



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Saúde Pública



Renata Pinto Ramos

**INFECÇÃO ESQUISTOSSOMÓTICA
AGUDA: PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM
CAMUNDONGOS DESNUTRIDOS E
DEFICIENTES EM INOS**

RECIFE
2007

RENATA PINTO RAMOS

**INFECÇÃO ESQUISTOSSOMÓTICA AGUDA: PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM
CAMUNDONGOS DESNUTRIDOS E DEFICIENTES EM INOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadores: Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro

Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath

Recife, 2007

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu
Magalhães

R175i Ramos, Renata Pinto.

Infecção esquistossomótica aguda: produção de citocinas em camundongos desnutridos e deficientes em iNOS / Renata Pinto Ramos. – Recife: R. P. Ramos, 2007.

73p. : il.

Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, abril de 2007.

Orientadores: Silvia Maria Lucena Montenegro, Frederico Guilherme Coutinho Abath (*in memoriam*).

1. Esquistossomose. 2. Esquistossomose – imunologia. 3. Citocinas. I. Montenegro, Silvia Maria Lucena. II. Título.

CDU 616.995.122

RENATA PINTO RAMOS

INFECÇÃO ESQUISTOSSOMÓTICA AGUDA: PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CAMUNDONGOS DESNUTRIDOS E DEFICIENTES EM INOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em ____/____/____

Banca Examinadora

**Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro
(Orientadora) CPqAM – FIOCRUZ**

**Dra. Eridan de Medeiros Coutinho
(Titular – Depto. Imunologia – CPqAM – Fiocruz)**

**Dra. Elizabeth Malagueño
(Titular – Depto. Medicina Tropical – UFPE)**

**Dra. Valeria Rêgo Alves Pereira
(Suplente – Depto. Imunologia – CpqAM – Fiocruz)**

**Dra. Vladia Maria Assis Costa
(Suplente – Depto. Medicina Tropical – UFPE)**

Aos meus pais Valfredo e Solange,
à minha irmã Priscila e ao Marcello
por todo o carinho e dedicação;

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar a minha vida, sempre me mostrando os melhores caminhos e por me amparar nos momentos difíceis.

À Dra. Silvia Montenegro por ter aceito ser minha orientadora. Pela dedicação, confiança, incentivo e carinho.

Ao Dr. Frederico Guilherme Coutinho Abath que, fazendo muita falta neste momento, foi uma pessoa que contribuiu bastante com ensinamentos e como exemplo de pesquisador.

À Dra. Vláudia Maria Assis Costa pela orientação nas padronizações e nas discussões, pelo incentivo, confiança e amizade.

Aos professores da imunologia do LIKA: José Valfrido Santana, Elizabeth Malagueño, Mônica Albuquerque, Valdênia Souza e Silvana Ferreira pela amizade, carinho, confiança e respeito nesses anos de caminhada.

À Dra. Eridan Coutinho pelo exemplo de profissional de Saúde, pelos ensinamentos e sugestões que ajudaram a enriquecer esse trabalho.

Aos técnicos Wladimir Gomes, Roni Evêncio e Luiz Carlos Figueiredo pelos ensinamentos e amizade.

Aos amigos da pós-graduação pelo carinho e amizade cultivados compartilhando frustrações e alegrias.

À Camila Melo pelo apoio nesse trabalho e pela amizade desenvolvida e cultivada nesses três anos de co-orientação.

Aos amigos do Departamento de Imunologia pelo carinho, incentivo e momentos de descontração.

A todos que fazem o Laboratório de Imunologia do LIKA pela amizade, incentivo, troca de experiências e momentos de descontração tornando esse trabalho mais prazeroso.

Aos que fazem o Biotério de Criação e Experimentação pela amizade, profissionalismo e cuidado com meus animais.

Às amigas Andréia Barros e Fabiana Letícia do Laboratório de Imunopatologia pela amizade e cumplicidade nos momentos difíceis e principalmente pelas comemorações quando os resultados saíam de acordo com o esperado.

Às amigas de longa data Marcilena e Juliane pelo carinho, disponibilidade, paciência e cumplicidade.

Enfim, obrigada a TODOS que, de alguma forma, contribuíram com a realização desse trabalho.

