FRANCO, 1994).

Na PCM benigna ou localizada observa-se o desenvolvimento de resposta imune celular de padrão Th1 com produção de IFN- γ , IL-2 e TNF- α e baixos níveis de IL4, IL-5, IL-10 e anticorpos. Enquanto que na PCM disseminada ocorre indução de resposta imune celular do tipo Th2 com elevados níveis de IL4, IL-5, IL-10 e anticorpos, a ativação policlonal da célula B e comprometimento da produção de IFN- γ (ABREU E SILVA et al., 2013). Na forma crônica unifocal encontra-se níveis mais elevados de anticorpos do tipo IgG1 enquanto que na forma crônica multifocal observa-se níveis elevados de IgG4 e IgE. Níveis elevados de anticorpos específicos são detectados em PCM da forma aguda quando comparada com a forma crônica (MAMONI et al., 2001; MAMONI et al., 2002).

1.5. Modelos experimentais utilizados no estudo da PCM

A utilização de modelos animais para tentar elucidar os mecanismos da doença em humanos tem sido proposto desde a sua descrição por Lutz (1908). O primeiro trabalho bem sucedido utilizando a infecção experimental foi feito por Montenegro (1927), onde cobaias inoculadas, pela via intratesticular, com uma suspensão de tecidos humanos infectados apresentaram, em 100% dos casos, uma orquite específica. Desde então, os diversos modelos experimentais utilizados na PCM têm fornecido importantes explicações para a compreensão de vários aspectos da doença, além de permitirem o acompanhamento da infecção desde seus estágios iniciais, o que não é possível nos estudos realizados a partir de biópsias e necropsias humanas (KERR et al., 1988).

Espécies animais distintas exibem diferentes graus de susceptibilidade à infecção por *P. brasiliensis*; e dentro de uma mesma espécie animal, esta variação também ocorre, estando relacionada à idade, sexo e linhagem do animal, virulência de *P. brasiliensis* e via de inoculação utilizada. O modelo animal permite avaliar a interação parasita-hospedeiro, a morfologia do fungo nos tecidos, o estudo da resposta imune celular e humoral, a progressão da doença desde o momento da infecção, sua disseminação, o papel da resposta imune no desenvolvimento da doença, o estudo de ação de medicamentos e o dimorfismo do fungo (COELHO et al., 1994).

Os camundongos podem ser classificados em muito resistente (A/Sn), resistente (C3H/He), intermediário (C3H/HeB, C57B1/10, CBA, BALB/c) e susceptível (B10.A, B10D2/oSn e B10D2/nSn), quanto a sua suscetibilidade à infecção pelo *P. brasiliensis*. Foi demonstrado que independente da rota de inoculação, a produção de anticorpo total específico pelos camundongos suscetíveis é mais precoce e com titulação mais alta quando comparados com os de linhagem considerada resistente (CALICH et al., 1985; VAZ et al., 1992; SINGER-VERMES et al., 1993; CALICH; KASHINO, 1998).

Na PCM experimental, camundongos também demonstraram que a resistência à infecção está associada à imunidade celular com resposta Th1 e ativação dos fagócitos, enquanto a susceptibilidade está relacionada com a ativação preferencial dos linfócitos B e aumento nos níveis de Igs (SINGER-VERMES, et al., 1993; CACERE, et al., 2002; SOUTO et al., 2003). Camundongos nocaute para o gene de INF- γ produzem granulomas desorganizados com baixo número de macrófagos e neutrófilos e doença

disseminada e os camundongos nocautes para TNF- α são incapazes de produzir granulomas. Já os linfócitos de camundongos resistentes produzem interleucina-2 (IL-2) e INF- γ , durante todo o curso da infecção. A importância de INF- γ na proteção tem sido evidenciada pela contenção da infecção pelos macrófagos ou pela neutralização de adição de anticorpos anti-INF- γ ou mesmo com a utilização de camundongos nocaute para INF- γ (CALICH; KASHINO, 1998). Cavassani et al. (2006), demonstraram que a participação de linfócitos T regulatórios devem participar controlando tanto a resposta imune local como sistêmica na PCM.

A depressão da imunidade celular na PCM, possivelmente, é causada pela própria infecção, uma vez que a mesma é reversível quando a terapia específica é bem sucedida (MUSATTI et al., 1994; BERNARD et al., 1996; SUGIZAKI et al., 1999). Os possíveis mecanismos utilizados pelo fungo para induzir a imunossupressão incluem vários fatores e ainda não estão totalmente esclarecidos. Dentre esses, inicialmente foi demonstrada a presença de fator supressor, em soros de pacientes com PCM, com capacidade de deprimir a resposta linfoproliferativa, sendo essa depressão reversível e restaurada com sucesso da terapia e remissão da doença (MUSATTI et al., 1994; BERNARD et al., 1996). Sugizaki et al. (1999) demonstraram que a presença de antígenos em soro de pacientes diminui a resposta proliferativa de células mononucleares de sangue periférico (PBMC), e segundo Freitas da Silva e Roque Barreira (1992), pacientes com as formas graves e disseminadas da doença apresentam concentrações maiores de antígenos solúveis circulantes. Os imunocomplexos circulantes também são citados como fatores supressores da resposta imune celular na PCM (CHEQUER-BOU-HABIB, 1989; SUGIZAKI et al., 1999; BRUMMER; CASTANEDA; RESTREPO, 1993).

1.6. Paracoccidioidomicoses e doenças associadas

Os pacientes co-infectados com *P. brasiliensis* e HIV apresentam menores títulos de anticorpos específicos quando comparados aos pacientes com apenas PCM. Este resultado aponta para a intensidade menor da resposta humoral específica, o que pode ser explicado pela disfunção de células B associadas com o HIV e, possivelmente, com a rápida progressão da PCM nestes casos. Imunossupressão grave com níveis baixos de CD4⁺ favorece o estabelecimento da PCM, que pode ser o primeiro sinal de imunossupressão do HIV.

Portanto, a manifestação simultânea destas duas doenças está associada com uma taxa de mortalidade elevada. No entanto, as taxas de co-infecção é baixo, provavelmente porque os pacientes de AIDS são muitas vezes sob a profilaxia utilizados medicamentos rotineiramente no tratamento da PCM como sulfonamidas e derivados azólicos. Além disso, as diferenças epidemiológicas entre essas doenças, onde a AIDS não é tão frequente em zonas rurais, como é PCM, também são responsáveis por essas baixas taxas de co-infecção (ABREU E SILVA et al., 2013).

A PCM pode estar associada à co-morbidades, tais como: doença de Hodgkin, leucemias, linfomas e carcinomas, especialmente de pulmão, orofaringe e carcinomas da laringe.

Outro aspecto importante a considerar é a perspectiva de um aumento no número de casos da doença, devido ao aumento do número de transplantes de órgãos sólidos, como esses procedimentos não existem triagem rigorosa dos doadores provenientes de áreas endêmicas. Dois desses casos são de um doador de rim imunocompetente e assintomático que tinha tecido adrenal infectados com *P. brasiliensis*, mas sem disfunção glandular e um transplante renal ligada a PCM, a qual foi identificada apenas no momento da necropsia (ABREU E SILVA et al., 2013).

Nos casos de associação PCM e AIDS apresenta-se de forma semelhante as aguda/subaguda graves da doença, com tropismo para o sistema monocítico-fagocitário, provavelmente, resultante da reativação de um foco latente. Conjunto do sistema nervoso central e envolvimento ocular, simulando toxoplasmose, pode ser a manifestação PCM em pacientes soropositivos. O teste paracoccidioidina é quase sempre negativo e a sorologia pode ser negativa ou pode apresentar títulos baixos. Os anticorpos anti-*P. brasiliensis* estão presentes em apenas cerca de 60% dos casos. Nestes pacientes, a taxa de mortalidade específica é elevada, atingindo 25% a 30%. PCM pode ser a primeira manifestação clínica revelando a imunossupressão. No entanto, a incidência de indivíduos co-infectados é baixa, provavelmente devido à alta prevalência da PCM e menores casos de infecção por HIV em áreas rurais, e o uso generalizado de medicamentos antifúngicos por pacientes soropositivos (RAMOS E SILVA; SARAIVA, 2008).

A associação de PCM com outras doenças, infecciosas ou não, tem sido relatada frequentemente com tuberculose (URIBE et al., 1966; MONTOYA-RODRIGUES; RESPTREPO-MORENO, 1966; GÓMEZ, 1979; VALLE et al., 1992a), criptococose (BERNARD et al., 1996a), neoplasias (LEÃO; MENDES, 1980), estrongiloidíase (VALLE et

al., 1992b). Geralmente é difícil diagnosticar a doença primária, entretanto, as alterações fisiopatológicas produzidas pela PCM poderiam facilitar o aparecimento da doença associada e vice-versa, tornando-se importante detectar a presença dessas associações e sua repercussão na evolução dos pacientes (WANKE et al., 2005).

1.7. Aspectos gerais da Esquistossomose mansoni

A esquistossomose no Brasil, cujo principal agente etiológico é o *Schistosoma mansoni*, tem grande importância nas discussões sobre saúde no mundo devido a sua abrangência espacial e continental. Ocupa a segunda posição no ranking das doenças tropicais, superada apenas pela malária, registrando altos índices de morbidade. É considerada uma doença insidiosa e incapacitante em idades precoces, porém raramente fatal e está relacionada principalmente à ausência ou a precariedade de saneamento básico (WHO, 2012).

A esquistossomose é considerada uma das doenças endêmicas mais importantes e mais difundidas do mundo, estima-se que infecte cerca de 200 milhões de indivíduos (BINA; PRATA, 2003) e cerca de 600 milhões estão em área de risco (CHITSULO et al., 2000; LAMBERTUCCI, 2010) em 76 países e territórios da América do Sul, do Caribe, África e da região Oriental do Mediterrâneo (KATZ; PEIXOTO, 2000, AMARAL et al., 2006, LAMBERTUCCI, 2010), principalmente em áreas rurais agrícolas e urbanas periféricas (CARVALHO; LIMA, 2001). Constituindo grande problema de saúde pública, essa endemia está associada, à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico que gera a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ou lazer (KATZ; PEIXOTO, 2000).

No Brasil, a área endêmica para esquistossomose se encontra em expansão, abrangendo 19 estados com aproximadamente 26 milhões de habitantes expostos aos riscos de infecção e cerca de 2,5 milhões de pessoas infectadas, dados fornecidos em 1999 pela Fundação Nacional da Saúde (GAZZINELLI et al., 2002) e de acordo com Lambertucci (2010) os dados estão em torno de 4 a 6 milhões de pessoas infectadas. Katz; Peixoto (2000) ressalta o problema da esquistossomose no país, relacionando sua endemicidade com a pobreza e baixo desenvolvimento econômico. Antes da implantação, no Brasil, do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE), a esquistossomose atingia entre dez a doze milhões de pessoas, sendo considerada uma das mais importantes áreas de ocorrência da

doença (BINA; PRATA, 2003). Alguns estudos regionais mostram uma situação preocupante e ainda longe da erradicação do parasito ou da sua transmissão (CUTRIM; CHIEFFI; DE MORAES, 1998).

No Estado do Paraná há focos isolados da Esquistossomose mansoni. Inquéritos epidemiológicos feitos por meio de pesquisas de ovos em fezes verificaram que, dos 399 municípios do estado, 54 são considerados endêmicos (MINAMI, 2005). As áreas variam de baixa a alta prevalência, Londrina com 3,5% (DUTRA-MENEZES et al., 1999a, 1999b) e Bandeirantes com 22% (MELO; SIEVERTE; DUTRA-MENEZES, 2001).

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica, que pode evoluir para complicações graves, debilitante e, em cerca de 10% dos casos, fatal (PASSOS; AMARAL, 1998; WHO, 2002). A infecção por *Schistosoma mansoni*, é a única espécie do gênero que ocorre de forma autóctone no Brasil (AMARAL; PORTO, 1994).

A esquistossomose mansoni causa um amplo nível de morbidades, o desenvolvimento dos quais parece ser influenciado em grande parte pela natureza da resposta imune induzida e seus efeitos na formação do granuloma e das patologias associadas nos órgãos afetados. Duas principais condições clínicas são reconhecidas em indivíduos infectados com *S. mansoni*: esquistossomose mansoni aguda e crônica (PEARCE; MAC DONALD, 2002).

Schistosoma mansoni é a única espécie dentro do grupo de interesse médico e sanitário nas Américas, e desenvolve sua fase adulta como parasito da luz dos vasos sanguíneos do homem e de outros mamíferos, habitando as vênulas do plexo hemorroidário superior e as ramificações mais finas das veias mesentéricas inferiores (REY, 2008).

O helminto *Schistosoma mansoni* requer dois hospedeiros para completar o ciclo de vida: um molusco aquático (caramujo do gênero *Biomphalaria*) e um vertebrado (homem e outros mamíferos). O parasita tem um ciclo de vida complexo, composto por seis estágios. Após a liberação dos ovos nas fezes, estes entram em contato com a água, resultando na eclosão dos miracídios. Esse processo é dependente de temperatura, luz e diluição das fezes na água. Os miracídios então nadam em busca do caramujo (hospedeiro invertebrado) e o invadem. Após a invasão do hospedeiro intermediário, ocorre uma multiplicação do parasita através de várias gerações de esporocistos (primários, secundários, terciários e etc.) e depois cercárias. As cercárias emergem do caramujo durante a luz do dia e nadam a procura de um hospedeiro definitivo (MELLO; COELHO, 2005; REY, 2008).

A infecção pelo *S. mansoni* ocorre por meio da penetração das cercarias na pele, consequência da atividade lítica de suas glândulas e pela ação mecânica promovida pelos seus movimentos vibratórios intensos. Concomitante a esse processo ocorre à perda da cauda. Após a penetração, as larvas resultantes denominadas esquistossômulos, migram através dos tecidos subcutâneos e, ao penetrarem num vaso sanguíneo são levadas possivelmente da pele para os pulmões, pelo sistema vascular sanguíneo, via coração direito. A migração pela via sanguínea ocorre das arteríolas pulmonares e dos capilares às veias pulmonares, chegando ao coração esquerdo. Acompanhando o fluxo sanguíneo, os esquistossômulos que ganham o sistema porta-hepático se desenvolvem em vermes adultos, machos e fêmeas. Os vermes adultos migram, acasalados, para o território das veias mesentéricas inferiores onde fazem a ovoposição. Os ovos depositados aparecem nas fezes após passarem pelos tecidos da mucosa intestinal ou ganham a circulação porta-hepática e alcançam os espaços porta, levando à formação de granulomas, que são caracterizados pela reação inflamatória aos antígenos do ovo, seguida da produção de colágeno, podendo evoluir para um quadro de fibrose hepática (WYNN; CHEEVER, 1995; ANDRADE, 2004; BAPTISTA; ANDRADE, 2005; WYNN, 2007; CALDAS et al., 2008; ANDRADE, 2009).

A infecção humana por *S. mansoni* costuma ser, em geral, na maioria das vezes, assintomática ou oligossintomática (REY, 2008). A susceptibilidade do hospedeiro a infecção está ligada a vários fatores, tais como cepa do parasito, carga parasitaria adquirida, idade, estado nutricional e resposta imunitária da pessoa. De todos estes fatores são considerados os mais importantes à carga parasitaria e a resposta do sistema imune do paciente (MELLO; COELHO, 2005, PORDEUS et al., 2008). Há duas fases imunologicamente distintas durante a infecção da esquistossomose: fase aguda e fase crônica (CALDAS et al., 2008).

Na fase aguda da infecção, pode ocorrer a dermatite cercariana, com inflamação da pele no local da penetração da cercária. Essa reação dura cerca de dois dias e depois regride. Esse mesmo processo de inflamação pode ocorrer nos pulmões, durante a etapa de migração dos esquistossômulos. Nessa fase podem ocorrer ainda sintomas como febre alta, tosse, cefaleia, esplenomegalia, linfadenopatia, diarreia e quadros de alergia. Os sintomas da fase aguda coincidem com o início da deposição de ovos pela fêmea (MATHIESON; WILSON, 2010).

Na patogênese, o ovo é o principal elemento, havendo também participação de vermes vivos e mortos e de complexos imunes derivados do antígeno do parasito

(GASPARINI; PORTELLA, 2004). Os antígenos são secretados principalmente pela membrana interna da casca do ovo maduro, esses atravessam os poros dos ovos disseminando-se nas circunvizinhanças. Estes antígenos, denominados de antígenos solúveis dos ovos (SEA – *Soluble Egg Antigens*) induzem tanto a resposta imunológica humoral quanto a celular e são elementos na formação da reação granulomatosa e, portanto, da doença (MELO; COELHO, 2005).

Na fase crônica da doença, a lesão típica é o granuloma formado ao redor dos ovos retidos no fígado e intestinos do indivíduo infectado, sendo uma resposta imune celular aos antígenos secretados pelo ovo do *S. mansoni* (FALLON; DUNNE, 1999; RUMBLEY et al., 1998; STADECKER; HERNANDEZ, 1998; LUNDY; LERMAN; BOROS, 2001; PEARCE; MACDONALD, 2002; STAVITSKY, 2004; SARVEL et al, 2006). Inicialmente, os ovos maduros presentes nos tecidos são imobilizados e envoltos por uma reação inflamatória. Em torno deles surgem os macrófagos e depois aparecem eosinófilos, neutrófilos, linfócitos, plasmócitos e fibroblastos, e o recrutamento e migração destas células para o local de inflamação são controlados pelas citocinas (KAPLAN et al., 1998). Assim que os miracídios morrem, os neutrófilos diminuem, porém, os macrófagos ativados envolvem e destroem os restos parasitários; em seguida, fibras reticulares são depositadas formando camadas concêntricas, e os macrófagos transformam-se em fibroblastos, que também se dispõem concentricamente, envolvendo a casca do ovo e formando um tecido cicatricial, ao conjunto do qual se dá o nome de granuloma (BOROS; WARREN, 1970; BYRAN; VON LICHTENBERG, 1977; NEVES, 2006).

A doença, no homem começa a se cronificar a partir dos seis meses após a infecção, podendo evoluir por muitos anos. Aparecem os sinais e sintomas de evolução da patologia no acometimento de vários órgãos, com níveis extremos de gravidade. As manifestações clínicas variam, dependendo da localização do parasito e da intensidade da carga parasitária, podendo apresentar as formas intestinal, hepatointestinal, hepatoesplênica e até neurológica (PORDEUS et al., 2008). A forma crônica intestinal, geralmente assintomática, é a mais frequentemente encontrada em pacientes infectados que vivem nas áreas endêmicas. Nesta forma, os sintomas são geralmente leves com perda de apetite, dispepsia e desconforto abdominal, sendo o sintoma mais comum a diarreia. Embora não existam estudos detalhados relacionados à forma hepatointestinal, pacientes portadores desta forma clínica apresentam uma hepatomegalia não associada à esplenomegalia. A forma hepatoesplênica é a forma mais grave da esquistossomose mansoni e caracteriza-se pelo

aumento considerável do baço e do fígado em consequência da fibrose periportal, central e periférica, que podem levar a complicações significativas como hipertensão porta, hipertensão pulmonar, cor pulmonale e obstrução de vasos sanguíneos, os quais podem romper-se causando hemorragia (LAMBERTUCCI et al., 2000; MELLO; COELHO, 2005; LAMBERTUCCI; SILVA; VOIETA, 2005; ANDRADE, 2008).

Dependendo da localização, o granuloma pode relacionar-se a formas graves de fibrose hepática, aumentando a pressão periportal, hepato e esplenomegalia (ANDRADE, 2008). De fato, os ovos de *Schistosoma* ou mesmo extratos de ovos são capazes de induzir a reação granulomatosa e também interagem com células endoteliais, induzindo a produção de citocinas que vão facilitar os mecanismos de adesão do ovo (LENZI et al., 2008). Assim que o miracídio morre, o granuloma diminui, deixando placas fibrosas em seu lugar. Essas placas aumentam a pressão sanguínea portal, assim como o diâmetro da veia porta (PEARCE; MACDONALD, 2002; LENZI et al., 2008).