RESUMO

A esquistossomose está presente em 76 países, dentre eles o Brasil, atingindo 19 estados, estando Pernambuco entre os estados com maior número de casos. Em zonas endêmicas para o *Schistosoma mansoni*, observa-se, freqüentemente, uma sobreposição de subnutrição e infecção parasitária. Em estudos imunológicos em animais infectados pelo *S. mansoni*, ocorre um predomínio inicial da resposta Th1 que contribui para a formação do granuloma agudo, com a oviposição e sua deposição nos tecidos do hospedeiro. Essa resposta Th1 sofre uma substituição progressiva por uma resposta Th2. Diante disso, este trabalho teve como objetivo estudar a resposta imune celular em camundongos deficientes em iNOS, desnutridos e com infecção esquistossomótica aguda. Foram utilizados 200 animais subdivididos em C57BL/6 KO iNOS e C57BL/6 controles submetidos às dietas hipoprotéica ou controle e infectados com 30 cercárias de *S. mansoni* ou não infectados. A metodologia consistiu de análise da carga parasitária, da histopatologia e morfometria do fígado, cultura de células esplênicas para se obter os sobrenadantes e dosar as citocinas (IFN- γ , IL-4 e IL-10). Os resultados não revelaram diferenças quanto à recuperação dos vermes nos diferentes grupos. A análise histopatológica sugere que relacionado à variável deficiência em iNOS, esta atua inibindo a resposta inflamatória dos granulomas no início da infecção. Ainda em relação a variável deficiência de iNOS, no grupo KO EI, o único parâmetro morfométrico hepático mais elevado foi o volume dos granulomas em relação ao seu controle C57 EI, salientando que a ausência de óxido nítrico sugere um aumento da reação celular em torno dos ovos. O fator dieta não interfere na resposta inflamatória entre os animais deficientes em iNOS, em todos os tempos analisados. Em relação às citocinas de um modo geral, o fator deficiência em iNOS não aumentou a resposta Th2 (IL-4 e IL-10), e por isso a resposta Th1 (IFN-g) permaneceu maior nos grupos com deficiência em iNOS. No entanto, quando a dieta hipoprotéica é associada a essa deficiência ocorre uma diminuição da resposta Th2, no início da infecção. Portanto, o fator dieta e a deficiência em iNOS não parecem atuar sinergicamente e em algumas etapas sugere efeitos conflitantes.

Palavras-chaves: **esquistossomose aguda, deficiência em iNOS, desnutrição, citocinas.**

ABSTRACT

The schistosomiasis is endemic in 76 developing countries. Among 19 affected states of Brasil, Pernambuco has the highest number of cases. In endemic areas, where the *Schistosoma mansoni* is present, a superposition of undernourishment and parasite infection is frequently noticed. In immunological studies it is known that after infection, mice display a predominant Th1 immune response which leads to an acute granuloma formation due to egg depositions in the host tissue. Afterwards, the Th1 immune response progressively changes to a Th2 immune response. The aim of this work was to study the cellular immune response in iNOS deficient mice (KO) which were undernourished and acutely infected with *S. mansoni*. Experiments were performed using 200 mice separated into the following groups: iNOS deficient and non-deficient (controls) mice. In addition, mice were subjected to a poor diet of protein or to a control balanced diet, and to infection with 30 *S. mansoni* cercariae, or some of them kept as controls (without infection). Our methodology analysis consisted of worm burden recovery, liver morphology, spleen cell cultures and detection of cytokines (IFN- γ , IL-4 and IL-10) in the supernatant. The results showed that the worm burden recovery was not different in all the groups ($p > 0.05$). The histopathology studies suggest that iNOS deficiency inhibit the inflammatory response around the *S. mansoni* eggs, at early infection time. Morphometric studies iNOS deficient, well nourished infected mice, presented a higher granuloma volume as compared with their controls, suggesting that NO deficiency led to an increase in the cellular reaction around the eggs. Concomitant malnutrition and iNOS deficiency seem not to interfere on the inflammatory response, at all infection time points studied. Production of cytokines was not influenced by the iNOS deficiency and Th2 response (IL-4 and IL-10) was not increased, suggesting that Th1 response (IFN- γ) is increased in the well nourished iNOS deficiency mice. However, when the low protein diet was associated with iNOS deficiency the Th2 response decreased in the early infection time. Therefore, it seems that these situations (iNOS deficiency and malnutrition) do not act synergistically and even suggest opposite responses in specific steps of the immunological reaction.

Key-words: acute schistosomiasis, iNOS deficiency, malnutrition, cytokines.

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Ciclo Biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	17
Figura 2	Produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas aos 45 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂	32
Figura 3	Produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas aos 60 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂ .	33
Figura 4	Produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas aos 90 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂	33
Figura 5	Análise comparativa entre os três tempos de infecção quanto à produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas nos três tempos de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂ .	34
Figura 6	Produção de IL-4 nos sobrenadantes de culturas aos 45 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 24 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂	35
Figura 7	Produção de IL-4 nos sobrenadantes de culturas aos 60 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 24 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂	36
Figura 8	Produção de IL-4 nos sobrenadantes de culturas aos 45 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 24 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂	37
Figura 9	Análise comparativa entre os três tempos de infecção quanto à produção de IL-4 nos sobrenadantes de culturas nos três tempos de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 24 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂ .	38
Figura 10	Produção de IL-10 nos sobrenadantes de culturas aos 45 dias de infecção estimuladas com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂ .	39
Figura 11	Produção de IL-10 nos sobrenadantes de culturas aos 60 dias de infecção estimuladas com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂ .	40

Figura 12	Produção de IL-10 nos sobrenadantes de culturas aos 90 dias de infecção estimuladas com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂ .	40
Figura 13	Análise comparativa entre os três tempos de infecção quanto à produção de IL-10 nos sobrenadantes de culturas nos três tempos de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 24 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO ₂ .	41
Figura 14	Fígado de camundongo C57 DI (normal e desnutrido) com 60 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Os granulomas periovulares exibem acentuada reação exsudativa, com presença de discreta quantidade de matriz extracelular. H.E 200x	43
Figura 15	Fígado de camundongo C57 EI (normal e eutrófico) com 60 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> observando-se aspecto histológico semelhante ao da Figura 3. H.E. 200x	43
Figura 16	Fígado de camundongo KO DI (deficiente em iNOS e desnutrido) aos 60 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> , exibindo focos de metamorfose gordurosa no parênquima e granulomas periovulares de dimensões reduzidas, com intensa reação exsudativa. H.E. 100x	43
Figura 17	Fígado de camundongo KO EI (deficiente em iNOS e eutrófico) aos 60 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Granulomas periovulares ainda de aspecto exsudativo na periferia, observando-se, porém, deposição de tecido colágeno. H.E. 100x	43
Figura 18	Fígado de camundongo KO DI (deficiente em iNOS e desnutrido) aos 90 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Os granulomas ainda se acham em fase exsudativa intensa, com discreta quantidade de matriz extracelular. H.E. 200x	44
Figura 19	Fígado de camundongo KO EI (deficiente em iNOS e eutrófico), aos 90 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Observa-se a presença de vários granulomas periovulares intensamente colagenizados. H.E. 100x	44
Figura 20	Contagem de vermes adultos após perfusão do sistema porta mesentérico, nos quatro grupos infectados (KO DI, KO EI, C57 DI e C57 EI).	51

LISTA DE TABELAS

		Pág.
Tabela 1	Composição Percentual das Dietas Utilizadas.	26
Tabela 2	Análise morfométrica dos animais KO submetidos à dieta controle e sacrificados nos dias 45, 60 e 90 após infecção.	45
Tabela 3	Análise morfométrica dos animais C57 submetidos à dieta controle e sacrificados nos dias 45, 60 e 90 após infecção.	46
Tabela 4	Análise morfométrica dos animais C57 submetidos à dieta hipoprotéica e sacrificados nos dias 45, 60 e 90 após infecção.	47
Tabela 5	Análise morfométrica comparativa entre os animais KO aos 60 dias de infecção submetidos às diferentes dietas.	48
Tabela 6	Análise morfométrica comparativa entre os animais C57 aos 60 dias de infecção submetidos às diferentes dietas.	49
Tabela 7	Análise morfométrica comparativa entre os animais KO e C57 submetidos à dieta controle aos 60 dias de infecção.	50
Tabela 8	Análise morfométrica comparativa entre os animais KO e C57 aos 90 dias de infecção, submetidos à dieta controle.	50

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

2A5	Anticorpo de captura anti-IL-10
ABTS	[(2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]
AN18	Anticorpo biotilado anti- IFN- γ
ANOVA	Análise de Variância
BH	Belo Horizonte / MG
BSA	Soro Albumina Bovina
BVD1D11	Anticorpo de captura anti-IL4
BVD624G2	Anticorpo biotilado anti-IL-4
CECAL	Centro de Criao de Animais de Laboratório
C57BL/6	Linhagem de camundongo estudada
C57 DI	Controle desnutrido e infectado
C57 DNI	Controle desnutrido não infectado
C57 EI	Controle eutrófico e infectado
C57 ENI	Controle eutrófico não infectado
CO ₂	Gás carbnico
ConA	Concanavalina A
DBR	Dieta Básica Regional
DP	Desvio padrão
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay"
EPM	Erro Padrão da Média
FIOCRUZ	Fundao Oswaldo Cruz
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrognio
IFN- γ	Interferon γ
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
Kg	quilograma
KO	Deficiente em iNOS