1.8. Aspectos imunológicos

Na esquistossomose, o sistema imune do hospedeiro é exposto a uma série de antígenos derivados do parasito e do ovo. A agressão tecidual decorrente desses agentes incita uma resposta inflamatória capaz de ativar o sistema imune celular e humoral (STADECKER et al., 2004).

Durante o período pré-patente da infecção, as primeiras 4–5 semanas, depois da exposição à cercária, a resposta imune é principalmente Th1, e como seria esperado, determinado o estágio da vida que o hospedeiro é exposto durante este tempo, a resposta é dirigida principalmente contra antígenos do helminto adulto (PEARCE et al., 2004). Seis a oito semanas após a primeira exposição inicia-se a fase aguda da doença, conhecida como síndrome toxêmica (RABELLO et al., 1997; DE JESUS et al., 2002).

A resposta imune na fase inicial da infecção pelo *S. mansoni* é do tipo Th1, com produção de IFN- γ e também de citocinas pró-inflamatórias, a exemplo do TNF- α , IL-6 e IL-1 (WYNN et al., 1998; MONTENEGRO et al., 1999; DE JESUS et al., 2002, BURKE et al., 2009). Esta resposta tem sido associada à destruição de esquistossômulos no pulmão com ativação de macrófagos pelo IFN- γ . A fase aguda é então modulada, de forma que na fase

crônica a resposta é polarizada para o tipo Th2 e regulatória, caracterizada pela produção de IL-4, IL-5, IL-13 e IL-10, com baixos níveis de IFN- γ (GAZZINELLI; COLLEY, 1992; ARAUJO et al., 1996; FINKELMAN et al., 1997; CORREA-OLIVEIRA et al., 1998). Esta mudança no padrão de resposta tem sido relacionada à produção de IL-4 e IL-10 induzida por antígenos do ovo, o qual coincide com o início da ovoposição (GRZYCH et al., 1991; MONTENEGRO et al., 1999; SILVEIRA et al., 2004). A resposta Th2 atinge seu pico a cerca de 8 semanas após a infecção e, em seguida modulada com a progressão para a infecção crônica (BURKE et al., 2009)

A citocina IFN- γ , do tipo Th1, foi considerada antifibrogênica, pela sua capacidade de inibir a produção de proteínas de matriz extracelular, tais como colágeno e aumentar a síntese de metaloproteinases, responsáveis pela degradação do colágeno (DUNCAN; BERMAN, 1985; MALLAT et al., 1995; DESSEIN et al., 2004). Por sua vez, o TNF- α , outra citocina Th1, foi associada com o risco de desenvolver fibrose grave em indivíduos infectados (HENRI et al., 2002; BOOTH et al., 2004).

Durante a última década, a IL-4 tem sido proposta na esquistossomose como sendo uma molécula fundamental na diferenciação para a resposta do perfil Th2 (MCKENZIE et al., 1999). O papel da IL-4 já foi bastante explorado. Trabalhos mostram que o tratamento com anti-IL-4 leva a uma diminuição da fibrose hepática apesar de pouca interferência no tamanho dos granulomas neste órgão (CHEEVER et al., 1994; ELTOUM et al., 1995). Entretanto, a adição exógena dessa citocina leva a um aumento do tamanho dos granulomas hepáticos (YAMASHITA; BOROS, 1992).

A IL-10 foi associada à supressão da resposta Th1, sendo, portanto, o perfil de resposta Th2 associado com a proteção e a geração da cronicidade das infecções esquistossomóticas por controlar a resposta granulomatosa ao redor dos ovos (FINKELMAN et al., 1991; STADECKER; FLORES VILLANUEVA, 1994).

A IL-10 nos estágios iniciais da resposta granulomatosa age suprimindo a produção de citocinas Th1, como o IFN- γ (HOFFMANN et al., 2000). Outras funções promovidas por esta citocina estão relacionadas à sua atividade inibitória sobre a ativação da célula T, a produção de IgE, o recrutamento de eosinófilos e a ativação de macrófagos. Agindo nos macrófagos, modula sua atividade antimicrobiana, inibe a atividade co-estimulatória e a produção de citocinas pró-inflamatórias. A IL-10 também inibe a

diferenciação de células dendríticas e suprime a produção de quimiocinas inflamatórias e citocinas do tipo Th1 e Th2 (BORISH; STEINKE, 2003; BURKE et al., 2009).

A função predominante da IL-17 é o de mediador inflamatório e está presente em várias doenças inflamatórias de curso crônico (STEINMAN, 2007). A IL-17 estimula a produção de IL-6, óxido nítrico e prostaglandinas E₂ (PGE₂) e atua em sinergismo com outras citocinas inflamatórias, a exemplo da IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , além de promover a proliferação e o recrutamento de monócitos e neutrófilos para os sítios inflamatórios (RUTITZKY et al., 2005; RUTITZKY; STADECKER, 2006; WILSON et al., 2007; RUTITZKY et al., 2008). Rutitzky et al. (2005) demonstraram que a neutralização da IL-17 resulta em inibição da imunopatogenia hepática, reforçando a participação direta desta citocina na formação do granuloma em modelos experimentais.

O TGF- β é uma citocina pleiotrópica produzida por células T reguladoras, e foi associado à fibrose em virtude de sua habilidade de induzir a deposição de colágeno, inibindo metaloproteinases de matriz (LETTERIO; ROBERTS, 1998; FARAH et al., 2000). O TGF- β constitui um importante fator quimiotático para macrófagos e contribui para a produção de IgA pelas células B. No processo de formação do granuloma e formação da cicatriz fibrótica, o TGF- β participa promovendo a formação de componentes da matriz extracelular (MEC) e a produção de colágeno (FARAH, et al., 2000; WYNN, 2003; LI et al., 2006). Alguns autores, porém, sugerem não haver influência do TGF- β no processo de agravamento da fibrose hepática (JESUS et al., 2004), ou até mesmo, que esta citocina em associação com a IL-10, teria um papel protetor contra o desenvolvimento da fibrose (REMOUE et al., 2001; KITANI et al., 2003; HESSE et al., 2004; ALVES OLIVEIRA et al., 2006).

1.9. Modelos experimentais utilizados no estudo da Esquistossomose mansoni

Os modelos experimentais animais são extremamente úteis para a melhor compreensão de diversos processos infecciosos (DRUILHE; HAGAN; ROOK, 2002). Na esquistossomose mansoni diversos modelos experimentais já foram utilizados para avaliar a infecção, desde modelos simples até os mais complexos para descobrir possíveis controles ou melhores condutas terapêuticas para essa parasitose e têm trazido grande contribuição ao

conhecimento da patologia, patogenia e fisiopatologia da parasitose, nas suas fases aguda e crônica (CHEEVER et al., 2002).

A caracterização das fases aguda e crônica, no modelo murino, é relativamente difícil, mas a infecção é considerada aguda aproximadamente até a 6ª semana (WYNN et al., 1998) e crônica a partir da 12ª (FALLON, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002).

Na esquistossomose murina, a resposta do tipo Th1 está associada com proteção à infecção, enquanto que a resposta do tipo Th2 correlaciona-se com a morbidade induzida pelos ovos do parasito. Já na esquistossomose humana, a dicotomia Th1/Th2 não é tão evidente na resistência à infecção ou na morbidade (HAGAN, 1991). Em modelo experimental, a resposta do tipo Th1 com produção de IFN- γ também tem sido associada a proteção contra a infecção, sendo uma resposta equilibrada do tipo Th1 e Th2 sugerida como protetora (BRITO et al., 2000).

Hoffmann et al. (2000) demonstraram, em modelos experimentais, que IL-10 é essencial para prevenir os efeitos deletérios provocados por uma resposta Th2 exacerbada em camundongos deficientes de IL-10. A avaliação do papel da IL-4 na esquistossomose experimental utilizando animais *knockout* não mostrou grandes diferenças no tamanho dos granulomas hepáticos nos animais deficientes dessa citocina (PEARCE et al., 1996; METWALI et al., 1996). Jankovic et al. (1998) utilizando camundongos *knockout* para o receptor de IL-4, que não respondem a IL-4 e a IL-13, mostraram uma completa abolição da formação do granuloma. Além disso, a remoção de IL-4 resulta em uma alta mortalidade, pelo desenvolvimento de endotoxemia (FALLON et al., 2000).

Na esquistossomose experimental, Mola et al. (1999), usando o modelo de reinfeção em babuínos, correlacionaram altos níveis de TGF- β com a diminuição do granuloma, e na esquistossomose humana, Alves Oliveira et al. (2006) encontraram uma associação inversa do TGF- β com fibrose, avaliando grupos de indivíduos com diferentes graus de fibrose. Em concordância com esses autores, Kitani et al. (2003) sugerem que o TGF- β pode controlar a progressão da fibrose induzindo a síntese de IL-10 pelas células T reguladoras.

Em modelos experimentais a administração de IFN- γ exógeno, durante a infecção esquistossomótica, levou a uma inibição da fibrose hepática com pequena diminuição do tamanho do granuloma (CZAJA et al., 1989). Entretanto, quando se adicionava

anticorpos anti-IFN- γ não foi observado efeito significativo no processo patológico hepático (SHER et al., 1990), enquanto que nos pulmões a neutralização de IFN- γ proporcionou um aumento dos granulomas (WYNN et al., 1994). Estudos recentes, utilizando *S. japonicum* têm demonstrado que IFN- γ é um forte indutor da produção de óxido nítrico (NO), que possui grande importância na patologia da esquistossomose bem como também, é um regulador das citocinas do perfil Th2, as quais possuem papel central na formação dos granulomas (HIRATA; FUKUMA, 2003).

1.10. Esquistossomose mansoni e doenças associadas

Medeiros et al. (2003) ao avaliarem a evolução da asma em pacientes com e sem infecção pelo *S. mansoni*, observaram um curso mais leve da asma nos esquistossomóticos. Estes autores sugerem que na esquistossomose mansoni a síntese de IL-10 pode modular a reação de hipersensibilidade ao diminuir a liberação de histamina e outros mediadores liberados pelos mastócitos, proporcionando um curso mais ameno para a asma.

Em virtude da infecção pelo *S. mansoni* resultar em uma importante modulação da resposta imune, tem sido dada atenção, tanto em modelos experimentais como no homem à possibilidade da esquistossomose atenuar estas doenças, que habitualmente apresentam uma resposta importante polarizada para Th1 ou Th2 (CARVALHO; ANDRADE, 2005). A modulação da resposta imune constitui-se no principal aspecto de interesse para o entendimento das co-infecções de *S. mansoni* com outros agentes infecciosos, desde que esta supressão da resposta imunológica não ocorre somente contra antígenos de *S. mansoni*, mas também contra outros antígenos (CARVALHO; SANTOS; JESUS, 2008).

A resposta inflamatória que ocorre na forma aguda da esquistossomose é modulada negativamente pela produção de IL-10. Por isso, a forma crônica da doença é caracterizada por uma inibição da resposta imune Th1 e Th2. A IL-10 favorece a persistência de outros patógenos, no entanto, pode reduzir a resposta inflamatória nas doenças alérgicas e auto-imunes (CARVALHO; SANTOS; JESUS, 2008). Existem estudos clínicos mostrando que a infecção pelo *S. mansoni* pode atenuar as manifestações clínicas da asma brônquica. Em estudos avaliados por Medeiros et al. (2003), observaram que pacientes com asma e esquistossomose tiveram menos crise e sintomas menos graves de asma. Por outro lado, o tratamento da esquistossomose em pacientes com asma foi acompanhado do aparecimento de

sintomas graves de asma. A modulação da resposta Th2 nesses pacientes tem uma participação importante da IL-10 sendo demonstrada que os linfócitos de pacientes com asma e *S. mansoni* produzem mais IL-10 do que pacientes com asma sem infecção por *S. mansoni*. Em paciente com asma e *S. mansoni* existe uma relação direta entre número de ovos nas fezes e produção de IL-10 e a adição de IL-10 à cultura de linfócitos de pacientes com asma e sem *S. mansoni* diminui a produção de IL-5 e IL-4 (ARAÚJO et al., 2004).

Tanto diabetes melito, como encefalomielite auto-imune são doenças mediadas por uma resposta tipo Th1. Assim, os estudos apontam para o importante papel do *S. mansoni* de modular uma resposta Th1 envolvida na gênese das duas doenças auto-ímmunes. Cooke et al. (1999) em modelo experimental, observaram em camundongos NOD (*Non obese diabetics*) que a infecção por *S. mansoni*, no período pós-natal, reduziram significativamente o aparecimento do diabetes, sendo que este efeito protetor se relaciona com antígenos existentes no ovo do *S. mansoni*. Os referidos autores observaram que a inoculação apenas de ovo realizada nestes animais (NOD) na quarta semana de vida, quando as células T auto-reativas já estão ativadas, impede o desenvolvimento de diabetes nestes animais.

Abscessos hepáticos bacterianos são relativamente incomuns em países desenvolvidos, a despeito da ocorrência frequente de colecistite, apendicite e diverticulite, fontes comuns de infecção bacteriana para o fígado. A esquistossomose mansoni tem papel especial no desenvolvimento de infecções bacterianas e no agravamento de outras doenças infecciosas. Durante o curso desta helmintíase, há imunomodulação da resposta imune ao hospedeiro, com variação na ocorrência da resposta Th1 e Th2, levando à formação de granuloma, eosinofilia, hipersecreção de IgE e o aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas e fúngicas (LAMBERTUCCI; SILVA; VIOLETA, 2008). Lambertucci et al. (2001) mostraram em um modelo experimental, que 77% dos camundongos co-infectados por *S. mansoni* e *Staphylococcus aureus* desenvolveram múltiplos abscessos hepáticos, ao passo que nenhuma lesão piogênica foi detectada no fígado dos animais-controle, infectados exclusivamente por *S. mansoni* ou exclusivamente por ou sem nenhuma das duas infecções

Marshall et al. (1999) em seus estudos apontaram que em camundongos com uma infecção patente de *S. mansoni* seguida por uma infecção secundária por *Toxoplasma gondii*, resultou numa taxa de mortalidade significativamente mais elevada, com níveis plasmáticos de TNF- α e transaminases, quando comparados aos controles monoinfectados. Os camundongos co-infectados também apresentavam uma grave doença hepática, com a presença de esteatose e necrose coagulativa em áreas adjacentes ao

granuloma periovular. A patologia hepática exacerbada em camundongos co-infectados não pareceu ser um resultado da replicação dos taquizoítas de *T. gondii*, uma vez que esses se encontravam diminuídos, de acordo com a análise de RT-PCR específica do parasita e coloração imuno-histoquímica demonstrando um baixo número de taquizoítos no fígado. A hipótese sugerida pelos autores foi de que a alta mortalidade encontrada era devido aos altos níveis de TNF- α séricos, e que estava relacionada à patologia hepática. Araujo et al. (2001) demonstraram em camundongos deficientes de IL-12 que a co-infecção com *S. mansoni* e *T. gondii*, resultaram em um dano hepático menor, de acordo com a informação anterior, e com um aumento do tempo de vida. Foi verificado também que o aumento da mortalidade e morbidade encontrada se devia não somente ao aumento de TNF- α , mas também aos níveis elevados de IL-12, sugerindo que o uso da citocina IL-12 para promover uma ação anti-fibrótica contribuísse para minimizar os danos hepáticos causados pelos granulomas.

O mecanismo de defesa contra as leishmânias, parasitas intracelular do sistema fagocítico mononuclear (SFM), é dependente principalmente de uma resposta celular mediada pelas células TCD4⁺ Th1, mediante a estimulação de citocinas IFN- γ e TNF- α . Na co-infecção de *S. mansoni* com *Leishmania*, se espera a interferência na resposta imune contra esses agentes, favorecendo a permanência e multiplicação, e alterando o curso da doença. Hassan et al. (2006) usando modelo de co-infecção experimental envolvendo *S. mansoni* e *Leishmania donovani*, importantes patógenos que afetam o fígado, mostraram que a co-infecção não conseguem controlar o crescimento da *L. donovani*, resultando em aumento da carga parasitária no fígado e no baço, apesar do desenvolvimento de uma resposta Th1 anti *Leishmania*. Ainda foi visto uma falha na imunidade anti *Leishmania* dentro do granuloma esquistossomótico, onde foram visualizadas formas amastigotas se multiplicando no seu interior e os mesmos autores levantaram a hipótese de que o granuloma de *S. mansoni* pode formar um discreto nicho que facilita a sobrevivência intracelular da *L. donovani*.

Segundo La Flamme (2002) a infecção de camundongos com *S. mansoni* retarda a resolução das lesões cutâneas e parasitemia durante a infecção por *Leishmania major*. Em contraste, a infecção por *L. major* não parece alterar o curso da esquistossomíase, sugerindo que a pré - existência de uma infecção de resposta Th2 pode alterar as respostas a Th1 destes patógenos em locais periféricos e prejudicar as funções efectoras mediadas por Th1.

Considerando-se que em áreas endêmicas para *S. mansoni* ocorre também alta prevalência para geo-helminhos, uma porcentagem significativa de co-infecções por estes

helminthos tem sido relatada (PETNEY; ANDREWS, 1998; BOOTH; MAYOMBANA; KILIMA, 1998; BROOKER et al., 2000; HOWARD et al., 2002; TCHUEM TCHUENTÉ et al., 2003; RASO et al., 2004). Um estudo sobre epidemiologia e imunologia das infecções por nematódeos intestinais e *S. mansoni*, realizado em uma comunidade rural do estado de Minas Gerais, demonstrou que *Necator americanus* era o parasito mais prevalente (68,2%), seguido por *Ascaris lumbricoides* (48.8%) e *S. mansoni* (45.3%), sendo que 60.6% dos indivíduos infectados eram portadores de infecções múltiplas (FLEMING et al., 2006).

Geiger et al. (2002), avaliaram a resposta proliferativa *in vitro* de PBMC de indivíduos residentes em área endêmica para ancilostomídeos, mas apresentando baixa prevalência para *S. mansoni*. A estimulação por antígenos derivados de vermes adultos de *Ancylostoma caninum* e por antígenos de *S. mansoni* (SEA e SWAP) resultou em altos níveis de resposta proliferativa, sendo que PBMC de indivíduos normais endêmicos apresentaram os maiores níveis de proliferação em resposta a esses antígenos. Além disso, PBMC de indivíduos normais endêmicos e de indivíduos infectados com *Trichuris trichiura* apresentaram reatividade cruzada contra antígenos de *Ascaris lumbricoides* e de *S. mansoni* (SEA e SWAP).

Raros trabalhos descrevem avaliações sobre as influências do microambiente criado pela presença de co-infecções por helmintos na indução da resposta imune contra os antígenos destes parasitos. Um estudo avaliou a influência da infecção por *S. mansoni* em camundongos susceptíveis a infecções pelo nematódeo *Trichuris muris*, um dos poucos helmintos que induzem uma resposta Th1. Os resultados deste trabalho demonstraram que durante a co-infecção com *T. muris* e *S. mansoni* foram induzidos altos níveis de anticorpos da classe IgE e de citocinas IL-4, IL-5, IL-10, assim como baixos níveis de IFN- γ . Este ambiente predominantemente Th2 foi protetor contra a infecção por *Trichuris muris*, sendo estes vermes completamente eliminados pelo hospedeiro (CURRY et al., 1995).

Entretanto, até o momento não se tem mostrado a capacidade de infecção de *S. mansoni* modificar o curso clínico de outras helmintíases (CARVALHO; SANTOS; JESUS, 2008). Estudos têm mostrado que indivíduos co-infectados com *S. mansoni* e *Ascaris lumbricoides* ou *S. mansoni* e *Ancylostoma duodenale* apresentam uma diminuição tanto da resposta imune celular como da resposta imune humoral a antígenos de *Ascaris lumbricoides* e *Ancylostoma duodenale* (CORREA-OLIVEIRA et al., 2002). Este fenômeno provavelmente é devido a uma somatória de efeitos modulatórios da resposta imune que são observados na infecção por helmintos (CARVALHO; SANTOS; JESUS, 2008).

Estudos realizados em modelos experimentais como em humanos têm mostrado uma grande influência da infecção por *S. mansoni*, não só para modificar a resposta imune contra os vírus, como também a patogenia das doenças virais. (CARVALHO; SANTOS; JESUS, 2008).

A co-infecção com o vírus da hepatite C (HCV) em portadores de esquistossomose mansônica, se sobrepõe em várias regiões, e é uma das causas de maior frequência de descompensação hépato-celular em pacientes, tendo o fígado como principal órgão alvo (AQUINO et al., 2000; KAMAL, 2001). Em regiões endêmicas, pacientes infectados com *S. mansoni* apresentaram carga viral elevada durante a fase aguda e se mantiveram elevadas na fase crônica, levando ao desenvolvimento de uma hepatite crônica. Já os pacientes infectados somente com HCV apresentam viremia alta seguida, de redução da carga viral após a fase aguda (KAMAL, 2001). Outro estudo mais recente do mesmo grupo, avaliando pacientes infectados com HCV, co-infectados ou não com *S. mansoni*, mostrou uma maior frequência de progressão para a fibrose hepática nos indivíduos co-infectados em comparação com o grupo apenas infectado pelo HCV.

El-Kady et al. (2005) estudando também co-infecções por *S. mansoni* e o vírus da hepatite C (HCV), relataram maior nível de IFN- γ nos indivíduos mono-infectados por HCV, quando comparado aos indivíduos mono-infectados por *S. mansoni* ou co-infectados. Além disso, os níveis de IL-4 e IL-10 foram mais elevados nos indivíduos co-infectados, quando comparados aos portadores de mono-infecção por HCV.

O conhecimento acumulado sobre a imunologia da infecção por *S. mansoni* e dos efeitos do HIV no sistema imune prenunciam interação entre as duas infecções. A infecção pelo HIV causa falência progressiva do sistema imune, com queda gradual dos linfócitos CD4 e comprometimento da imunidade celular. A resposta Th2 encontra-se reduzida em pacientes esquistossomóticos portadores do HIV (MWINZI et al., 2001). Estudos mostram que a infecção por *S. mansoni* tem pouco impacto na infecção pelo HIV. Não existem evidências que a co-infecção interfira na carga viral, nem no curso da infecção do HIV, também nenhum efeito é encontrado na evolução clínica da esquistossomose, que protegem os tecidos do hospedeiro contra as enzimas proteolíticas produzidas pelos ovos. No entanto, os pacientes co-infectados excretam menos ovos, o que é condizente com resultados obtidos em animais, que mostram a participação das células T na passagem dos ovos para o intestino. Também, não houve diferença na fibrose hepática em pacientes co-infectados com *S. mansoni* e HIV (KARANJA et al., 1998; MWINZI, et al., 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito imunopatológico da co-infecção de camundongos Balb/c com *Paracoccidioides brasiliensis* e com *Schistosoma mansoni* em fase de ovoposição.

2.2. Objetivos Específicos

2.2.1. Determinar a carga fúngica do *P. brasiliensis* nos pulmões e fígado dos camundongos co-infectados e monoinfectados (CFU).

2.2.2. Determinar a carga parasitaria do *S. mansoni* nas fezes, fígado e intestino delgado e grosso dos camundongos co-infetados e monoinfectados.

2.2.3. Avaliar o perfil histopatológico e analisar os aspectos dos granulomas do fígado dos camundongos co-infectados e monoinfectados.

2.2.4. Avaliar os níveis das citocinas INF- γ , IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α e TGF- β no fígado dos camundongos co-infectados e monoinfectados.

2.2.5. Avaliar os níveis das citocinas INF- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β no soro dos camundongos co-infectados e monoinfectados.

2.2.6. Determinar o nível sérico de IgG total específica para anti-SEA e anti-ExoAg em camundongos co-infectados e monoinfectados.

3. REFERÊNCIAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Cellular and Molecular Immunology**. 7.ed. Philadelphia: Elsevier, 2012.

ABREU E SILVA, Mariana Álvares et al. Important aspects of oral paracoccidiodomycosis—a literature review. **Mycoses**, v. 56, n. 3, p. 189-199, 2013.

ALMEIDA, Sergio Monteiro. Central nervous paracoccidiodomycosis: na overview. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 126-133, 2005.

ALVES OLIVEIRA, Lucia Fraga. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni humans. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 2, p. 1215-21, 2006.

AMARAL, Ronaldo Santos. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. suppl. I, p. 79-85, 2006.

AMARAL, Ronaldo Santos; PORTO, M. A. S. Evolução e situação atual do controle da esquistossomose no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. supl. III, p. 73-89, 1994.

ANDRADE, Zilton Araujo. Schistosomal hepatopathy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. suppl. I, p. 51-57, 2004.

ANDRADE, Zilton Araujo. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 11, p. 656-63, 2009.

ANDRADE, Zilton Araujo. A Patologia da Esquistossomose Humana. In: CARVALHO, Omar Santos; COELHO, Paulo Marcos Zech; LENZI, Henrique Leonel. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008, p. 547-568.

ANDRADE, Zilton Araujo. Regression of hepatic fibrosis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 514-520, 2005.

ANDREOTTI, Patricia Ferrari et al. Isolation and partial characterization of a 30kD a adhesin from *Paracoccidoides brasiliensis*. **Microbes and Infection**, v. 7, n. 5-6, p. 875–881, 2005.

AQUINO, Renata Telles Rudge et al. Hepatitis B and C virus markers among patients with hepatoesplenic mansonic schistosomiasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 42, n. 6, p. 313-320, 2000.

ARAÚJO, Maria Ilma et al. Impaired T helper 2 response to aeroallergens in helminth-infected patients with asthma. **Journal of Infectious Diseases**, v. 190, n. 10, p. 1797-1803, 2004.

ARAUJO, Maria Ilma et al. Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice coinfecting with *Schistosoma mansoni* and *Toxoplasma gondii*. **Infection of Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1454-1462, 2001.

ARAUJO, Maria Ilma. et al. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **European Journal of Immunology**, v. 26, n. 6, p. 1399-403, 1996.

BAPTISTA, Ana Paula; ANDRADE, Zilton Araujo. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 2, p. 183-5, 2005.

BELLISSIMO-RODRIGUES, Fernando; MACHADO, Alcyone Artioli; MARTINEZ Roberto. Paracoccidiodomycosis Epidemiological Features of a 1,000-Cases Series from a Hyperendemic Area on the Southeast of Brazil, **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 3, p. 546-550, 2011.

BERNARD, Gil et al. Antigen-specific immunosuppression in paracoccidiodomycosis. **American Journal of Tropical and Medicine Hygiene**, v. 54, n. 1, p. 7-12, 1996.

BERNARD, Gil et al. Cryptococcosis as an opportunistic infection in immunodeficiency secondary to paracoccidiodomycosis. **Mycopathologia**, v. 133, n. 2, p. 65-69, 1996a.

BINA, José Carlos; PRATA, Aluizio. Schistosomiasis in hyperendemic area of Taquarandi. I-*Schistosoma mansoni* infection and severe clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 2, p. 211-216, 2003.

BOOTH, Mark et al. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN- γ , high TNF- α , or low RANTES, depending on age and gender. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 2, p. 1295-1303, 2004.

BOOTH, Mark; MAYOMBANA, C.; KILIMA, P. The population biology and epidemiology of schistosome and geohelminth infections among schoolchildren in Tanzania. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 92, n. 5, p. 491-495, 1998.

BORISH, Larry C.; STEINKE, John W. 2. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2 suppl., p. S460-75, 2003.

BOROS, Dov L.; WARREN, Kenneth S. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 132, p. 488-507, 1970.

BRITO, Caldas F. A. et al. CD4⁺ T cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon- γ and tumour necrosis factor- α in response to the recombinant 14KDA *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 51, n. 6, p. 595-601, 2000.

BROOKER, S. et al. Epidemiology of single and multiple species helminth infections among schoolchildren in Busia district, Kenya. **East African Medical Journal**, v. 77, n. 3, p. 157-161, 2000.

BRUMER, Elmer; CASTANHEDA Elizabeth; RESTREPO Angela. Paracoccidiodomycosis: an update. **Clinical Microbiology Review**, v. 6, n. 2, p. 89-117, 1993.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 4, p. 163-76, 2009

BYRAN, J. E.; VON LICHTENBERG, Franz. Altered schistosome granuloma formation in nude mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 26, n. 5, p. 944-956, 1977.

CACERE, Camila Rodrigues et al. The role of apoptosis in the antigen-specific T cell hyporesponsiveness of paracoccidioidomycosis patients. **Clinical Immunology**, v. 105, n. 2, p. 215-222, 2002.

CALDAS, Iramaya Rodrigues et al. Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2-3, p. 109-17, 2008.

CALICH, Vera Lúcia Garcia et al. Innate immunity to *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Mycopathologia**, v. 165, n. p. 223–236, 2008.

CALICH, Vera Lucia Garcia et al. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 66, n. 5, p. 585-594, 1985.

CALICH, Vera Lucia Garcia; KASHINO, S. S. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 5, p. 618-623, 1998.

CALVI, Sueli. A. et al. Study of bronchoalveolar lavage fluid in paracoccidioidomycosis: cytopathology and alveolar macrophage function in response to gamma interferon; comparison with blood monocytes. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 15, p. 1373-9, 2003.

CAMARGO Zoilo Pires; FRANCO, Marcello Fabiano. Current knowledge on pathogenesis and immunodiagnosis of paracoccidioidomycosis. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 41-48, 2000.

CARVALHO, Edgar M.; ANDRADE, Zilton A. Imunopatologia da Esquistossomose. In: COURA, José Rodrigues. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005, p. 947-957.

CARVALHO, Edgar M.; LIMA, Aldo A. M. Esquistossomose (Bilharziasse). In: GOLDMAN, Lee; BENNETT, J. Claude. **Cecil Tratado de Medicina Interna**. 21.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001, p. 2208-2211.

CARVALHO, Edgar M.; SANTOS, Silvane Braga, JESUS, Amelia Ribeiro. A Resposta Imune no Contexto das Co-infecções Associadas à Esquistossomose. In: CARVALHO, Omar Santos; COELHO, Paulo Marcos Zech; LENZI, Henrique Leonel. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008, p. 717-730.

CAVASSANI, Karen A. et al. Systemic and Local Characterization of Regulatory T Cells in a Chronic Fungal Infection in Humans. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 9, p. 5811-5818, 2006.

CHEEVER, Allen 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. **Journal of Immunology**, v.153, n.2, p.753-759. 1994.

CHEEVER, Allen W. et al. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 917-940. 2002.

CHEQUER-BOU-HABIB, Dumith. The possible role of circulating immune complexes in the deficiency of cell-mediated immunity in paracoccidioidomycosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, n. 2, p. 205-212, 1989.

CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropical**, v. 77, n.1, p. 41-51, 2000.

COELHO, Kunie Iabuki Rabello et al. Experimental Paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, Marcello; LACAZ, Carlos Silva; RESTREPO-MORENO, Angela; DEL NEGRO, Gildo **Paracoccidioidomycosis**, 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. cap. 6, p. 87-107.

CONTI-DIAZ, Ismael A. On the unknown ecological niche of *Paracoccidioides brasiliensis*: our hypothesis of 1989: present status and perspectives. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 49, n. 2, p. 131-4, 2007.

COOKE, Anne et al. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. **Parasite Immunology**, v. 21, n. 4, p. 169-176, 1999.

CORREA-OLIVEIRA, Rodrigo et al. Cytokines as determinants of resistance and pathology in human *Schistosoma mansoni* infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 171-7, 1998.

CORREA-OLIVEIRA, Rodrigo et al. Infection with *Schistosoma mansoni* correlates with altered immune responses to *Ascaris lumbricoides* and hookworm. **Acta Tropica**, v. 83, n. 2, p. 123-132, 2002.

COSTA, Patricia Fagundes et al. Characteristics of Environmental *Paracoccidioides brasiliensis* Isolates. **Mycopathologia**, v. 169, n. 1, p. 37-46, 2010.

COUTINHO, Ziadir Francisco et al. Paracoccidioidomycosis mortality in Brazil (1980-1995). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 5, p. 1441-1454, 2002.

CURRY, A. J. et al. Evidence that cytokine-mediated immune interactions induced by *Schistosoma mansoni* alter disease outcome in mice concurrently infected with *Trichuris muris*. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. p. 769-774, 1995.

CUTRIM, Raimundo Nonato; CHIEFFI, Pedro Paulo; DE MORAES, José Cássio. Schistosomiasis mansoni in the "Baixada Ocidental Maranhense", state of Maranhao, Brazil: cross-sectional studies performed in 1987 and 1993. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 40, n. 3, p. 165-171, 1998.

CZAJA, Mark J. et al. Gamma-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. **Hepatology**, v. 10, n. 5, p.795-800, 1989.

DE BRITO, Thales; FRANCO, Marcello Fabiano. Granulomatous inflammation. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, n. 2, p. 185-192, 1994.

DE JESUS, Amélia Ribeiro et al. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, n. 1, p. 98-105, 2002.

DESSEIN, Alain et al. Interleukin-13 in the skin and 47 interferon-g in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 180-190, 2004.

DRUILHE, P.; HAGAN, P.; ROOK, G. A. The importance of models of infection in the study of disease resistance. **Trends Microbiology**, v. 10, n. 10 Suppl, p. S38-46, 2002.

DUNCAN, Matthew R.; BERMAN, Brain. γ Interferon is the lymphokine and β Interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 162, n. 2, p. 516-27, 1985.

DUTRA-MENEZES, Maria Claudia Noronha et al. Dados Preliminares do Perfil Epidemiológico da Esquistossomose mansônica no Distrito Sanitário de Londrina-PR. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Poços de Caldas, 1999. **Anais XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Poços de Caldas - MG**, 1999a, p. 116.

DUTRA-MENEZES, Maria Claudia Noronha et al. Prevalência de Enteroparasitoses em Bairros de Londrina – PR. In: XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Poços de Caldas, 1999. **Anais XVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, Poços de Caldas - MG**, 1999b, p. 182.

EL-KADY, I. M. et al. Interleukin (IL)-4, IL-10, IL-18 and IFN- γ Cytokines Pattern in Patients with Combined Hepatitis C Virus and *Schistosoma mansoni* Infections. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 61, n. 1, p. 87-91, 2005

ELTOUM, Isam A. et al. Suppressive effect of interleukin-4 neutralization differs for granulomas around *Schistosoma mansoni* eggs injected into mice compared with those around eggs laid in infected mice. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 7, p. 2532-2536, 1995.

FALLON, Padraic G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunology Today**, v. 21, n. 1, p. 29-35, 2000.

FALLON, Padraic G.; DUNNE, David W. Tolerization of mice to *Schistosoma mansoni* egg antigens causes elevated Type 1 and diminished type 2 cytokine responses and increased mortality in acute infection. **The Journal of Immunology**, v. 162, n. 7, p. 4122-4132, 1999.

FARAH, Idle O. et al. Repeated exposure induces periportal fibrosis in *Schistosoma mansoni*-infected baboons: role of TGF- β and IL-4. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 5337-5343, 2000.

FERREIRA, Karen Spadari; ALMEIDA, Sandro Rogério. Immunization of susceptible mice with gp43-pulsed dendritic cells induce an increase of pulmonary Paracoccidioidomycosis. **Immunology Letters**, v. 103, n. 2, p. 121-126, 2006.

FINKELMAN, F. D. et al. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 505-33, 1997.

FINKELMAN, F. D. et al. Regulation and biologic function of helminth-induced cytokine response. **Immunology Today**, v. 12, n. 3. P. A62-A66, 1991.

FLEMING, Fiona M. et al. Synergistic associations between hookworm and other helminth species in a rural community in Brazil. **Tropical Medicine International Health**, v. 11, n. 1, p. 56-64, 2006.

FRANCO, Marcello et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129-132, 1987.

FRANCO, Marcello et al. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 20, n. 2, p. 129-132, 1987.

FREITAS-DA-SILVA, Gilson; ROQUE-BARREIRA, Maria Cristina. Antigenemia in paracoccidioidomycosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 2, p. 381-385, 1992.

GASPARINI, Eduardo Antônio, PORTELLA, Renata Boschi. **Manual de Parasitoses Intestinais**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2004, p.71-88.

GAZZINELLI, Giovani; COLLEY, D. G. Human immune responses during schistosomiasis mansoni. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n.2, p. 125-34, 1992.

GAZZINELLI, Maria Flávia et al. The interdiction of disease: a cultural construction of schistosomiasis in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1629-1638, 2002.

GEIGER, Stefan M. et al. Cellular responses and cytokine profiles in *Ascaris lumbricoides* and *Trichuris trichiura* infected patients. **Parasite Immunol**, v. 24, n. 11-12, p. 499-509, 2002.

GÓMEZ I. Asociación paracoccidioidomycosis-tuberculosis. Estudio de 13 casos. **Antioquia Médica**, v. 28, p. 63-70, 1979.

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

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

HASSAN, Mohammed F. et al. The *Schistosoma mansoni* Hepatic Egg Granuloma Provides a Favorable Microenvironment for Sustained Growth of *Leishmania donovani*. **Immunopathology and Infectious Diseases**, v. 169, n. 3, p. 943-53, 2006.

HENRI, Sandrine et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- γ is associated with protection against fibrosis and TNF- γ with aggravation of disease. **Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 929-36, 2002.

HESSE, Matthias et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **Journal Immunology**, v. 172, n. 5, p. 3157-66, 2004.

HIRATA, Mizuki; FUKUMA, Toshihide. Cytokine regulation in experimentally-induced *Schistosoma japonicum* egg granuloma formation. **Parasitology International**, v. 52, n. 4, p. 341-349, 2003.

HOFFMANN, K. F. et al. 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. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6406-16, 2000.

HOGAN, Laura H.; KLEIN, Bruce S.; LEVITZ, Stuart M. Virulence factors of medically important fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 469-488, 1996.

HOWARD, S. C. et al. Spatial and intensity-dependent variations in associations between multiple species helminth infections. **Acta Tropica**, v. 83, n. 2, p. 141-149, 2002.

ITANO, Eiko Nakagawa et al. Aspectos Imunológicos da Paracoccidiodomicose Humana. In: WATANABE, Maria Angelica E.; ONO, Mario Augusto; CECCHINI, Rubens; ITANO, Eiko Nakagawa. **Tópicos em Patologia Experimental**. 1.ed. Londrina: EDUEL, 2008. v. 1, 227p.

JANKOVIC, Dragana et al. CD4+ T cell-mediated granulomatous pathology in schistosomiasis is downregulated by a B cell-dependent mechanism requiring Fc receptor signaling. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 4, p. 619-629, 1998.

JESUS, Amélia Ribeiro et al. Association of Type 2 Cytokines with Hepatic Fibrosis in Human *Schistosoma mansoni* Infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 6, p. 3391-3397 2004.

KAMAL, Sanaa M. et al. Specific cellular immune response and cytokine patterns in patients co-infected with hepatitis C virus and *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 8, p. 972-982, 2001.

KAPLAN, Mark H. et al. Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. **The Journal of Immunology**, v. 160, n. 4, p. 1850-1856, 1998.

KARANJA, Diana M. S. et al. Studies on schistosomiasis in western Kenya: I Evidence for immune-facilitated excretion of schistosome eggs from patients with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus coinfections. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 5, p. 515-521, 1997.

KATZ, Naftale; PEIXOTO, Sérgio Viana. Critical analysis of the estimated number of schistosomiasis mansoni carriers in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p. 303-308, 2000.

KERR, Itália B. et al. Paracoccidioidomycosis: a sequential histopathologic study of lesions in experimentally-infected rats. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 30, n. 5, p. 336-350, 1988.

KIDD, Parris Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternative Medicine Review**, v. 8, n. 3, p. 223-346, 2003.