KO DI	Deficiente em iNOS desnutrido e infectado
KO DNI	Deficiente em iNOS desnutrido não infectado
KO EI	Deficiente em iNOS eutrófico e infectado
KO ENI	Deficiente em iNOS eutrófico não infectado
L-glutamina	aminoácido
M	Molar
μ^3	micras cúbicas
μ l	microlitro
μ M	micro Molar
mg	miligrama
ml	mililitro
n	Número da amostra
ng	nanograma
Nn	Densidade numérica dos granulomas
NaNO ₂	Nitrito de Sódio
NO	Óxido Nítrico
NOS-1	Óxido nítrico sintetase 1 ou neuronal
NOS-2 ou iNOS	Óxido nítrico sintetase 2 ou induzível
NOS-3	Óxido nítrico sintetase 3 ou endotelial
NUV	Nuvilab ou eutrófico
p	Coeficiente de Probabilidade
PBS	Tampão Salina Fosfato pH 7,2
PBST	Tampão Salina Fosfato com 0,05% de Tween 20
rIL-4	IL-4 Recombinante
rIFN- γ	Interferon γ Recombinante
rIL-10	IL-10 Recombinante
SEA	Antígeno Solúvel de Ovo de <i>Schistosoma mansoni</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
SXC1	Anticorpo biotilado anti-IL-10
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TNF- β	Fator de Necrose Tumoral β

V	Volume dos granulomas
Vv	Densidade de volume dos granulomas
x g	gravidade
XMG 1.2	Anticorpo de captura anti-IFN- γ

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	
1.1 Aspectos Epidemiológicos.....	15
1.2 O Agente Etiológico e seu Ciclo Biológico.....	16
1.3 Esquistossomose e Desnutrição.....	18
1.4 Imunopatologia da Esquistossomose Mansônica.....	19
1.5 Óxido Nítrico.....	22
2 JUSTIFICATIVA.....	24
3 OBJETIVOS	
3.1 Geral.....	25
3.2 Específicos.....	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	
4.1 Dietas.....	26
4.2 Animais.....	27
4.3 Infecção.....	27
4.4 Estudo dos Baços e Fígados dos Animais Infectados.....	28
4.4.1 Cultura de Células Esplênicas.....	28
4.4.2 Análise Histopatológica e Morfométrica do Fígado.....	28
4.5 Dosagem de Citocinas.....	29
4.6 Avaliação da Carga Parasitária.....	30
4.7 Análise Estatística.....	31
5 RESULTADOS	
5.1 Dosagem de Citocinas.....	32
5.1.1 Interferon γ	32
5.1.2 Interleucina 4.....	35
5.1.3 Interleucina 10.....	38
5.2 Análise Histopatológica e Morfométrica do Fígado.....	42
5.2.1 Estudo Histopatológico.....	42
5.2.2 Estudo Morfométrico do Fígado.....	44
5.2.2.1 Análise morfométrica dos animais KO e C57 submetidos à dieta controle e sacrificados nos dias 45, 60 e 90 após a infecção.....	44
5.2.2.2 Análise morfométrica dos animais KO e C57 submetidos à dieta hipoprotéica e sacrificados nos dias 45, 60 e 90 após a infecção.....	46

5.2.2.3 Análise morfométrica dos animais KO submetidos às diferentes dietas aos 45, 60 e 90 dias após infecção.....	47
5.2.2.4 Análise morfométrica dos animais C57 submetidos às diferentes dietas aos 45, 60 e 90 dias após infecção.....	48
5.2.2.5 Análise morfométrica comparativa entre os animais KO e C57 aos 45, 60 e 90 dias após infecção, submetidos à dieta controle.....	49
5.2.2.6 Análise morfométrica comparativa entre os animais KO e C57 aos 45, 60 e 90 dias após infecção, submetidos à dieta hipoprotéica.....	51
5.3 Avaliação da Carga Parasitária.....	51
6 DISCUSSÃO.....	52
6.1 Avaliação das Citocinas.....	53
6.2 Análise Histopatológica Hepática.....	56
6.3 Estudo Morfométrico do Fígado.....	56
6.4 Avaliação da Carga Parasitária.....	58
7 CONCLUSÕES.....	60
REFERÊNCIAS.....	62
ANEXO – Comissão de Ética.....	70
APÊNDICE – Artigo Publicado.....	72

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Epidemiológicos

A esquistossomose está presente em 76 países de três continentes: América, África e Ásia onde milhões de indivíduos estão expostos ao risco de infecção. Existem cinco espécies do gênero *Schistosoma* (*mansoni*, *haematobium*, *intercalatum*, *japonicum* e *mekongi*) que causam doença humana (REY, 2001). Além disso, é considerada a segunda doença parasitária de importância para a Saúde Pública, perdendo apenas para a malária (PARISE FILHO; SILVEIRA, 2001). A relevância da esquistossomose como problema de Saúde Pública diz respeito à sua cronicidade, ampla distribuição geográfica e impacto na economia, o que repercute na atividade produtiva da população infectada (RESENDES et al., 2005). Estima-se que haja cerca de 200 a 300 milhões de pessoas infectadas por todas as espécies de *Schistosoma*, estando cerca de 652 milhões sob risco de contrair a doença e, anualmente, 500.000 pacientes evoluam para o óbito (GIBBONS, 1992; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2000).