KITANI, Atsushi et al. Transforming Growth Factor (TGF)- β 1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated Interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF- β 1-mediated fibrosis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 8, p. 1179-1188, 2003.

KUROKAWA, Cilmyery Suemi et al. Pro-and anti-inflammatory cytokines produced by human monocytes challenged in vitro with *Paracoccidioides brasiliensis*. **Microbiology and Immunology**, v. 51, n. 4, p. 421-428, 2007.

LA FLAMME, Anne Camille. Schistosomiasis delays lesion resolution during *Leishmania major* infection by impairing parasite killing by macrophages. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 7, p. 339-345, 2002.

LACAZ, Carlos Silva et al. Paracoccidioidomicose In: LACAZ, Carlos Silva et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002, p. 639-729.

LACAZ, Carlos Silva. Historical evolution of the knowledge on *Paracoccidioides brasiliensis*. In: FRANCO, Marcello; LACAZ, Carlos L.Silva; RESTREPO-MORENO, A.; DEL NEGRO, Goldo **Paracoccidioidomycosis**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. Cap 1, p. 1-4.

LACAZ, Carlos Silva; PORTO, Edward; MARTINS, José Eduardo Costa. **Micologia Médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991. p. 695.

LAMBERTUCCI, José Roberto et al. Pyogenic abscesses and parasitic diseases. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 43, n. 2, p. 67-74, 2001.

LAMBERTUCCI, José Roberto et al. *Schistosoma mansoni*: assesment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, v. 77, n. 1, p. 101-109, 2000.

LAMBERTUCCI, José Roberto. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 4, p. 422-435, 2010.

LAMBERTUCCI, José Roberto; SILVA, Luciana Cristina Santos; VIOLETA, Izabela. Esquistossomose e Doenças Associadas. In: CARVALHO, Omar Santos; COELHO, Paulo Marcos Zech; LENZI, Henrique Leonel. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008, p. 789-806.

LAMBERTUCCI, José Roberto; SILVA, Luciana Cristina Santos; VOIETA, Izabela. Esquistossomose Mansônica. In: COURA, José Rodrigues. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2005, p. 931-46.

LENZI, Henrique Leonel et al. Patologia Experimental com Enfoque no Granuloma Esquistossomótico. In: CARVALHO, Omar Santos; COELHO, Paulo Marcos Zech; LENZI,

Henrique Leonel. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008, p. 569-654.

LETTERIO, John J.; ROBERTS, Anita B. Regulation of immune responses by TGF- β . **Annual of Review Immunology**, v. 16, p. 137-61, 1998.

LI, Ming O. Transforming growth factor- β regulation of immune responses. **Annual of Review Immunology**, v. 24, p. 99-146, 2006.

LUNDY, Steven K.; LERMAN, Stephen P.; BOROS, Dov L. Soluble Egg Antigen-Stimulated T Helper Lymphocyte Apoptosis and Evidence for Cell Death Mediated by FasL+ T and B Cells during Murine *Schistosoma mansoni* Infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 271-280, 2001.

LUPI, Omar et al. Tropical dermatology: Fungal tropical diseases. **Journal of the American Academic of Dermatology**, v. 53, n. 6, p. 931-51, 2005.

LUTZ, Adolpho. Uma micose pseudo-coccídica localizada na boca e observada no Brasil: contribuição ao conhecimento das hiphoblastomicoses americanas. **Brazil Medico**, v. 22, p. 121-124, 1908.

MALDONADO-LOPEZ, R. MOSER, M. Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. **Seminars in Immunology**, v. 13, n. 5, p. 275-246, 2001.

MALLAT, Ariane et al. Interferon- α and γ inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture. **Hepatology**, v. 21, n. 4, p. 1003-1010, 1995.

MAMONI, Ronei Luciano et al. Capture enzyme-linked immunosorbent assay to detect specific immunoglobulin E in sera of patients with paracoccidioidomycosis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 3, p. 237-41 2001.

MAMONI, Ronei Luciano et al. Enhanced production of specific IgG4, IgGE, IgA and TGF- β in sera from patients with the juvenile form of paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 40, n. 2, p. 153-9 2002.

MARQUES DA SILVA, Silvia Helena et al. Monitoring gp43 Antigenemia in Paracoccidioidomycosis Patients during Therapy. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 6, p. 2419-2424, 2004.

MARQUES, Silvio Alencar. Paracoccidioidomicose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 73, n. 5, p. 455-469, 1998.

MARQUES, Sílvio Alencar. Paracoccidioidomicoses. In: ZAITZ, Clarisse et al. **Compêndio de Micologia Médica**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012, p. 294-312.

MARQUES, Sílvio Alencar. Paracoccidioidomycosis. **Clinics in Dermatology**, v. 30, n. 6, p. 610-615, 2012a.

MARSHALL, A. J. et al. *Toxoplasma gondii* and *Schistosoma mansoni* synergize to promote hepatocyte dysfunction associated with high level of plasma TNF- α and death in C57Bl/6 mice. **Journal of Immunology**, v. 163, n. 4, p. 2089-2097, 1999.

MARTINEZ, Roberto Paracoccidiodomicose. In: SIDRIM, José Júlio Costa; ROCHA, Marcos Fábio Gadelha **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. São Paulo: Guanabara Koogan, 2004. p. 204-221.

MATHIESON, William; WILSON, R. Alan. A comparative proteomic study of the undeveloped and developed *Schistosoma mansoni* egg and its contents: the miracidium, hatch fluid and secretions. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 5, p. 617-628, 2010.

MATTOS GROSSO, Daniela et al. Characterization of gp70 and anti-gp70 monoclonal antibodies in *Paracoccidoides brasiliensis* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 11, p. 6534-6542, 2003.

MCKENZIE, Grahame J. et al. Simultaneous disruption of interleukin (IL)-4 and IL-13 defines individual roles in T helper cell type 2-mediated responses. **Journal of Experimental Medicine**, v.189, n.10, p.1565-1572. 1999.

MEDEIROS, Manoel Jr. et al. *Schistosoma mansoni* infection is associated with a reduced course of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 5, p. 947-951, 2003.

MELLO, Alan Lane; COELHO, Paulo Marcos Zech. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana**. 11.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005, p. 193-212.

MELO, Simone Castanho; SIEVERTE, Vera Lucia; DUTRA-MENEZES, Maria Claudia Noronha. Epidemiologia da Esquistossomose Mansônica em Bairros da Cidade de Bandeirantes – PR. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v. 37, n. 4, p. 131, 2001.

METWALI, A. et al. The granulomatous response in murine Schistosomiasis mansoni does not switch to Th1 in IL-4-deficient C57BL/6 mice. **Journal of Immunology**, v. 157, n. 10, p. 4546-4553, 1996.

MINAMI, L. H. Programa de controle da esquistossomose – PCE. In: **Treinamento sobre esquistossomose para os municípios da 17ª RS**, Londrina, 2005. CD-ROM.

MOLA, Paul W. et al. Cytokine control of the granulomatous response in *Schistosoma mansoni*-infected baboons: role of exposure and treatment. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 12, p. 6565-6571, 1999.

MONTENEGRO, J. Acerca da inoculabilidade da blastomicose no Brasil. **Brazil Medico**. v. 41, p. 808-12. 1927.

MONTENEGRO, Mário R.; FRANCO, Marcello. Pathology. In: FRANCO, Marcello; LACAZ, Carlos Silva; RESTREPO-MORENO, Angela; DEL NEGRO, Gildo **Paracoccidiodomycosis**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. Cap. 9, p. 131-150.

MONTENEGRO, Mario Rubens G. Clinical forms of paracoccidiodomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 3, p. 203-4, 1986.

MONTENEGRO, Silva Maria et al. Cytokine production in acute versus chronic 83 human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferongamma and interleukin-10 in

the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. **Journal of Infectious Diseases**, v. 179, n. 6, p. 1502-14, 1999.

MOSCARDI-BACCHI Maura, BRUMMER Elmer, STEVENS D. A. Support of *Paracoccidioides brasiliensis* multiplication by human monocytes or macrophages: inhibition by activated phagocytes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 159-164, 1994.

MURRAY, Patrick R. et al. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2004. P. 762.

MUSATTI, Chloé C. et al. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, Marcello; LACAZ, Carlos Silva; RESTREPO-MORENO, Angela; DEL NEGRO, Gildo **Paracoccidioidomycosis**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. Cap. 11, p. 175-186.

MUSATTI, Chloé C. et al. Cell-mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. In: FRANCO, Marcello; LACAZ, Carlos Silva; RESTREPO-MORENO, Angela; DEL NEGRO, Gildo **Paracoccidioidomycosis**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1994. Cap. 11, p. 175-186.

MWINZI, Pauline N. M. et al. Cellular immune responses of schistosomiasis patients are altered by human immunodeficiency virus type 1 coinfection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, n. 4, p. 488-496, 2001.

MWINZI, Pauline N. M. et al. Short report: evaluation of hepatic fibrosis in person co-infected with *Schistosoma mansoni* and human immunodeficiency virus-I. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 6, p. 783-786, 2004.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Dinâmica**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2006, p. 227-247.

OLIVEIRA, Gabriela G. et al. Serological Evidence of *Paracoccidioides brasiliensis* Infection in Chickens from Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. **Mycopathologia**, v. 171, n. 3, p. 197-202, 2011.

PASSOS, Afonso Dinis Costa; AMARAL, Ronaldo Santos Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. suplemento II, p. 61-74, 1998.

PEARCE, Edward J. et al. IL-4 in Schistosomiasis. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 295-9, 1996.

PEARCE, Edward J. et al. Th2 response polarization during infection with helminth parasite *Schistosoma mansoni*. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 117-126, 2004.

PEARCE, Edward J., MacDONALD, Andrew S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 7, p. 499-511, 2002.

PETNEY, Trevor N.; ANDREWS, Ross. H. Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 3, p. 377-393, 1998.

PORDEUS, Luciana Cavalcanti et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 17, n. 3, p. 163-175, 2008.

RABELLO, Ana L. et al. Humoral immune responses in patients with acute *Schistosoma mansoni* infection who were followed up for two years after treatment. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 304-8, 1997.

RAMOS-E-SILVA, Marcia; SARAIVA, Luciana Espirito Santos. Paracoccidioidomycosis. **Dermatologic Clinics**, v. 26, n. 2, p. 257-269, 2008.

RAPPLEYE, Chad A.; GOLDMAN, William E. Defining virulence genes in the dimorphic fungi. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 281-303, 2006.

RASO, Giovanna et al. Multiple parasite infections and their relationship to self-reported morbidity in a community of rural Côte d'Ivoire. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 5, p. 1092-1102, 2004.

REMOUE, F. et al. Gender-dependent specific immune response during chronic human Schistosomiasis haematobia. **Clinical Experimental Immunology**, v. 124, n. 1, p. 62-8, 2001.

RESTREPO, Angela; GÓMEZ, Beatriz L.; TOBÓN, Angela Paracoccidioidomycosis: Latin America's Own Fungal Disorder. **Current Fungal Infection Reports**, v. 6, p. 303–311, 2012.

RESTREPO-MORENO, Angela. Paracoccidioidomycosis. In: MURPHY, Juneann W., FRIEDMAN, Herman; Bendinelli, Mauro. **Infections agents and pathogenesis – fungal infections and immune responses**. New York: Plenum Press, 1993. p. 251-276.

REY, Luís. **Parasitologia**. 4.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2008. p. 435-446.

ROMANI, Luigina. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 1, p. 1-13, 2004.

ROMANI, Luigina. The T cell response against fungal infections. **Current Opinion Immunology**, v. 9, n. 4, p. 484–490, 1997.

RUMBLEY, Catherine A. et al. The schistosome granuloma: characterization of lymphocyte migration, activation, and cytokine production. **The Journal of Immunology**, v. 161, n. 8, p. 4129-4137, 1998.

RUTITZKY, Laura I. et al. Severe CD4 t cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. **Journal of Immunology**, v. 176, n. 6, p. 3920-6, 2005.

RUTITZKY, Laura I. et al., IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. **Immunology**, v. 180, n. 4, p. 2486-95, 2008.

RUTITZKY, Laura I.; STADECKER, M. J. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 1, p. 327-30, 2006.

SAN BLAS, Gioconda. Paracoccidioidomycosis and its etiologic agent *Paracoccidioides brasiliensis*. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 31, n. 2, p. 99-113, 1993.

SAN-BLAS, Gioconda; NIÑO-VEGA, Gustavo. Morphogenesis in other agents of Systemic Mycoses. In: SAN-BLAS, Gioconda; CALDERONE, R. A. **Pathogenic Fungi: Structural Biology and Taxonomy**. England: Ed. Caister Academic Press. 1993, cap. 5. p. 167-219.

SAN-BLAS, Gioconda; NIÑO-VEGA, Gustavo; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Medical Mycology**, v. 40, n. 3, p. 225-242, 2002.

SARVEL, Ana Karine et al. Comparison between morphological and staining characteristics of live and dead eggs of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. suppl. 1, p. 289-292, 2006.

SCHAECHTER, Moselio, et al. **Microbiologia: Mecanismos das Doenças Infecciosas**. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan. 2002. 642p.

SHANKAR, Jata et al. Hormones and the resistance of women to paracoccidioidomycosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 2, p. 296-313, 2011.

SHER, Alan et al. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by infection with *Schistosoma mansoni*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 87, n. 1, p. 61-65, 1990.

SHIKANAI-YASUDA, Maria Aparecida et al. Guideliness in paracoccidioidomycosis **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 3, p. 297-310, 2006.

SILVA, Carlos Eduardo Amaral et al. Paracoccidioidomicose do sistema nervoso central. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 58, n. 3A, p. 741-747, 2000.

SILVA, Luciana M. et al. Comparasion of immune responses of *Shistosoma mansoni*-infected mice with distinct chronic forms of the disease. **Acta Tropical**, v. 91, n. 2, p. 189-196, 2004.

SILVEIRA, Alda M. et al. Humans schistosomiasis mansoni: Intensity of infection differentially effectos the production of interleukin-10 interferon- γ and interleukin -13 by soluble egg antigen or adult worm antigen stimulated cultures. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 98, n. 9, p. 514-519, 2004.

SINGER-VERMES, Lucia Mary et al. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among the dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 94, n. 1, p. 75-79, 1993.

SOUTO Janeusa Trindade et al. Chemokine production and leukocyte recruitment to the lungs of *Paracoccidioides brasiliensis*-infected mice is modulated by interferon- γ . **American Journal of Pathology**, v. 163, n. 2, p. 583-590, 2003.

SOUTO, Janeusa T. et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α determine resistance to *Paracoccidioides brasiliensis* infection in mice. **American Journal of Pathology**, v. 156, n. 5, p. 1811-1820, 2000.

STADECKER, M. J.; FLORES VILANUEVA, P. O. Accessory cell signals regulate Th-cell responses: from basic immunology to a model of helminthic disease. **Immunology Today**, v. 15, n. 12, p. 571-574, 1994.

STADECKER, Miguel J. et al. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunological Reviews**, v. 201, n. 1, p. 168-179, 2004.

STADECKER, Miguel J.; HERNANDEZ, Hector J. The Immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 5, p. 217-221, 1998.

STAVITSKY, Abram B. Regulation of granulomatous inflammation in experimental models of schistosomiasis. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 1, p. 1-12, 2004.

STEINMAN, Lawrence. A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nature Medicine**, v. 13, n. 2, p. 139-45, 2007.

SUGIZAKI, M. F. et al. Correlation between antigenemia of *Paracoccidioides brasiliensis* and inhibiting effects of plasma inpatients with paracoccidioidomycosis. **Medical Mycology**, v. 37, n. 4, p. 277-284, 1999.

TCHUEM TCHUENTÉ, L. A. et al. Polyparasitism with *Schistosoma haematobium* and soil-transmitted helminth infections among school children in Loum, Cameroon. **Tropical Medicine International Health**, v. 8, n. 11, p. 975-986, 2003

URIBE, Palaez A.; MONTOYA-RODRIGUES, L. C.; RESPTREPO-MORENO, Angela. Survey on histoplasmosis and paracoccidioidomycosis in a tuberculosis hospital. **Antioquia Médica**, v. 16, p. 323-328, 1966.

VALLE, Antônio Carlos Francesconi et al. Thoracic radiologic aspects in paracoccidioidomycosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 2, p. 107-115, 1992a.

VALLE, Antônio Carlos Francesconi et al. Tratamento da paracoccidioidomicose: estudo retrospectivo de 500 casos. I – Análise clínica, laboratorial e epidemiológica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 67, n. 5, p. 251-254, 1992b.

VAZ, Celideia Aparecida Coppi et al. Specific recognition pattern of IgM and IgG antibodies produced in the course of experimental paracoccidioidomycosis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 88, n. 1, p. 119-123, 1992.

WANKE, Bado et al. Paracoccidioidomicose. In: COURA, José Rodrigues. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. v. 2, p. 1193-1206.

WANKE, Bado; AIDÊ, M. A. Chapter 6 - Paracoccidioidomycosis. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, n.12, p. 1245-1249, 2009.

WHO. WHO Expert Committee. Prevention and control of Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. **WHO Technical Report Series**, v. 912, p. 1-57, 2002.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis and Epidemiology**. 2012. Disponível em: www.who.in/topics/schistosomiasis/en.

WILSON, Mark S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, n. 2, p. 148-54, 2007.

WYNN, Thomas A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 3, p. 524-9, 2007.

WYNN, Thomas A. et al. Endogenous interleukin 12 (IL-12) regulates granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni* and exogenous IL-12 both inhibits and prophylactically immunizes against egg pathology. **Journal of Experimental Medicine**, v. 179, n. 5, p.1551-1561, 1994.

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

WYNN, Thomas A; CHEVER, Allen W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, v. 7, n. 4, p. 505-11, 1995.

WYNN, Thomas. A. IL-13 effector functions. **Annual of Review Immunology**, v. 21, p. 425-56, 2003.

YAMASHITA, T.; BOROS, D. L. IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni. **Journal of Immunology**, v. 149, n. 11, p. 3659-3664, 1992.

4. Manuscrito 1

Exacerbation of chronic paracoccidioidomycosis in mice co-infected with *Schistosomiasis mansoni* oviposition phase

Francisco José de Abreu Oliveira*, Maria Claudia Noronha Dutra de Menezes*, Jerfferson Crespigio*, Paula Leonello Álvares e Silva*, Zoilo Pires de Camargo**, Eiko Nakagawa Itano*

*State University of Londrina, Londrina, PR, Brazil. **Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

Correspondence to: Francisco José de Abreu Oliveira (abreu@uel.br) or Eiko Nakagawa Itano (itano@uel.br). Department of Pathology Science, CCB. State University of Londrina. Campus Universitário. 86051-970 Londrina, PR, Brazil. E-mail: Tel/Fax: +55 43-3371-4267

Abstract

The main defense in paracoccidioidomycosis (PCM), caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, is linked to Th1 pattern of immune response. This study investigated the immunopathological impact in chronic PCM when associated to schistosomiasis mansoni oviposition phase, that induce Th2 immune response. It was used groups of BALBc mice infected with *P. brasiliensis* during 70 (Pb70) or 80 days (Pb80) associated with *S. mansoni* infected during 42 (Pb70Sm42), or 52 days (Pb80Sm52), the latter considered main *S. mansoni* oviposition phase. The fungal load was determined by liver and lung CFU and serum IgG antibodies to *P. brasiliensis* (ExoAg) and serum (IFN- γ , IL-4, TFG- β and IL-10) and liver (IFN- γ , TFG- β , TNF- α , IL-4, IL-10 and IL-17) cytokines levels were performed by ELISA. The association of infection induced a more severe PCM disease with increased CFU in liver (Pb70Sm42 and Pb80Sm52) and lung (Pb80Sm52) than control mono infected group ($p < 0.05$). The co-infection resulted in higher serum IgG to ExoAg (Pb70Sm42) and higher IFN- γ and IL-4 levels in both co-infected groups (Pb70Sm42 and Pb80Sm52) but IL-10 was increased in Pb70Sm42 and decreased in Pb80Sm52, than controls ($p < 0.05$). In the liver, IL-4 was increased only in Pb70Sm42 group, IL-10 shown the same pattern as the serum and TNF- α a increased in Pb70Sm42 but decreased in Pb80Sm52 and IL-17 higher in both co-infected groups than theirs controls. In conclusion, the association of

chronic Schistosomiasis mansoni infection induce more severe PCM disease and liver and systemic cytokines modulation.

Keywords: Cytokines, helminth, immunomodulation, mycosis, *Paracoccidioides brasiliensis*.

Introduction

Paracoccidioidomycosis (PCM), which is caused by the dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*, is one of the most important systemic mycoses in Latin America [1,2]. It is believed that airborne fungal propagules from *Paracoccidioides brasiliensis* with conidia or hyphal fragments initiate the infection and are converted to the yeast phase in the lungs, which is the infective stage for *P. brasiliensis* [3]. There are two forms of the PCM disease: the acute form (AF) and chronic form (CF). The CF is more frequent in men older than 40 years, and it ranges from a benign and localized (unifocal) to a severe and disseminated (multifocal) disease [4]. *P. brasiliensis* infection resistance is linked to the Th1 immune response pattern, and impaired cell-mediated immunity is associated with high levels of specific circulating antibodies in the disseminated disease [5,6].

Experimental infection using PCM mouse models have been shown that resistance to *P. brasiliensis* is linked to Th1 pattern of immune response, with resistant and susceptible mice strains have reported the dissemination of the fungus associated with a pattern of Th2 cytokines. Resistant strains produce a well-formed granuloma, whereas susceptible or suppressed T-cell animals appear to produce disorganised lesions, lacking the peripheral halo of small mononuclear cells with increased multiplication of fungus in the tissues [7,8,9,10,11].

Schistosomiasis is one of the major infectious diseases affecting developing countries. In Brazil, it is caused by *S. mansoni* and about 25 million persons live in the area of the risk. Infection is contracted by exposure to water containing helminth cercariae [12]. The parasite enters the host through the skin and locates to the mesenteric veins, where worm pairs deposit about 300 eggs per couple per day. The eggs may cross into the lumen of the intestine to exit the host, or they may be carried by the circulatory system via the portal vein into the liver [13,14]. In experimental schistosomiasis in mouse, a more Th1-like immune response is observed during the first weeks of infection. After 5-6 weeks with the onset of eggs deposition, however a pronounced Th2 immune response comes up being characterized by high production of cytokines IL-4, IL-13 and IgE synthesis [15].

Considering that the switch from Th1 to Th2 upon egg expulsion in the course of the schistosomiasis could be more impactful, this study investigated the PCM associated to schistosomiasis in initial phase of oviposition and oviposition phase of *S. mansoni*.

Material and methods

Animals and parasites

Adult 6- to 8-week-old male BALB/c mice (20 to 25 g) were fed “ad libitum” and housed in the Animal Laboratory of Parasitology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina. *S. mansoni* (BH) was kindly provided by Dr. Ana Lucia Falavignha Guilherme (State University of Maringá, PR, Brazil) that was maintained in Swiss mice and *Biomphalaria glabrata* snails. For infections, cercariae from infected snails were used (n = 10). *P. brasiliensis* virulent strain Pb18 (Pb18) was cultured in Sabouraud agar (Micromed, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), and maintained by sub-culturing at 35°C at 5-day intervals. For experimental infections, yeast cells were collected in sterile saline, filtered through cotton and gauze layers and was concentration adjusted to 5×10^6 cells/ml.

Experimental infection

For concomitant infection, the animals were randomly divided into four groups of 9 animals each for experiment a) Pb70Sm42 (infected with 5×10^6 *P. brasiliensis* during 70 days and co-infected with *S. mansoni* during 42 days) b) Pb80Sm52 (infected with *P. brasiliensis* during 80 days and co-infected with *S. mansoni* during 52 days); and as controls groups: c) Pb70 (infected with *P. brasiliensis* during 70 days); d) Pb80 (infected with *P. brasiliensis* during 80 days. Each animal was infected with 40 cercariae (percutaneously) and or 5×10^6 *P. brasiliensis* yeast cells (intravenously). The Ethics Committee for Animal Experimentation of our university approved all experimental protocols described in the present study.

Colony-Forming Units (CFU)

The liver and lung of each animal were aseptically removed, rinsed and homogenized in sterile PBS, pH 7.4 (0.2 g of tissue/ml). The homogenates (100µl) were cultured on BHI agar, according to Massuda et al. [16].

Histopathology Analysis

The organs (liver, lung), were removed, fixed in 10% paraformaldehyde solution and prepared by routine techniques of paraffin embedding. Histological 5 µm sections were stained with

haematoxylin/eosin (HE) or silver methenamine (Grocott) to detect the mycotic structures using standard protocols, and the slides were evaluated by light microscopy. To assess the granuloma diameter, histological slides (n= 3 tissue sections for each animal) were evaluated under a microscope (objective 10X), then they were photographed by a camera (Samsung SCC131B) attached to a microscope (Nikon E 100) and the diameter calculated using the program Image J 1.44 (NIH USA).

Level of IgG Anti- *P. brasiliensis* ExoAg

Humoral immune response to *P. brasiliensis* was evaluated by using ExoAg in ELISA.

Immunoplates were coated with *P. brasiliensis* ExoAg (50mg/ml), blocked, incubated with serum samples (1:10) at 37°C for 1 h and then with goat anti-mouse IgG labelled with peroxidase and the absorbance was read at 492 nm.

Liver and serum cytokine Assays

The liver of each animal was aseptically removed, one portion was homogenized in sterile PBS, pH 7.4 (0.2 g of tissue/ml) and macerated. After centrifugation (600 g, 10 min), the supernatant from each sample (liver) and serum samples were submitted for cytokines analysis. Cytokines IL-4, IL-10, IL-17, TNF- α , TGF- β and IFN- γ (eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA) levels were determined by commercial ELISA kits, according to the manufacturer's instructions. The absorbance was read into an ELISA microplate reader (iMarkTM Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) at 450 nm.

Statistical analysis

A data are expressed as a mean \pm SEM, unless otherwise described. ANOVA analyses of variance were applied. To compare level of cytokine in different groups, the Tukey multiple comparison analysis was used for nonparametric test. Differences with a $p < 0.05$ were considered significant. Analysis was formed using GraphPadPrisma 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

Results

Liver and Lung Pb Colony-Forming Units

The liver fungal burden by CFU resulted in a significant increase in viable colonies in co-infected groups (Pb70Sm42 and Pb80Sm52) when compared with control mono-infected group (Pb70 or Pb80), $p < 0.05$, Figure 1A. The lung CFU was higher only in co-infected Pb80Sm52 than control Pb80 Figure 1B.

Histopathology findings

Histopathological liver analysis (stained with HE) shows a larger *P. brasiliensis* granuloma in co-infected Pb80Sm52 than *P. brasiliensis* alone (Pb80). Figure 2, Figure 6.

Serum IgG Anti- *P. brasiliensis* ExoAg Levels

Humoral immune response to *P. brasiliensis* was evaluated by using ExoAg in ELISA. The mean ELISA results in OD at 492 nm showed statistically high levels of IgG anti-ExoAg in co-infected Pb70Sm42 group in relation to control mono infected Pb70 ($p < 0.05$) or to co-infected Pb80Sm52 group ($p < 0.05$). Similar levels was observed in co-infected Pb80Sm52 group in relation to control Pb80 ($p < 0.05$). Figure 3.

Serum cytokine levels

In both co-infected groups (Pb70Sm42 and Pb80Sm52) resulted in a marked increased serum IFN- γ (Figure 4A) and IL-4 (Figure 4B) levels than control mono infected ($p < 0.05$). IL-10 was increased in Pb70Sm42 but decreased in Pb80Sm52, than their controls ($p < 0.05$) (Figure 4C) and TGF- β level was higher only in Pb80Sm52 than control Pb80 ($p < 0.05$) (Figure 4D).

Liver cytokine levels

In both co-infected groups (Pb70Sm42 and Pb80Sm52) resulted in a marked increased liver IL-10 and IL-17 levels but increased IL-4 and TGF- β levels was detected only in Pb70Sm42 group, in relation to their controls mono infected ($p < 0.05$). TNF- α was increased in Pb70Sm42 but decreased in Pb80Sm52, than their controls ($p < 0.05$). Figure 5.

DISCUSSION

In this study it was investigated the co-infection in PCM associated to schistosomiasis in *S. mansoni* oviposition phase and higher fungal burden in liver and lung was detected in *S. mansoni*. In this period, in mono-infected mice it was detected reduced Pb CFU in the lung. This results probably due to control of the infection in a later period by BALBc mice. According to Calich et al. [17] BALBc mice is classified as intermediate resistant.

Unlike lung, high CFU was observed in the liver of co-infected at the earliest period of oviposition, possibly due to the different immune response developed in the liver. According to Grispe, 2009 [18] the immune response in the liver favors the tolerance and immunosuppression. In addition the fact of *S. mansoni* primarily infect the liver, the largest liver helminth load, could affect more than lung.

The highest IgG response to *P. brasiliensis* was observed in group Pb70Sm42. In this period it was not detected the presence of *S. mansoni* eggs in feces (data not shown), although some eggs have been detected in the liver. Possibly during this period occurred synergistic action of Th1-induced by *S. mansoni*. According to this hypothesis high levels of Th1 cytokine IFN- γ was detected in the sera of co-infected (Pb70Sm42) mice and this might explain the same fungal burden in the lungs of co-infected mice in this period. In the oviposition phase (Pb80Sm52), higher serum levels of IL-4 was detected in co-infected, although it has not been evaluated IgE or IgG sub-classes levels, possibly occurred Th2 response deviation and as a consequence, increase lung infection.

The lung is the main organ affected in PCM, but considering the permanence of the eggs in the liver and possible local cytokines modulation, in this study it was investigated cytokine levels and *P. brasiliensis* granuloma in this organ. Only the cytokine IL-10 presented the similar profile as the serum. Others investigated cytokines presented different profile, suggesting modulation of cytokines locally in the liver. In the liver, it was not detected increased IFN- γ levels in co-infected animals and fungal burden was higher than the lung in both co-infected groups. Also in *Leishmania donovani* co-infection with established *S. mansoni* infections in mice fail to control *L. donovani* growth and also suggested that granulomatous tissue responses to helminth organisms can form a discrete niche facilitating survival of intracellular pathogens [19].

IL-17, a cytokine produced by Th17 cells, has been considered as protective cytokine in some fungal infections [20]. But it was evidenced by Loures et al. 2009 [21] that the expression of TLR2 has a beneficial effect on pulmonary fungal infection due to its negative control on Th17. The authors suggested that uncontrolled inflammatory response of hosts to *P. brasiliensis* infection is as deleterious as uncontrolled fungal growth by absence or inadequate activation of immunity. In our study it was detected higher IL-17 levels in the liver of both co-infected groups.

Possibly other cytokines such as TNF- α , detected in higher levels mainly in mono infected (Pb80) with decreased fungal burden, may be acting in the liver. This cytokine acts in synergy with IFN- γ , stimulating the production of reactive nitrogen intermediates (RNIs), mediating the tuberculostatic function of macrophages [22].

In conclusion, the association of chronic Schistosomiasis mansoni infection induce more severe PCM disease mainly after oviposition phase of *S. mansoni* with local and systemic cytokines modulation.

Acknowledgments

We thank Mari S. Kaminami, Nilson de Jesus Carlos and Pedro Sebastião Dionizio for technical assistance. This work was supported by Fundação Araucária/PR, CAPES.

REFERENCES

1. Lacaz CS. Historical evolution of the knowledge on paracoccidioidomycosis and its etiologic agent, *Paracoccidioides brasiliensis*. In: Franco M, Lacaz CS, Restrepo-Moreno A, Del Negro G. eds. Paracoccidioidomycosis. 1st edn. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994: 1-11.
2. San Blas G. Paracoccidioidomycosis and its etiological agent *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Med Vet Mycol* 1993; **31**: 99-113.
3. McWeen JG, Bedoya V, Patino MM, Salazar MF, Restrepo A. Experimental murine paracoccidioidomycosis induced by inhalation of conidia. *J Med Vet Mycol* 1987; **25**: 165-75.
4. Franco M, Montenegro MR, Mendes RP, Marques SA, Dillon NL, Mota NG da S. Paracoccidioidomycosis: a recently proposed classification of its clinical forms. *Rev Soc Bras Med Trop* 1987; **20**: 129-132.
5. Oliveira SJ, Mamoni RL, Musatti, CC, Papaiordanou MO, Blotta MHSL. Cytokine and lymphocyte proliferation in juvenile and adult forms of paracoccidioidomycosis: comparison with infected and non-infected controls. *Microb Infec* 2002; **4**:139-144.
6. Benard G, Mendes-Gianinni MT, Juvenale M, Miranda ET, Duarte AJ. Immunosuppression in paracoccidioidomycosis: T cell hyporesponsiveness to two *Paracoccidioides brasiliensis* glycoproteins that elicit strong humoral immune response. *J Infect Diseases* 1997; **175**: 1263-1267.
7. Singer-Vermes LM, Caldeira CB, Burger E, Calich LG. Experimental murine paracoccidioidomycosis: relationship among dissemination of the infection, humoral and cellular immune responses. *Clin Exp Immunol* 1993; **94**: 75-79.
8. Vaz CA, Singer-Vermes LM, Calich VLG. Comparative studies on the antibody repertoire produced by susceptible and resistant mice to virulent and non-virulent *Paracoccidioides brasiliensis* isolates. *Am J Trop Med Hyg* 1998; **9**: 971-977.
9. Silva MF, Silva CL. The role of somatic structure of the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* upon B cell activation in experimental paracoccidioidomycosis. *Clin Experl Immunol* 1995; **101**:321-317.
10. Calich VLG, Kashino SS. Cytokines produced by susceptible and resistant mice in the course of *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *Braz J Med Biol Res* 1998; **31**: 615-623.
11. Burger E, Myiagi M.; Sanon A, Calich VL, Nishimura K, Lanzi HL. *Paracoccidioides brasiliensis* infection in nude mice: studies with isolates differing in virulence and definition of their T cell-dependent and T cell-independent components. *Am J Trop Med Hyg* 1996; **55**: 243-253.
12. Lambertucci JR. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010, **105**:422-435.

13. Burke, ML, Jones MK, Gobert GN, LI YS, Ellis MK, et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol* 2009; **31**:163–176.
14. Pearce E, Macdonald A The immunobiology of Schistosomiasis. *Nature Rev Immunol* 2002; **2**: 499-511.
15. Schramm G, Haas H Th2 immune response against *Schistosoma mansoni* infection. *Microbes Infect* 2010; **12**: 881-888.
16. Massuda TYC, Nagashima LA, Leonello PC, Kaminami MS, Mantovani MS, Sano A, Uno J, Venancio EJ, Camargo ZP, Itano EN. Cyclosporin A Treatment and Decreased Fungal Load/Antigenemia in Experimental Murine Paracoccidioidomycosis. *Mycopathologia*, 2011, **171**:161–169.
17. Calich VLG, Singer-Vermes LM, Siqueira AM, Burger E. Susceptibility and resistance of inbred mice to *Paracoccidioides brasiliensis*. *Br J Exp Pathol* 1985; **66**:585-594.
18. Grispe IN. The liver as lymphoid organ. *Annu Rev Immunol*, 2009, **27**:147-163.
19. Hassan MF, Zhang Y, Engwerda CR, Kaye PM, Sharp H, Bickle QD. The *Schistosoma mansoni* Hepatic Egg Granuloma Provides a Favorable Microenvironment for Sustained Growth of *Leishmania donovani*. *Am J Pathol* 2006, **169**:943-953.
20. Curtis MM; Way SS. Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunol* 2009, **126**:177–185.
21. Loures FV, Pina A, Felonato M., Vera LG, Calich VLG. TLR2 Is a Negative Regulator of Th17 Cells and Tissue Pathology in a Pulmonary Model of Fungal Infection. *J Immunol* 2009, **183**:1279-1290.
22. Cavalcanti, VN et al. Role of TNF-Alpha, IFN-Gamma, and IL-10 in the Development of Pulmonary Tuberculosis. *Pulmonary Medicine*, 2012, **2012**:1-10.

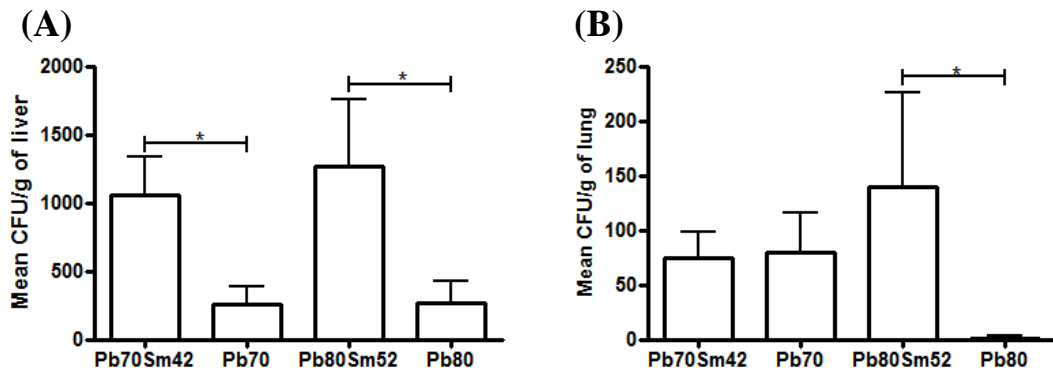


Figure 1. Liver (1A) and Lung (1B) *P. brasiliensis* Colony-Forming Units in group of mice infected with *P. brasiliensis* during 70 (Pb70) or 80 days (Pb80) associated with *S. mansoni* infected during 42 (Pb70Sm42) or 52 days (Pb80Sm52). Results are expressed as mean CFU/g. (* $p < 0.05$).

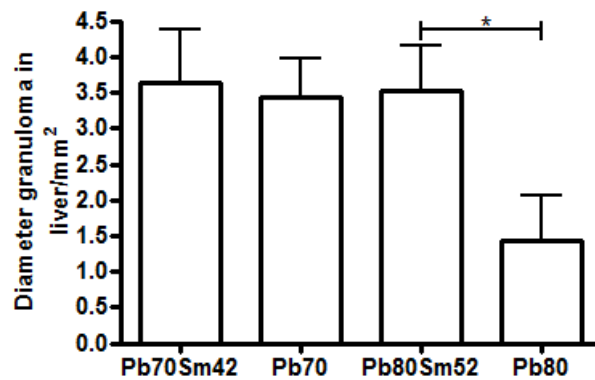


Figure 2. Diameter of *P. brasiliensis* granulomas in liver tissue. Granuloma diameters determined by morphometric analysis (expressed in mm^2) in group of mice infected with *P. brasiliensis* during 70 (Pb70) or 80 days (Pb80) associated with *S. mansoni* infected during 42 (Pb70Sm42) or 52 days (Pb80Sm52). Results are expressed as mean \pm SEM. (* $p < 0.05$).

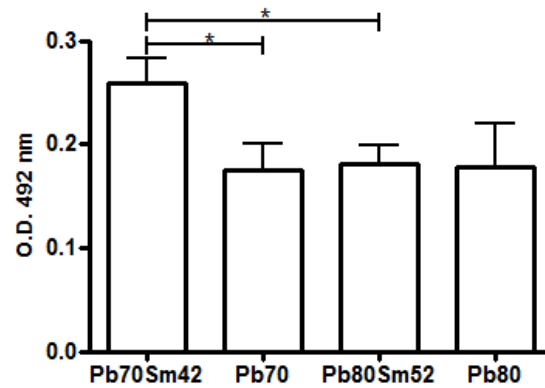


Figure 3. Serum IgG Anti-*P. brasiliensis* ExoAg Levels. The serum IgG anti-ExoAg levels were determined by ELISA in group of mice infected with *P. brasiliensis* during 70 (Pb70) or 80 days (Pb80) associated with *S. mansoni* infected during 42 (Pb70Sm42) or 52 days (Pb80Sm52). Results are expressed as mean optical density at 492 nm \pm SEM. Pb70Sm42 x Pb70; Pb70Sm42 x Pb80Sm52 = * $p < 0.05$.