No Brasil, a esquistossomose foi introduzida no período colonial com o tráfico de escravos africanos trazidos para trabalhar no cultivo da cana-de-açúcar, no Nordeste. Dentre as espécies que aqui chegaram, a única que se estabeleceu em nosso continente foi a *Schistosoma mansoni* devido, provavelmente, à presença de espécies do molusco do gênero *Biomphalaria* (*glabrata*, *straminea* e *tenagophila*), que atua como hospedeiro intermediário dessa espécie e às condições climáticas e ambientais semelhantes às da região de origem (NEVES, 2005).

Atualmente, atinge cerca de 19 estados, expondo ao risco de contrair a doença aproximadamente 26 milhões de brasileiros, e acometendo cerca de 6,3 milhões de pessoas em 1997 (KATZ; PEIXOTO, 2000). No Nordeste, onde há a maioria dos casos, essa doença constitui um dos principais problemas de Saúde Pública, pelas variadas e graves manifestações clínicas que desencadeia (RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005).

Pernambuco é considerado o principal estado afetado, onde a doença é considerada historicamente endêmica na zona rural (COUTINHO et al., 1997), com uma área endêmica correspondente a 17,5% da área total do Estado, estimando-se que 62% da população esteja sob risco de infecção (FAVRE et al., 2001) e, segundo o DATASUS, foram confirmados, no estado, 32.043 casos da doença somente no ano de 2006 (BRASIL, 2007).

Contudo, a migração de trabalhadores rurais, aliada à ocupação gradual e modificação dos espaços urbanos, tem determinado a contínua expansão da esquistossomose, o estabelecimento de novos focos urbanos e de sucessivos relatos de casos agudos da doença (BARBOSA et al., 2001).

Segundo o censo demográfico de 2000, 60% da população de Pernambuco residia em área endêmica estando sob risco de infecção com focos numerosos em Itamaracá, Paulista e Porto de Galinhas (MELO, 2006)

1.2 O Agente Etiológico e seu Ciclo Biológico

A transmissão da esquistossomose ocorre quando um indivíduo infectado defeca às margens de um rio ou coleção aquática (Figura 1). Quando chove, as fezes contaminadas são arrastadas e, em condições adequadas de luminosidade (entre 10 e 16 h), temperatura em torno de 28 °C e oxigenação da água, os ovos presentes nas fezes eclodem liberando uma larva ciliada denominada miracídio. Essa larva nada ativamente sendo atraída por substâncias liberadas pelo molusco do gênero *Biomphalaria* que se constitui o seu hospedeiro intermediário (NEVES, 2005).