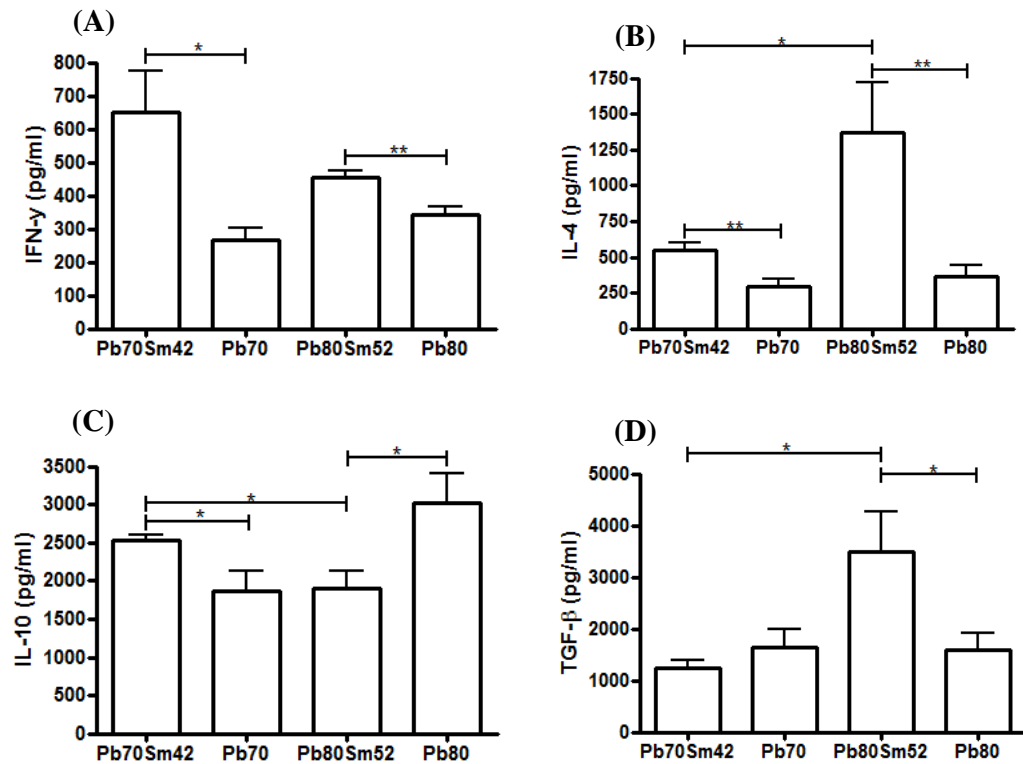


Figure 4. Cytokines profile in the serum. The IFN- γ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) and TGF- β (D) levels analyzed by capture ELISA and expressed in pg/ml in the serum of group of mice infected with *P. brasiliensis* during 70 (Pb70) or 80 days (Pb80) associated with *S. mansoni* infected during 42 (Pb70Sm42) or 52 days (Pb80Sm52). (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

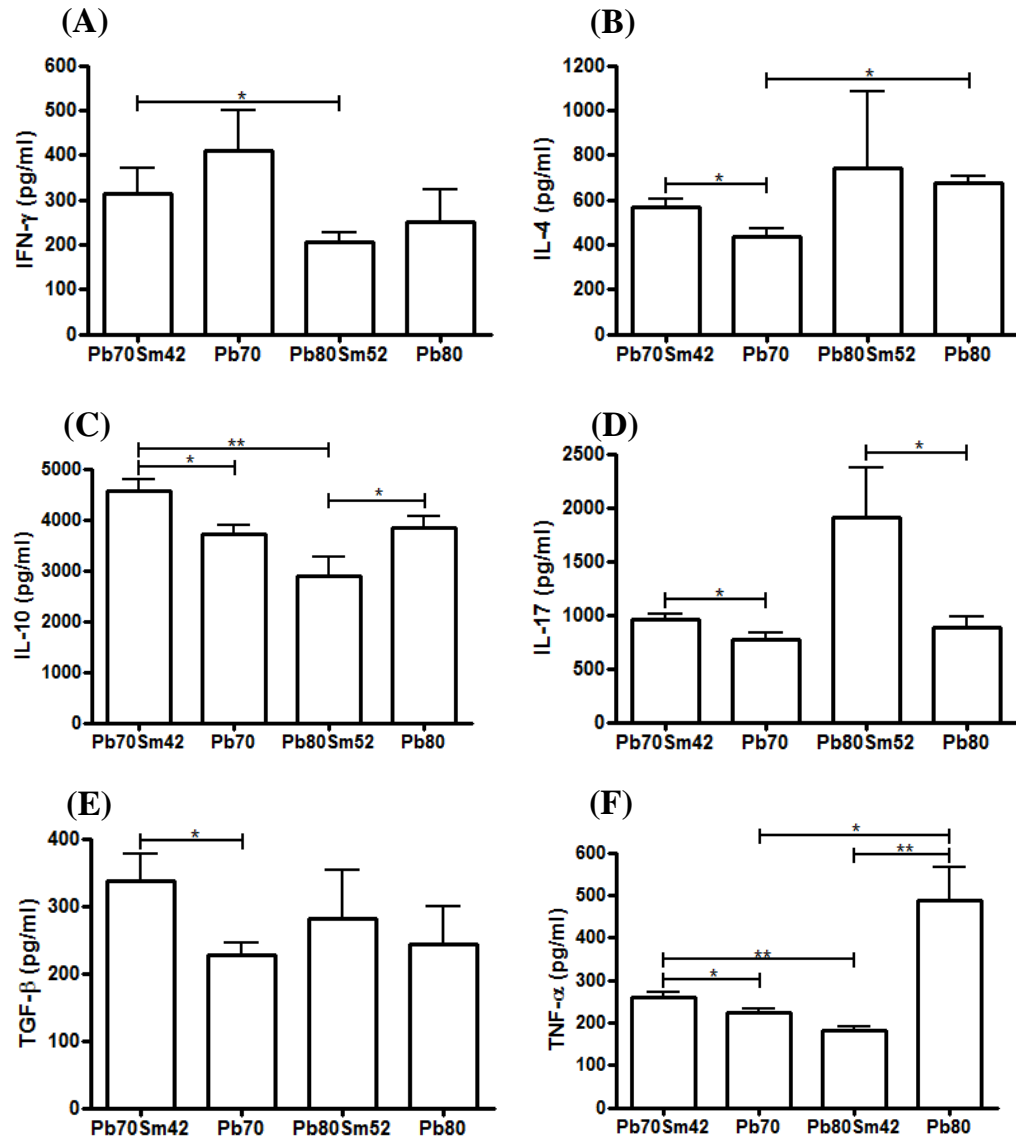


Figure 5. Cytokines profile in liver tissue samples. The IFN- γ (A), IL-4 (B), IL-10 (C), IL-17 (D), TGF- β (E) and TNF- α (F) levels analyzed by capture ELISA and expressed in pg/ml in liver tissue samples of group of mice infected with *P. brasiliensis* during 70 (Pb70) or 80 days (Pb80) associated with *S. mansoni* infected during 42 (Pb70Sm42) or 52 days (Pb80Sm52). (* p<0.05, ** p<0.01).

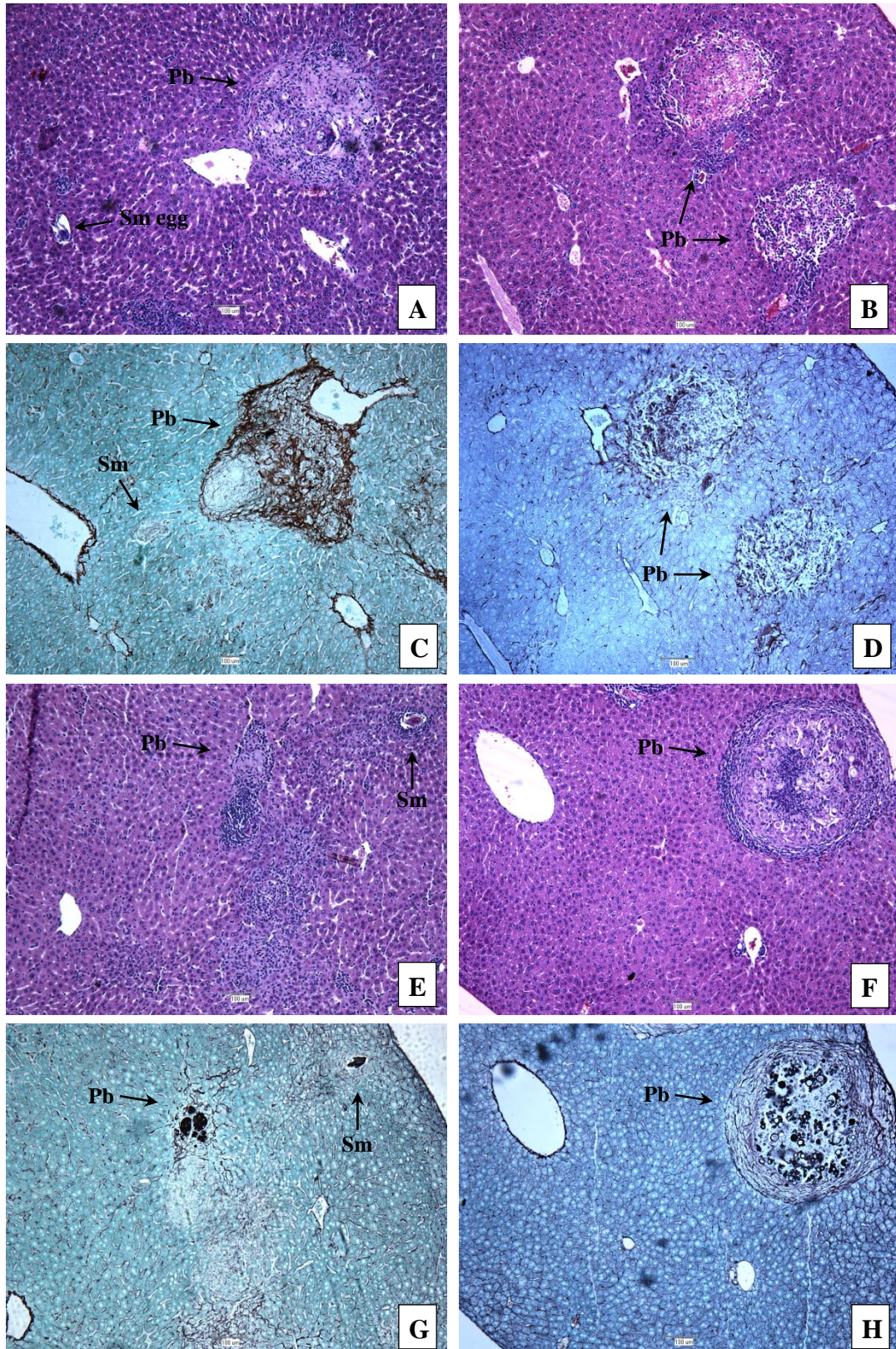


Figure 6. Liver histopathology. Histological lung of group of mice infected with *P. brasiliensis* during 70 (Pb70) or 80 days (Pb80) associated with *S. mansoni* infected during 42 (Pb70Sm42) or 52 days (Pb80Sm52). Stained with HE (A) Pb70Sm42, (B) Pb70; (E) Pb80Sm52, (F) Pb80 and by Grocott (C) Pb70Sm42, (D) Pb70; (G) Pb80Sm52, (H) Pb80. Arrow Pb (*P. brasiliensis* granuloma), Sm (*S. mansoni* egg granuloma).

5. Manuscrito 2

Coinfection with the fungus *Paracoccidioides brasiliensis* markedly reduces hepatic egg granulomas and immune responses in experimental murine schistosomiasis

Francisco José de Abreu*, Maria Claudia Noronha Dutra Menezes*, Jeferson Crespigio*, Paula Leonello Álvares e Silva*, Eiko Nakagawa Itano*

*Department of Pathology Science, State University of Londrina, UEL, Londrina, PR, Brazil.

Correspondence to: Francisco José de Abreu (abreu@uel.br) or Eiko Nakagawa Itano (itano@uel.br). Departamento de Ciências Patológicas, CCB. Universidade Estadual de Londrina. Campus Universitário. 86051-970 Londrina, PR, Brazil. E-mail: Tel/Fax: +55 43-3371-4267

Abstract

The major pathological lesions caused by *Schistosoma mansoni* infection are the granulomas that develop around eggs in the liver in response to the host immune response. This study investigated parasitological, immunological, and hepatopathological characteristics in mice co-infected with the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* and *S. mansoni* in the oviposition phase. BALB/c mice were co-infected with *P. brasiliensis* for 70 days and *S. mansoni* for 42 days or *P. brasiliensis* for 80 days and *S. mansoni* for 52 days, with the latter group encompassing the *S. mansoni* oviposition phase. Controls were mice mono-infected with *S. mansoni*. The *S. mansoni* egg load was determined by liver and intestinal histopathology analyses and fecal egg counts. Liver granulomas and cytokine levels (IL-4, IL-10, IFN- γ , IL-17, TGF- β and TNF- α) were determined by histopathology and ELISA, respectively. Serum antibodies IgG to soluble eggs antigen (SEA) and cytokine levels (IFN- γ , IL-4, IL-10 and TGF- β) were determined by ELISA. Reductions in the egg load in the liver, intestine and feces (all, $p < 0.05$), liver granuloma number and size (both, $p < 0.05$) and serum anti-SEA IgG levels ($p < 0.05$) were observed in mice co-infected with *P. brasiliensis* and *S. mansoni* in the oviposition phase. Additionally, changes in liver and systemic cytokine levels were detected. We concluded from these results that a longer period of co-infection induces more pronounced immune alterations and possibly more harmful host pathologies.

Keywords: Immunomodulation, schistosomiasis, paracoccidioidomycosis, cytokines.

Introduction

Schistosomiasis is a parasitic disease caused by worms of the *Schistosoma* genus that affects more than 200 million people living in tropical areas and approximately 10 percent of infected persons exhibit severe morbidity (Utzinger et al., 2011). An adult female worm produces as many as 300 eggs per day, and the main pathology caused by *Schistosoma mansoni* infection is a granulomatous and fibrosing inflammatory response evoked by parasite eggs lodged in the liver and intestines (Lundy; Lukacs, 2013). In a murine model of schistosomiasis, in the first 3–5 weeks post-infection, a Th1 immune response is activated, including increased Th1 cytokine levels. After 5–6 weeks, when worms begin to produce eggs, the immune response switches to a Th2 immune response (Todt et al., 2000; Pearce; MacDonald, 2002; Hams et al., 2013).

In the initial pro-inflammatory phase, CD4⁺ T cells enter the lesion and release the Th1-type cytokines IL-2 and IFN- γ , which promote the establishment of delayed-type hypersensitivity responses and early granuloma formation. The subsequent adaptive immune response to worm antigens is dominated by pro-inflammatory and Th1 cytokines, including TNF- α , IL-12, and IFN- γ . After egg deposition, larval miracidia release soluble egg antigens (SEA) that switch the Th1 response to Th2-dominated immunity, including the production of IL-4, IL-5, and IL-13 (Burke et al., 2009; Lundy; Lukacs, 2013).

According to Hoffmann et al. (2000), excessive Th1 and Th2 cytokine responses can induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. Deviation of the immune response can occur if concomitant infections induce Th1 or Th2 immunity. Co-infections and polyparasitism, common conditions in the developing world, can induce immunomodulation that results in synergistic or antagonistic interactions. Some studies have investigated co-infections of *Schistosoma* worms with viruses (Edwards et al, 2005), bacteria (Mikhail et al., 1981) or protozoa (Hassan et al., 2006; Yoshida et al., 2000) in humans and animal models.

This study investigated the parasitological, immunological, and hepatopathological characteristics of long-term co-infection with *S. mansoni* and *P. brasiliensis* in mice.

Material and methods

Animals and parasites

Adult 6- to 8-week-old male BALB/c mice (20 to 25 g) were fed “ad libitum” and housed in the Animal Laboratory of Parasitology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina. *S. mansoni* (BH) was kindly provided by Dr. Ana Lucia Falavignha Guilherme (State University of Maringá, PR, Brazil) that was maintained in Swiss mice and *Biomphalaria glabrata* snails. For infections, cercariae from infected snails were used (n = 10). *P. brasiliensis* virulent strain Pb18 (Pb18) was cultured in Sabouraud agar (Micromed, Rio de Janeiro, RJ, Brazil), and maintained by sub-culturing at 35°C at 5-day intervals. For experimental infections, yeast cells were collected in sterile saline, filtered through cotton and gauze layers and was concentration adjusted to 5×10^6 cells/ml.

Experimental infections

For concomitant infections, animals were randomly divided into four groups of 9 animals per experiment: a) mice infected with *S. mansoni* for 42 days and *P. brasiliensis* for 70 days (Pb70Sm42) and b) mice infected with *S. mansoni* for 52 days and *P. brasiliensis* for 80 days (Pb80Sm52). To determine the effect of co-infection, control groups were included mice infected only with *S. mansoni* for 42 or 52 days. Each animal was infected with 40 cercariae (percutaneously) and/or 5×10^6 *P. brasiliensis* yeast cells (intravenously). The Ethics Committee for Animal Experimentation of our university approved all experimental protocols. CEEA/Uel n° 13/09 process 2268/2009.

Histopathology

Organs (liver and lung) were removed, fixed in 10% paraformaldehyde solution and prepared by routine paraffin embedding techniques. For histology, 5 µm sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E) or by Picrosirius and organ pathologies were evaluated based on the presence of fungus cells, eggs, and inflammatory cells within granulomatous lesions. To assess the number of granulomas, slides (n= 3 tissue sections for each animal) were evaluated under a microscope (objective, 10×) to count the granulomas. Slides were photographed using a camera (Samsung SCC131B) attached to a microscope (Nikon E 100).

Determination of egg load

To determine stool egg load, the number of eggs per gram of feces was evaluated in triplicate using the quantitative copro parasitological Kato–Katz assay (Katz et al., 1970). To determine tissue egg loads, the liver and 1 cm segments of small and large intestine samples were weighed, incubated with KOH solution (KOH 5% at 56°C for 2 hours) and centrifuged at $600 \times g$ for 10 min. Sediments were re-suspended in distilled H₂O and analyzed under a light microscope with 40× magnification. The results were expressed as the number of eggs per gram tissue (Cheever, 1968; Cheever; Anderson, 1971; Machado-Silva et al., 1991).

Liver and serum cytokine assays

After the liver of each animal was aseptically removed, one portion was homogenized in sterile PBS (pH 7.4; 0.2 g of tissue/ml) and macerated. After centrifugation at $600 \times g$ for 10 min, the supernatant from each liver sample and serum samples were used for cytokine analysis. Levels of the cytokines IL-4, IL-17, IL-10, IFN- γ , TGF- β and TNF- α were measured using commercial ELISA kits (eBioscience, Inc., San Diego, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Absorbance was measured with an ELISA microplate reader (iMark™ Microplate Reader, Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) at 450 nm.

Anti-SEA IgG ELISA

Immunoplates coated with 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ SEA (kindly provided by Dr. Alfredo Miranda Goes from Minas Gerais Federal University) were incubated with serum samples diluted 1:10, followed by incubation with anti-mouse IgG conjugated with peroxidase. Antibody levels were assessed using an assay for peroxidase activity, in which plates were incubated with ortho-phenylenediamine (OPD) in phosphate citrate buffer with H₂O₂ (37%) and read at 492 nm with a Multiskan EX reader (Labsystems, Helsinki, Finland).

Statistical analyses

All data were expressed as the mean \pm SEM, unless otherwise indicated. ANOVA analysis of variance was used. To compare cytokine levels in different groups, the Tukey multiple comparison analysis was used for nonparametric tests. Differences for which $p < 0.05$ were

considered statistically significant. GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used for statistical analyses.

Results

S. mansoni egg load

At 42 days post-infection with *S. mansoni* cercariae, no eggs were detected in the mouse stool samples, as expected. At 52 days post-infection, increased egg numbers were detected in the stool, liver and intestine. In the intestine, the egg load was greatest in the small intestine of mono-infected (Sm52) mice compared to mice co-infected with *P. brasiliensis* (Pb80Sm52) ($p < 0.05$) (Fig. 1A–C).

Hepatopathology and liver mass

The number and size of *S. mansoni* egg granulomas were determined by histological analysis of liver sections (stained with H&E). Decreased numbers and sizes of *S. mansoni* egg granulomas were detected in co-infected mice compared to mice infected with *S. mansoni* alone ($p < 0.05$) (Figs. 2A, 2B). Furthermore, decreased liver weight was observed in both co-infected groups compared to respective control groups ($p < 0.05$) (Fig. 2C).

Additionally, liver sections stained with Picrosirius showed more diffuse collagen deposition that was not closely associated with granulomas in co-infected mice in the Pb80Sm52 group (Fig. 6G). By contrast, in the respective control group, collagen deposition was tightly associated with granulomas (Fig. 6H).

Liver cytokine levels

The levels of IL-4, IL-10 and TNF- α in the liver were expressed as pg/ml. Levels were decreased in both co-infected (Pb70Sm42 or Pb80Sm52) groups compared to respective control groups mono-infected with *S. mansoni* ($p < 0.05$). Furthermore, decreased TGF- β levels were observed in Pb70Sm42 mice compared to mono-infected Sm42 mice ($p < 0.05$). The IFN- γ and IL-17 levels were higher in Pb80Sm52 mice than in control Sm52 mice ($p < 0.05$) (Figs. 3A–3F).

Serum cytokine levels

Serum levels of IFN- γ and IL-4 (pg/ml) were higher in co-infected mice (Pb80Sm52) compared to control mice mono-infected with *S. mansoni* ($p < 0.05$) (Figs. 4A, 4B). IL-10 levels were higher in Pb70Sm42 and lower in Pb80Sm52 mice than in respective control Sm42 or Sm52 mice ($p < 0.05$) (Fig. 4C). By contrast, TGF- β levels were lower in Pb70Sm42 mice and higher in Pb80Sm52 mice than in respective control groups ($p < 0.05$) (Fig. 4D).

Serum anti-SEA IgG levels

Serum anti-SEA IgG levels were measured by ELISA. The mean ELISA results in O.D. at 492 nm showed significantly higher levels of anti-SEA IgG in Pb70Sm42 mice compared to control Sm42 mice ($p < 0.05$), but lower levels in Pb80Sm52 mice compared to control Sm52 mice ($p < 0.05$). These findings suggested that the humoral immune response was suppressed during the oviposition phase of co-infection (Fig. 5).

Discussion

In this study, analysis of the early stage of *S. mansoni* oviposition, 42 days post-infection, did not show eggs in stool samples by coprological analysis, although some eggs were detected in the liver. However, by 52 days post-infection, which we considered to include the oviposition phase, high loads of eggs were detected in feces and liver. In contrast to the high load of eggs in mice mono-infected with *S. mansoni*, decreased numbers of *S. mansoni* eggs in stool, liver and intestinal mucosa were observed in mice co-infected with the fungus *P. brasiliensis*.

The excretion of eggs is thought to depend on the host immune response. Minimal egg excretion has been observed in immunocompromised mice and in CD4⁺ T cell-depleted *S. mansoni*-infected HIV patients (Pearce; MacDonald, 2002). Mwinzi et al. (2001) investigated cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from patients with schistosomiasis who were positive or negative for HIV-1. They detected lower IL-4 and IL-10 production by HIV-1-negative individuals, but similar IFN- γ production between the two groups. In the present study, in support of Mwinzi et al. (2001), lower liver and systemic IL-4 and IL-10 levels were detected in mice co-infected with *P. brasiliensis* and *S. mansoni* in the oviposition

phase. However, higher IFN- γ levels were detected in this group, suggesting that co-infection induced Th1 responses.

Hoffmann et al. (2000) studied the Th1-polarized IL-10/IL-4-deficient mice in schistosomiasis and observed rapid weight loss at the onset of egg laying, progressing to 100% mortality by 9 weeks post-infection. Patton et al. 2001 also reported dramatic weight loss followed by death in IL-4-deficient mice with schistosomiasis. Interestingly, we observed rapid weight loss in our co-infected mice (data not shown) and, to avoid mortality, analyses were performed at 52 days post-infection.

In this study, a smaller size of granulomas in the liver of co-infected animals was detected. According to Amiri et al., 1992, TNF- α is necessary and sufficient to reconstitute granuloma formation in schistosome-infected SCID mice. Joseph and Boros (1993) found that focally and systemically produced TNF- α influences the development of the schistosome egg-induced granulomatous response. Furthermore, administration of graded dosages of recombinant murine TNF- α to mice with chronic infection restored the size of the down-modulated granulomas to the level observed in vigorous lesions. Accordingly, we detected decreased egg granuloma size in the liver and decreased hepatic TNF- α levels in both co-infected groups, suggesting the possible induction of the granuloma down-modulation by TNF- α in *P. brasiliensis* co-infection.

TNF- α has been associated with an increased risk of developing severe fibrosis in infected individuals (Henri et al., 2002; Booth et al., 2004). By contrast, IFN- γ is considered to be anti-fibrogenic because of its ability to inhibit the production of extracellular matrix proteins by decreasing collagen synthesis and boosting metalloproteinases responsible for collagen degradation (Duncan, Berman, 1985; Mallat et al., 1995; Dessein et al., 2004). Accordingly, Picrosirius staining of liver tissue showed that tissue collagen deposition during the oviposition period of co-infected mice was more diffuse, not tightly associated with granulomas.

IL-17 is considered to be associated with immunopathology in schistosomiasis (Shainheit et al., 2008, Rutitzky et al., 2005) and higher levels of IL-17 were detected in co-infected mice. In addition to IL-17, as previously mentioned, IFN- γ levels were also higher in livers of co-infected mice. IL-17 and IFN- γ are considered to be an important part of a larger and more complex series of biological events that result in severe disease (Smith et al., 2009). However, according to Rutitzky et al., 2005, IL-17, but not IFN- γ , is the CD4⁺ T cell-derived cytokine that is most directly associated with the severity of hepatic granulomatous

inflammation. These findings indicate that an IL-17-producing T cell is a major driver of severe pathology in schistosomiasis.

TGF- β is a pleiotropic cytokine produced by regulatory T cells and has been associated with fibrosis because of its ability to induce collagen deposition by inhibiting matrix metalloproteinases (Letterio, Roberts, 1998; Farah et al., 2000). However, whether TGF- β influences the progression and magnitude of liver fibrosis has been the subject of debate (Jesus et al., 2004). Others have questioned whether this cytokine in combination with IL-10 has a protective role against the development of fibrosis (Remoue et al., 2001; Kitani et al., 2003; Hesse et al., 2004; Alves Oliveira et al., 2006). Herbert et al (2008) blocked this cytokine using anti-TGF- β mAb along with anti-IL-10R mAb treatment and detected severe hepatic inflammation with enlarged necrotic liver granulomas, cachexia, and >80% mortality by 8 weeks post-infection in mice. In the present study, similar liver TGF- β levels were detected in the co-infected group in the oviposition phase, although lower levels were detected in the initial phase of oviposition. These results suggested that TGF- β is not involved with the modulation of granuloma size in the liver of mice co-infected with *P. brasiliensis*, at least in the oviposition phase. However, different profiles were detected in the serum, suggesting the modulation of these cytokines by other tissues or organs not investigated here.

Fallon et al., (2000) investigated IgG transfer to schistosome-infected CD4-depleted mice and observed that antibody afforded protection. These authors suggested that this protection might be caused in part by hepatotoxin-neutralizing antibodies that are secreted from viable eggs in situ. The present study detected higher IgG anti-SEA levels in the co-infected group in the initial phase of oviposition than in control mice mono-infected with *S. mansoni*. However, during the oviposition phase, reduced IgG anti-SEA levels compared to controls were detected, suggesting that IgG production was suppressed during the oviposition phase.

According to Hams et al. (2013), although the egg granuloma is detrimental because of the inflammation and associated fibrosis, the formation of granulomas is essential to protect the host from toxins secreted by the egg; antibodies are also important for preventing hepatocyte damage by these toxins.

In this study, lower liver weights were detected in co-infected animals, possibly because of cachexia. However, we cannot rule out the possibility that the decreased mass was caused by hepatocyte death, and we note that the decreased antibody levels and disorganized

granuloma formation may allow the spread of hepatotoxic molecules from *S. mansoni* eggs in the liver.

In conclusion, in schistosomiasis caused by *S. mansoni*, co-infection with *P. brasiliensis* results in reductions in egg load, liver granuloma number and size, and serum anti-SEA IgG levels, in addition to the modulation of cytokine levels. This immune modulation could be harmful to the host during a longer period of co-infection, which will be the subject of further studies.

Acknowledgments

We thank Mari S. Kaminami, Nilson de Jesus Carlos and Pedro Sebastião Dionizio for technical assistance. This work was supported by Fundação Araucária/PR, CAPES.

REFERENCES

- ALVES OLIVEIRA LF. Cytokine production associated with periportal fibrosis during chronic schistosomiasis mansoni humans. *Infect Immun*. 2006, **74**:1215-21.
- AMIRI P. et al. Tumour necrosis factor α restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected SCID mice. *Nature*. 1992, **356**(6370):604–607.
- BOOTH M. et al. Periportal fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection is associated with low IL-10, low IFN- γ , high TNF- α , or low RANTES, depending on age and gender. *J Immunol*. 2004, **172**:1295-1303.
- BURKE ML, JONES MK, GOBERT GN, LI YS, ELLIS MK, McMANUS DP. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. *Parasite Immunol*. 2009, **31**:163–176.
- CHEEVER AW, ANDERSON LA. Rate of destruction of *Schistosoma mansoni* eggs in tissues of mice. *Am J Trop Med Hyg*. 1971, **20**:62-8.
- CHEEVER AW. Conditions affecting accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull World Health Organ*. 1968, **39**:328-331.
- DESSEIN A. et al. Interleukin-13 in the skin and 47 interferon-g in the liver are key players in immune protection in human schistosomiasis. *Immunol Rev*. 2004, **201**:180-190.
- DUNCAN MR, BERMAN B. γ Interferon is the lymphokine and β Interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. *J Exp Med*. 1985, **162**:516-27.
- EDWARDS MJ, BUCHATSKA O, ASHTON M, MONTOYA M, BICKLE QD et al. Reciprocal immunomodulation in a schistosome and hepatotropic virus coinfection model. *J Immunol*. 2005, **175**:6275-6285.
- FALLON PG, RICHARDSON RE, MCKENZIE GJ, MCKENZIE AN. 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*. 2000, **164**:2585–2591.
- FARAH IO et al. Repeated exposure induces periportal fibrosis in *Schistosoma mansoni*-infected baboons: role of TGF- β and IL-4. *J Immunology*. 2000, **164**:5337-5343.
- HAMS E, AVIELLO G, FALLON PG. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front Immunol*. 2013, **4**:1-8.
- HASSAN MF, ZHANG Y, ENGWERDA CR, KAYE PM, SHARP H et al. The *Schistosoma mansoni* hepatic egg granuloma provides a favorable microenvironment for sustained growth of *Leishmania donovani*. *Am J Pathol*. 2006, **169**:943-953.
- HENRI S et al. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN- γ is associated with protection against fibrosis and TNF- γ with aggravation of disease. *J Immunol*. 2002, **169**:929-36.

HERBERT DBR, OREKOV T, PERKINS C, FINKELMAN FD. IL-10 and TGF- β Redundantly Protect against Severe Liver Injury and Mortality during Acute Schistosomiasis *J Immunol*. 2008, **181**(10):7214–7220.

HESSE M et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating il-10 producing innate effector and regulatory t cells. *J Immunol*. 2004, **172**:3157-3166.

HOFFMANN KF, CHEEVER AW, WYNN TA. IL-10 and the Dangers of Immune Polarization: Excessive Type 1 and Type 2 Cytokine Responses Induce Distinct Forms of Lethal Immunopathology in Murine Schistosomiasis. *J Immunol*. 2000, **164**:6406-6416.

JESUS AR. Association of type 2 cytokine with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun*. 2004, **72**:3391-3397.

JOSEPH AL, BOROS DL. Tumor necrosis factor plays a role in *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous inflammation. *J Immunol*. 1993, **151**:5461-71.

KATZ N. et al. Evaluation of Kato's quantitative method through the recovery of *Schistosoma mansoni* eggs added to human feces. *J Parasitol*. 1970, **56**:1032-3.

KITANI A et al. Transforming Growth Factor (TGF)- β 1-producing regulatory T cells induce Smad-mediated Interleukin 10 secretion that facilitates coordinated immunoregulatory activity and amelioration of TGF- β 1-mediated fibrosis. *J Exp Med*. 2003, **198**:1179-1188.

LETTERIO JJ, ROBERTS AB. Regulation of immune responses by TGF- β . *Annual of Rev Immunol*. 1998, **16**:137-61.

LUNDY AK, LUKACS NW. Chronic schistosome infection leads to modulation of granuloma formation and systemic immunosuppression. *Front Immunol*, 2013, **4**:1-18.

MACHADO E SILVA JR et al. Experimental models of mansonian schistosomiasis: *Akodon arviculoides* (Rodentia: Cricetidae). *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 1991, **33**:257-261.

MALLAT A et al. Interferon- α and γ inhibit proliferation and collagen synthesis of human Ito cells in culture. *Hepatology*. 1995, **21**:1003-1010.

MIKHAIL IA, HIGASHI GI, MANSOUR NS, EDMAN DC, ELWAN SH. *Salmonella paratyphi* A in hamsters concurrently infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 1981, **30**: 385-393.

MWINZI PNM et al. Cellular immune responses of schistosomiasis patients are altered by human immunodeficiency virus type 1 coinfection. *J Infect Dis*. 2001, **184**:488-496.

PATTON EA et al. Severe Schistosomiasis in the Absence of Interleukin-4 (IL-4) Is IL-12 Independent. *Infect Immun*. 2001, **69**: 589-592.

PEARCE EJ, MACDONALD AS. The immunobiology of Schistosomiasis. *Nat Rev Immunol*. 2002, **2**:499-511.

REMOUE F et al. Gender-dependent specific immune response during chronic human Schistosomiasis haematobia. *Clin Exp Immunol*. 2001, **124**:62-8.

RUTITZKY LI et al, Severe CD4 T cell-mediated immunopathology in murine schistosomiasis is dependent on IL-12p40 and correlates with high levels of IL-17. *J Immunol.* 2005, **175**:3920-3926.

SHAINHEIT MG et al. Dendritic cell IL-23 and IL-1 production in response to schistosome eggs induces Th17 cells in a mouse strain prone to severe immunopathology. *J Immunol* 2008, **181**:8559–8567.

SMITH AM et al. Disordered macrophage cytokine secretion underlies impaired acute inflammation and bacterial clearance in Crohn's disease. *J Exp Med.*, 2009, **206**: 1883–1897.

TODT JC, WHITFIELD JR, IVARD SR, BOROS DL. Down-Regulation of Interleukin-12, Interleukin-12R Expression/Activity Mediates the Switch from Th1 to Th2 Granuloma Response during Murine Schistosomiasis Mansoni. *Scand J Immunol.* 2000, **52**:385-392.

UTZINGERA JB, N'GORAN EK, CAFFREYE CR, KEISERB J. From innovation to application: Social–ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. *Acta Trop.* 2011, **120S**:S121–S137.

YOSHIDA A et al. *Schistosoma mansoni* infection cancels the susceptibility to *Plasmodium chabaudi* through induction of type 1 immune responses in A/J mice. *Int Immunol.* 2000, **12**:1117-1125.

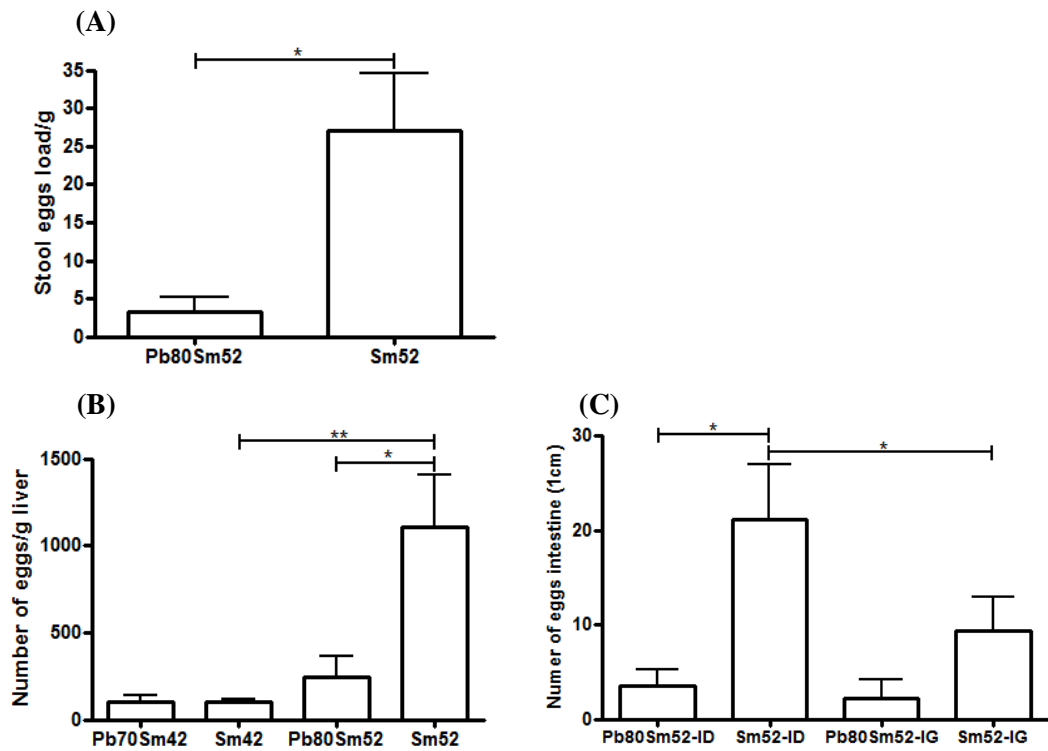


Figure 1. *S. mansoni* egg load. The *S. mansoni* egg load in groups of BALB/c mice co-infected for 70 days with *P. brasiliensis* and for 42 days with *S. mansoni* (Pb70Sm42), co-infected for 80 days with *P. brasiliensis* and for 52 days with *S. mansoni* (Pb80Sm52), or controls mono-infected with *S. mansoni* for 42 days (Sm42) or 52 days (Sm52). Stool egg load was expressed as eggs/g feces (A). Liver egg load was expressed as eggs/g tissue (B). Small (ID) and large (IG) intestine egg loads were expressed as eggs/cm intestine tissue (C). Each bar represents the mean \pm SEM (* p<0.05, ** p<0.01).