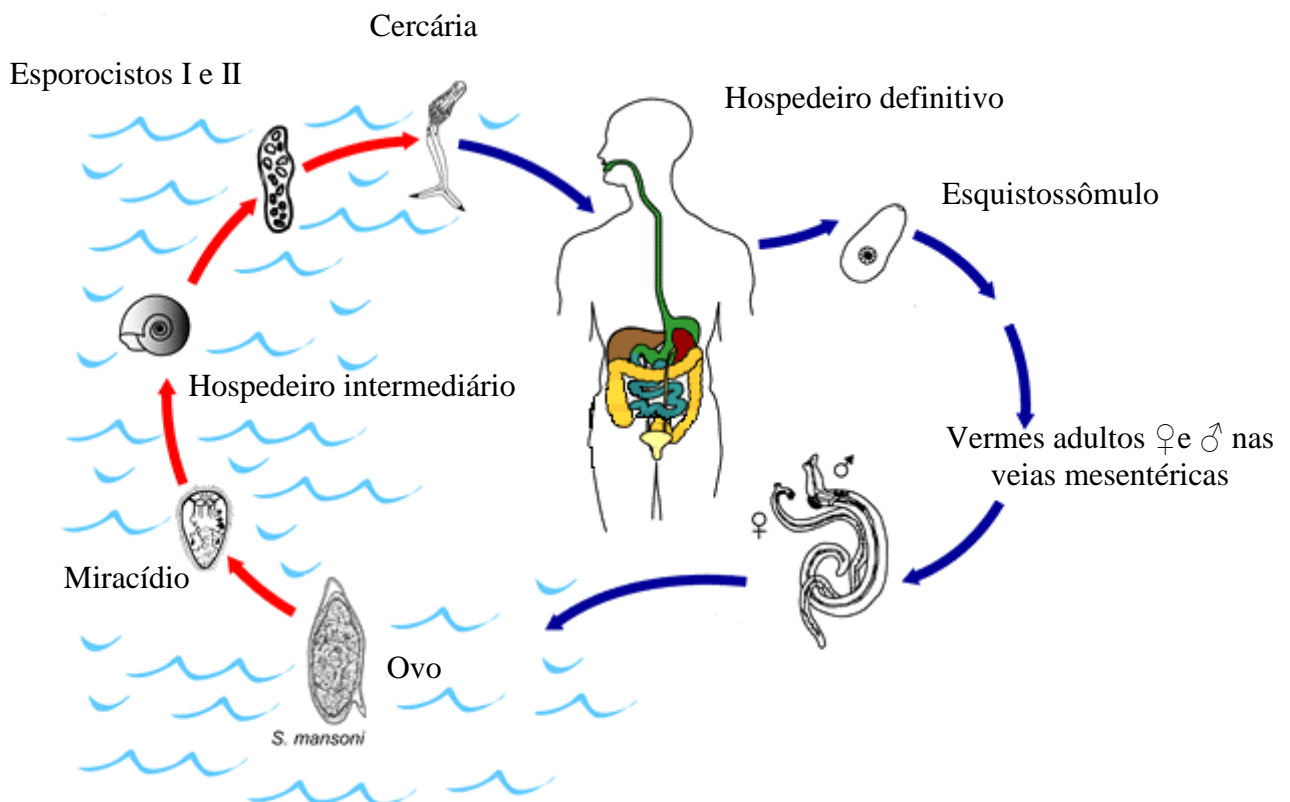
Ao encontrar seu hospedeiro, o miracídio movimenta-se intensamente, fazendo com que suas glândulas de penetração liberem enzimas proteolíticas, favorecendo sua penetração pela digestão dos tecidos principalmente na base das antenas e no pé do caramujo vetor. Em seguida, a larva perde o epitélio ciliado transformando-se em uma estrutura denominada esporocisto (REY, 2001).

Durante 72 horas, as células germinativas contidas no esporocisto primário sofrem intensa multiplicação e dobram de tamanho e, 14 dias após a infecção, dão origem ao esporocisto secundário. Esta geração de esporocistos migra ativamente através dos tecidos do molusco atingindo a glândula digestiva, onde existe riqueza de nutrientes e passam a sofrer modificações anatômicas passando a conter cercárias desenvolvidas ou em desenvolvimento (REY, 2001).

A espécie *Biomphalaria glabrata* pode eliminar, em média, 4.500 cercárias / dia e a *Biomphalaria straminea* em média 400 / dia favorecidas por estímulos externos como luminosidade e temperatura. Após eliminadas, as cercárias podem sobreviver por até 48 horas, contudo sua maior atividade e capacidade infectiva ocorre nas primeiras 8 horas. No ambiente aquático, as cercárias nadam ativamente podendo penetrar em várias espécies de animais, porém só se desenvolvem no hospedeiro apropriado. As cercárias penetram pela

pele e mucosas e, na pele do homem (hospedeiro definitivo), se fixam preferencialmente entre os folículos pilosos através de sua ventosa. Por ação lítica e mecânica, promovem a penetração do corpo cercariano e a perda da cauda, sendo denominada, a partir desse momento, esquistossômulos (NEVES, 2005).

Os esquistossômulos se adaptam às condições fisiológicas do meio, migram pelo tecido subcutâneo até chegar a um vaso e então são levados passivamente até os pulmões, via coração direito. A partir dos pulmões, os esquistossômulos se dirigem ao sistema porta intra-hepático, onde passam a se alimentar e transformam-se em vermes adultos machos e fêmeas cerca de 30 dias após a penetração (REY, 2001). Estes se acasalam e seguem juntos para o território da veia mesentérica inferior, onde farão a oviposição. Contudo, apenas cerca de 30% dos ovos chegarão ao ambiente externo dando continuidade ao ciclo. O restante ficará retido na mucosa intestinal ou será arrastado, pela circulação, para o fígado, dando origem ao quadro mais característico da esquistossomose: a reação inflamatória granulomatosa hepática (REY, 2001).



Fonte: Centro de Controle de Doenças e Prevenção – Esquistossomose

Figura 1. Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*

Para que a doença não se desenvolva, é necessário que seja mantido um ótimo equilíbrio da reatividade imune, que será adquirido com uma máxima resistência e mínima morbidade. O equilíbrio entre a patologia e a resistência é determinado por vários fatores: carga parasitária, idade, estado imunológico do hospedeiro e estado nutricional (ABATH et al., 2006).