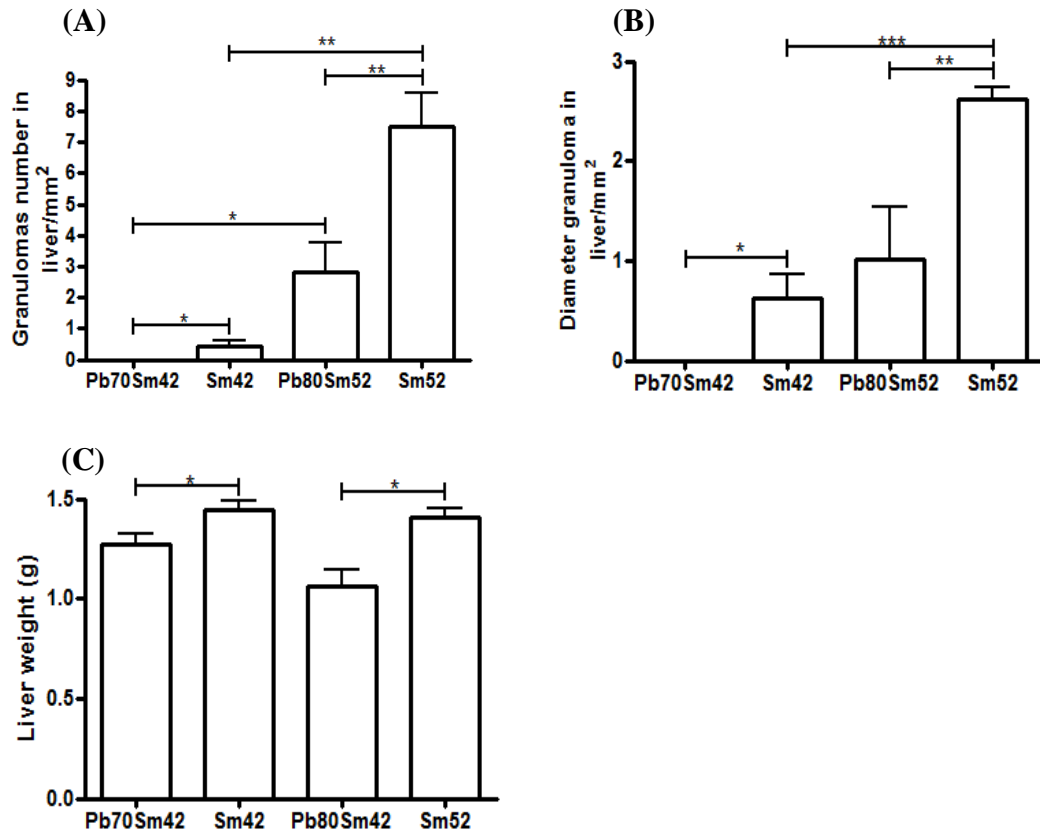


Figure 2. *S. mansoni* egg granuloma number and size and liver mass. *S. mansoni* egg granuloma number and size were determined by analysis of slides of stained liver tissue in groups of BALB/c mice co-infected for 70 days with *P. brasiliensis* and for 42 days with *S. mansoni* (Pb70Sm42), co-infected for 80 days with *P. brasiliensis* and for 52 days with *S. mansoni* (Pb80Sm52), or controls mono-infected with *S. mansoni* for 42 days (Sm42) or 52 days (Sm52). The liver egg granuloma number was expressed in mm² (liver mm²) (A), the granuloma size was measured as diameter/mm² (B) and liver mass was indicated in grams (g) (C). Each error bar indicates the mean \pm SEM (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

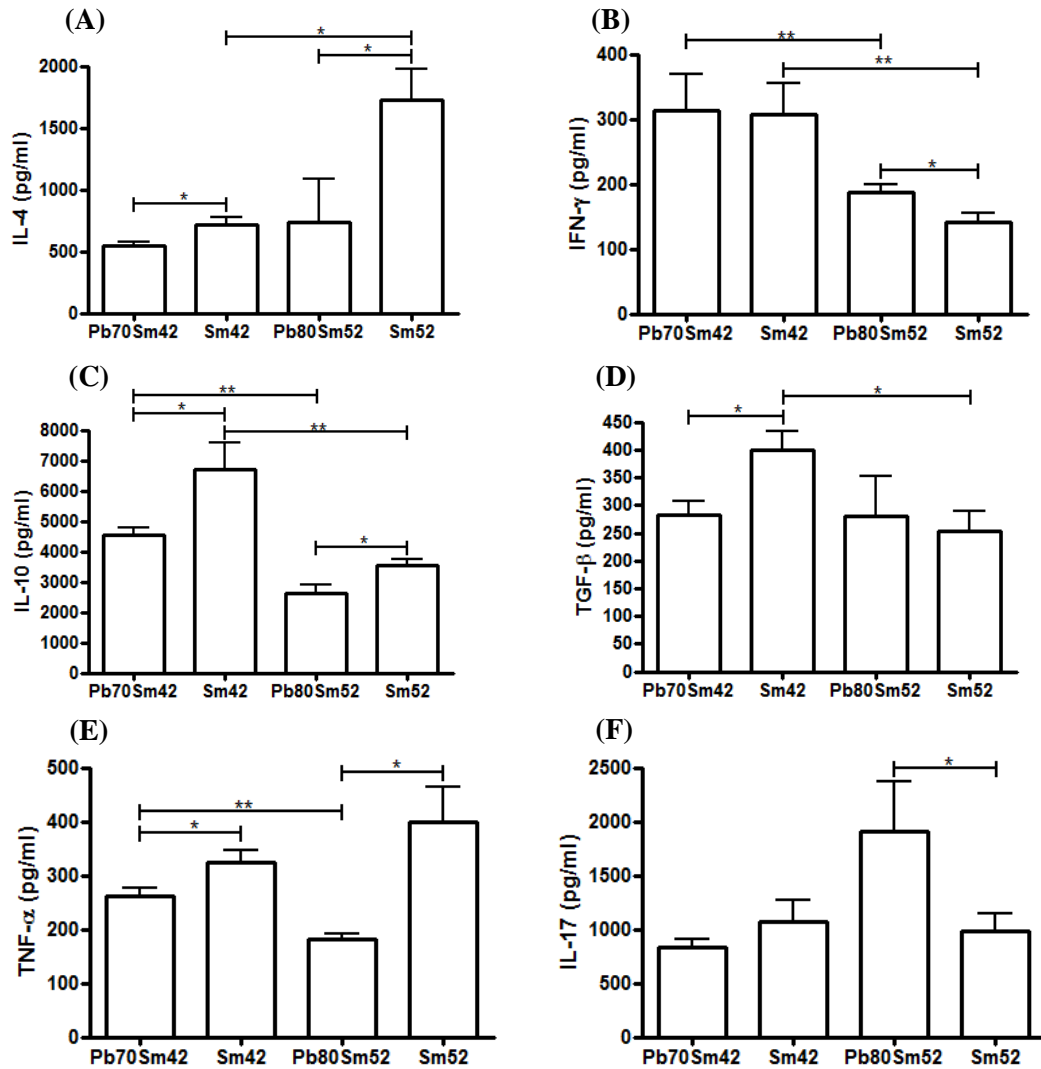


Figure 3. Liver cytokine levels. Measurement of IL-4 (A), IFN- γ (B), IL-10 (C), TGF- β (D) TNF- α (E), and IL-17 (F) cytokines in the livers of BALB/c mice co-infected for 70 days with *P. brasiliensis* and for 42 days *S. mansoni* (Pb70Sm42), co-infected for 80 days with *P. brasiliensis* and for 52 days *S. mansoni* (Pb80Sm52), or controls mono-infected with *S. mansoni* for 42 days (Sm42) or 52 days (Sm52). Each bar represents the mean \pm SEM (* p<0.05, ** p<0.01).

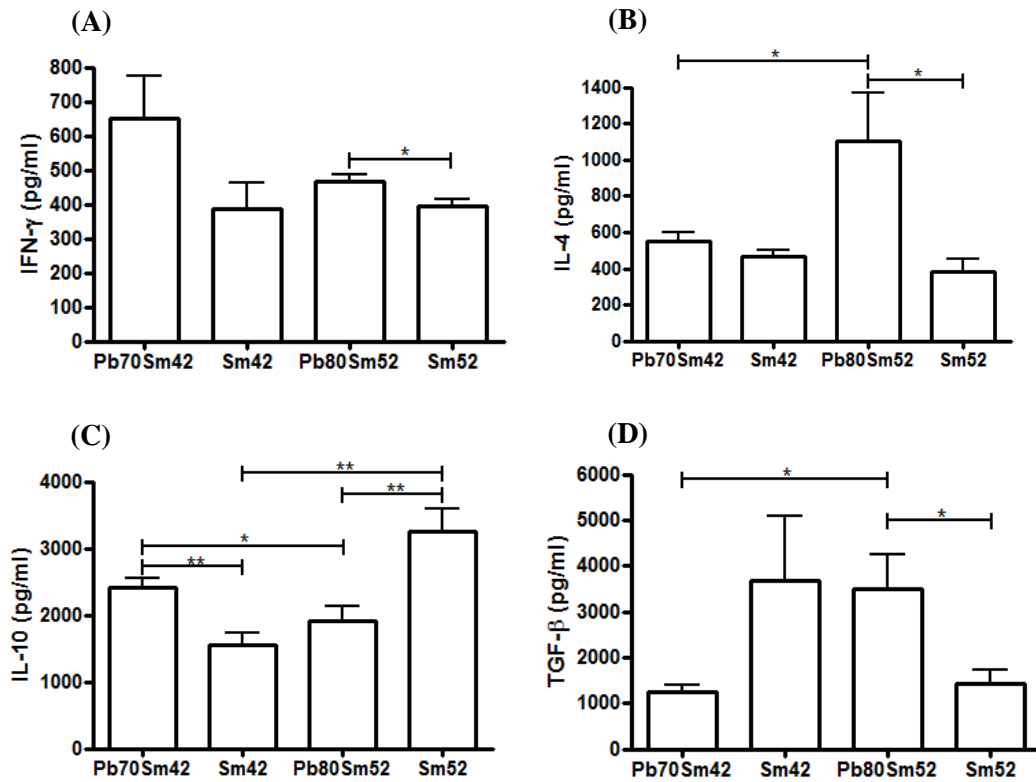


Figure 4. Serum cytokine levels. Measurements of IFN- γ (A), IL-4 (B), IL-10 (C) and TGF- β (D) cytokines in the serum of BALB/c mice co-infected for 70 days with *P. brasiliensis* and for 42 days with *S. mansoni* (Pb70Sm42), co-infected for 80 days with *P. brasiliensis* and for 52 days with *S. mansoni* (Pb80Sm52), or controls mono-infected with *S. mansoni* for 42 days (Sm42) or 52 days (Sm52). Each error bar indicates the mean \pm SEM (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

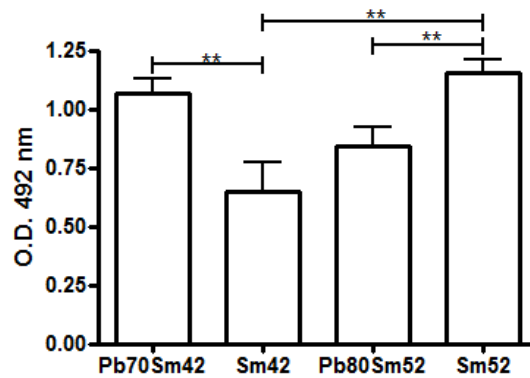


Figure 5. Serum anti-*S. mansoni* soluble egg antigen (SEA) IgG levels. Serum anti-SEA IgG levels were measured by ELISA in groups of BALB/c mice co-infected for 70 days with *P. brasiliensis* and for 42 days with *S. mansoni* (Pb70Sm42), co-infected for 80 days with *P. brasiliensis* and for 52 days with *S. mansoni* (Pb80Sm52), or controls mono-infected with *S. mansoni* for 42 days (Sm42) or 52 days (Sm52). Each error bar indicates the mean \pm SEM for the O.D. at 492 nm (** $p < 0.01$).

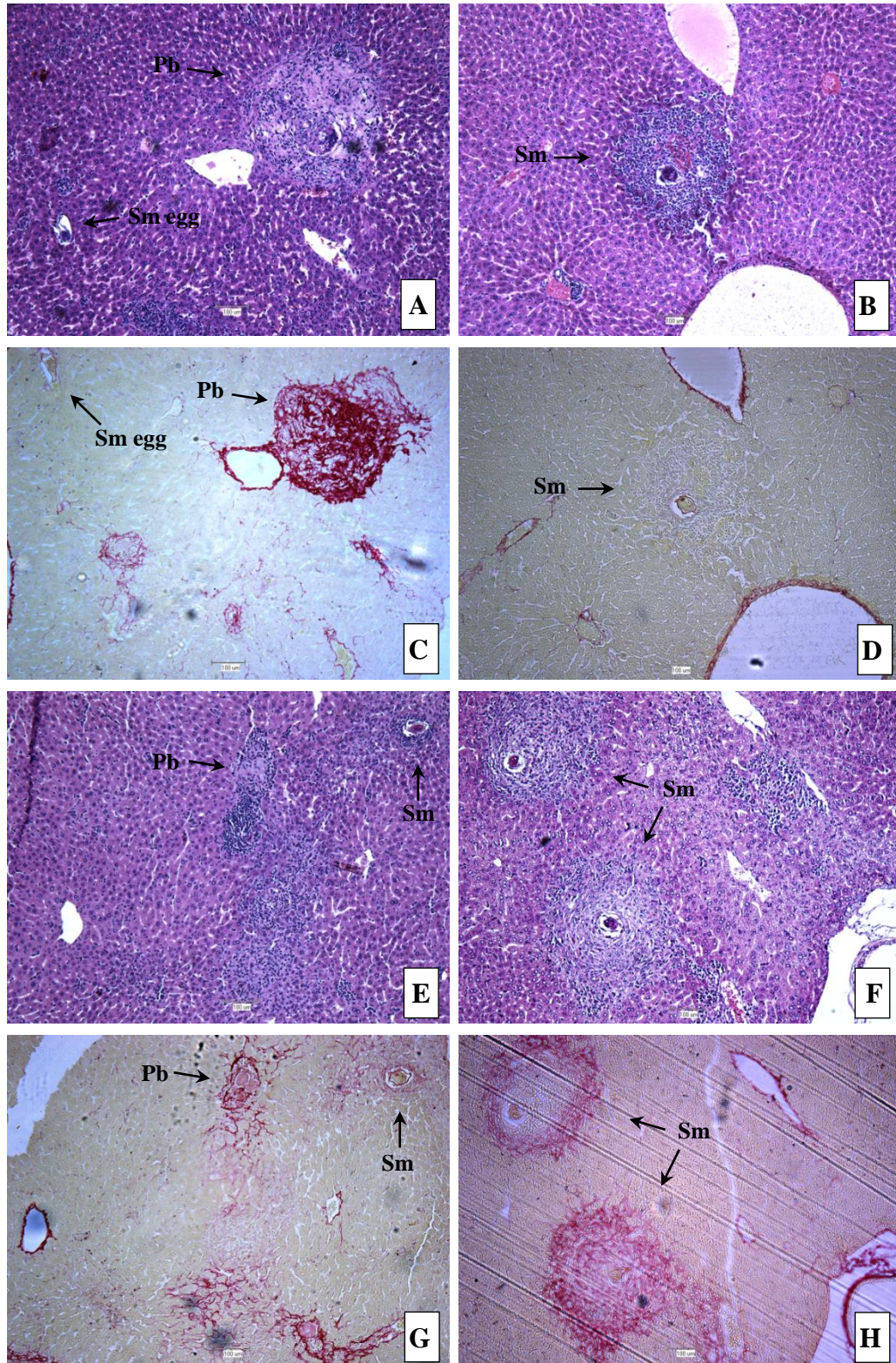


Figure 6. *S. mansoni* and *P. brasiliensis* granulomas in the liver. Liver sections were stained with H&E: A) BALB/c mice co-infected for 70 days with *P. brasiliensis* and for 42 days with *S. mansoni* (Pb70Sm42); B) mono-infected with *S. mansoni* for 42 days (Sm42); E) co-infected for 80 days with *P. brasiliensis* and for 52 days with *S. mansoni* (Pb80Sm52); and F) mono-infected with *S. mansoni* for 52 days (Sm52). Liver sections stained with Picrosirius: C) Pb70Sm42; D) Sm42; G) Pb80Sm52; and H) Sm52. Arrows indicate granulomas of *P. brasiliensis* (Pb), *S. mansoni* (Sm) and *S. mansoni* egg (Sm egg). Images were acquired using a 10× objective.

6. CONCLUSÕES

1. Na PCM crônica associada à infecção com *S. mansoni* na fase de oviposição e com período mais prolongado de associação, ocorre indução de aumento nos números de CFUs de *P. brasiliensis* tanto no fígado como no pulmão. Este aumento é induzido apenas no fígado e não no pulmão na fase inicial de oviposição, sugerindo maior gravidade da PCM doença quando associado ao período de oviposição de *S. mansoni* e com maior período de co-infecção.

2. Na PCM crônica associada à infecção com *S. mansoni* na fase inicial de oviposição ocorre aumento nos níveis de citocinas IL-4, IL-10 e IL-17, TGF- β e TNF- α e diminuição de IFN- γ no fígado, sugerindo modulação de resposta de padrão Th2. Na fase mais prolongada de infecção associada à oviposição de *S. mansoni* ocorre também aumento nos níveis de citocinas IL-4 e IL-17, mas com diminuição de IL-10 e TNF- α , não ocorrendo alterações nos níveis de IFN- γ e TGF- β .

3. Na PCM crônica associada à infecção com *S. mansoni* na fase inicial de oviposição ocorre aumento nos níveis séricos de citocinas IL-4, IL-10 e IFN- γ e na fase mais prolongada de infecção associada à oviposição de *S. mansoni* ocorrendo também aumento nos níveis de IFN- γ e TGF- β , sugerindo modulação de citocinas de forma sistêmica.

4. Na PCM crônica associada à infecção com *S. mansoni* ocorre aumento nos níveis séricos de IgG anti-ExoAg de *P. brasiliensis* na fase inicial de oviposição de *S. mansoni*, ocorrendo supressão na fase de oviposição e com período mais prolongado de co-infecção, tornando similar ao controle mono infectado com *P. brasiliensis*.

5. Na esquistossomose ocorre redução no número de ovos de *S. mansoni* nas fezes e também no tecido hepático e mucosa intestinal, quando associado à infecção com o fungo *P. brasiliensis*.

6. Na esquistossomose ocorre diminuição no número e no tamanho de granulomas hepáticos quando associados à infecção com o fungo *P. brasiliensis*.

7. Na esquistossomose, na fase inicial de oviposição de *S. mansoni*, associada à PCM crônica ocorre diminuição nos níveis de citocinas IL-4, IL-10, TGF- β e de TNF- α no fígado. Já na fase de oviposição de *S. mansoni*, associada à PCM crônica ocorre diminuição nos níveis de citocinas IL-4, IL-10 e de TNF- α .

8. Na esquistossomose, na fase inicial de oviposição de *S. mansoni*, associada à PCM crônica ocorre aumento nos níveis séricos de IFN- γ , IL-4, IL-10 e na fase de oviposição de *S. mansoni* ocorre também aumento nos níveis séricos de IFN- γ e IL-4, mas diminuição de IL-10 e aumento de TGF- β .

9. Na esquistossomose, na fase inicial de oviposição de *S. mansoni*, associada à PCM crônica ocorre aumento no nível sérico de IgG anti-SEA e na fase de oviposição de *S. mansoni* ocorre diminuição no nível sérico de IgG anti-SEA.

10. Em conjunto, a co-infecção de *P. brasiliensis* e *S. mansoni* induz mutuamente modulações de citocinas e anticorpos que podem afetar ambas as doenças, PCM e esquistossomose.



AMERICAN JOURNAL EXPERTS

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:

Coinfection with the fungi *Paracoccidioides brasiliensis* markedly reduces hepatic egg granuloma and immune response in experimental murine Schistosomiasis

Authors:

Francisco José de Abreu, Maria Claudia Noronha Dutra Menezes, Jeferson Crespigno, Paula Leonello Álvares e Silva, Eiko Nakagawa Itano.

Date Issued:

April 6, 2014



Certificate Verification Key:

29A2-50F8-685F-3FA2-3618

This certificate may be verified at www.aje.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@aje.com.

American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit www.aje.com.