1.3 Esquistossomose e Desnutrição

A importância de um adequado estado nutricional para a saúde do hospedeiro é conhecida, uma vez que o Projeto de Controle de Doenças Prioritárias nos Países em Desenvolvimento estima que 32% do número global de doenças em geral poderiam ser evitadas pelo controle da má nutrição (MASON; MUSGROVE; HABICHT, 2003). Em zonas endêmicas para o *S. mansoni*, observa-se, freqüentemente, uma sobreposição de subnutrição e infecção parasitária. A subnutrição pode levar a uma redução da capacidade de defesa e resposta imunológica do hospedeiro, podendo ser necessário, primeiramente, combater a subnutrição e depois a doença propriamente dita uma vez que a esquistossomose pode agravar o estado de má-nutrição já existente (COUTINHO et al., 2003, 2004).

Entretanto, resultados incompletos e algumas vezes conflitantes, têm sido mostrados na literatura, sobre o papel do estado nutricional do hospedeiro como um provável co-fator na patogênese das formas clínicas avançadas da esquistossomose (COUTINHO, 2004).

Sabe-se, com base em dados parasitológicos, histopatológicos, bioquímicos e morfométricos, que somente 30 a 50 % dos camundongos subnutridos desenvolvem a fibrose periportal (ANDRADE; CHEEVER, 1993; COUTINHO et al., 1997).

Como a deficiência protéica é considerada uma condição imunossupressora (MEIRA, 1995), a desnutrição pode estar relacionada com a inibição do desenvolvimento da fibrose de Symmers, provavelmente pela depressão da resposta imunopatológica, refletida no tamanho e na composição do granuloma periportal hepático.

Estudos desenvolvidos por Coutinho et al. (1979, 1992a) e outros autores, resultaram em uma Dieta Básica Regional (DBR) baseada no consumo alimentar das populações atingidas em diferentes áreas endêmicas de Pernambuco, a qual, quando administrada a camundongos, era capaz de induzir uma desnutrição protéico-energética (COUTINHO et al., 1992b; OLIVEIRA et al., 2004).

Apesar da fibrose de Symmers humana não se reproduzir exatamente, o modelo experimental do camundongo é considerado adequado para se investigar aspectos ainda obscuros relacionados à patogênese hepática (COUTINHO et al., 1992b) humana.

1.4 Imunopatologia da Esquistossomose Mansônica

A utilização de animais na infecção pelo *Schistosoma mansoni* possibilitou a realização de estudos buscando o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da fibrose hepática humana (OLIVEIRA et al., 2004). O modelo experimental adequado para o desenvolvimento da esquistossomose deve ser de baixo custo, fácil criação e manutenção em laboratório, ser suscetível à infecção e desenvolver um quadro patológico característico e similar ao humano. Dentre vários modelos, o murino é considerado o mais adequado por apresentar características anatomopatológicas da doença, como: presença de granulomas isolados, distribuídos no parênquima hepático e outras vezes acúmulo e fusão de granulomas ao longo das áreas periportais, com formação de fibrose semelhante àquela observada por Symmers em humanos (ANDRADE; CHEEVER, 1993).

A desintegração dos ovos, a excreção de seus produtos e os antígenos liberados pelos vermes adultos, estimulam o sistema imune do hospedeiro definitivo (PESSOA; MARTINS, 1988) e essa interação entre os produtos estranhos do parasita e o sistema imune do hospedeiro pode resultar em imunopatologia ou em proteção imune (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996) dependendo do tipo e intensidade da resposta imune.

Apesar dos granulomas serem por si só patogênicos, eles também protegem o hospedeiro, seqüestrando moléculas hepatotóxicas liberadas pelo ovo e prevenindo o dano hepático, assunto que vem sendo estudado em muitos camundongos imunodeficientes (PATTON et al., 2001).

A diferença entre as respostas Th1 e Th2, foi primeiro demonstrada em camundongos. A resposta Th1 produz um perfil de citocinas (IL-2, IFN- γ , TNF- β) que induzem um processo inflamatório e ativam principalmente macrófagos, enquanto a resposta Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) ativa principalmente as células B e as respostas imunes que dependem de anticorpos (MOSMANN; COFFMAN, 1989). Por sua vez, estas respostas se regulam de maneira recíproca, pois as citocinas Th2, como IL-4, inibem a produção de citocinas do tipo Th1 da mesma forma que as do tipo Th1 (IFN- γ) inibem a produção de citocinas Th2. O aparecimento dessas respostas imunes Th1 e Th2, favoreceu a

classificação de vários tipos de doenças infecto-parasitárias, de acordo com a liberação de citocinas predominantes (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996).

Após o primeiro contato do hospedeiro definitivo com o *Schistosoma mansoni*, desenvolve-se uma resposta imunológica ineficiente contra o parasita e, desta forma, o mesmo pode persistir por muitos anos (STADECKER, 1999). O tipo de imunidade encontrada em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* apresenta variações nos perfis Th1/Th2, com a evolução da doença (HOFFMANN; WYNN; DUNNE, 2002).

As respostas imunes Th2 são induzidas para controlar a patogenicidade das infecções por helmintos e dependem de mecanismos regulatórios apropriados do hospedeiro, para limitar sua potencial natureza destrutiva (HOFFMANN; WYNN; DUNNE, 2002).

Em 2000, Hoffmann et al. ao estudarem animais deficientes em IL-10 após vinte semanas de infecção, observaram que a morbidade e a mortalidade na esquistossomose murina crônica estavam associadas diretamente com o desenvolvimento de uma resposta Th2 por induzir a formação de lesões fibróticas nos tecidos do hospedeiro. Por outro lado, Stadecker (1999) e Fallon (2000) analisaram a esquistossomose murina, e diferentemente concluíram que as respostas Th2 são protetoras, agindo como mediadores anti-inflamatórios e as Th1 estariam relacionadas com a formação do granuloma. Parte dessa divergência se deve ao fato de que, embora a formação do granuloma e a fibrose periportal sejam características da patologia esquistossomótica crônica, são fenômenos regidos por diferentes mecanismos. Além disso, Hoffmann, Cheever e Wynn (2000) destacaram que a resposta Th1 pode estar elevada nas fases finais da doença humana possivelmente para corrigir os danos causados durante anos da exposição a citocinas Th2 indutoras de colágeno. Por sua vez, a polarização Th1 na fase aguda da esquistossomose murina, induz a imunopatologia letal devido a ausência de granulomas bem formados e exposição a hepatotoxinas derivadas do ovo do parasita.

A patologia observada na infecção pelo *Schistosoma mansoni* está, portanto, intimamente relacionada à resposta imune a antígenos parasitários. As formas clínicas são subdivididas em aguda e crônica sendo bastante distintas do ponto de vista clínico e imunopatológico (CARVALHO; ANDRADE, 2005).

A imunopatogênese da esquistossomose está principalmente relacionada com a passagem de esquistossômulos no pulmão, liberação de antígenos de vermes adultos, oviposição, passagem de ovos pelo intestino, aprisionamento dos mesmos no fígado e liberação de antígenos de ovos. Os sintomas da fase aguda surgem de duas a oito semanas após a primeira exposição ao parasita. A fase aguda pode ser assintomática nas áreas

endêmicas da doença, mas tem se constituído num importante e freqüente problema em indivíduos não imunes, residentes em regiões urbanas, que são expostos pela primeira vez à infecção em áreas endêmicas (CARVALHO; ANDRADE, 2005).

O achado imunológico mais marcante nas fases iniciais da forma aguda é uma forte resposta inflamatória relacionada com a resposta imune inata e caracterizada por uma produção elevada de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α (COURA, 2005). Níveis elevados destas citocinas indicam que macrófagos de pacientes com a forma aguda da esquistossomose se encontram ativados e são, em grande parte, os responsáveis pela produção aumentada dessas citocinas. O TNF- α elevado resulta em perda de peso (RIBEIRO DE JESUS et al., 2002).

A resposta imune adaptativa se caracteriza principalmente por uma produção aumentada de citocinas com o padrão Th1, como IFN- γ e IL-2 e menor produção de IL-4 e IL-5 (RIBEIRO DE JESUS et al., 2002). Diferentemente, o perfil observado na fase crônica da esquistossomose é caracterizado por uma baixa produção de IFN- γ e produção aumentada de citocinas com padrão Th2, como IL-4 IL-5, IL-10 e IL-13 (RIBEIRO DE JESUS et al., 2000).

Em camundongos, nas fases iniciais há um predomínio da resposta Th1 que contribui para a formação do granuloma agudo. Com a oviposição e sua deposição nos tecidos do hospedeiro (ANDRADE; AZEVEDO; 1987; PEARCE et al., 1991), a resposta Th1 normalmente sofre uma substituição progressiva por uma resposta Th2 (GRZYCH et al., 1991) com produção de citocinas que são mediadores anti-inflamatórios: IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (PEARCE et al., 1991; RAMASWAMY et al., 1997). Desta forma, parece que a formação do granuloma inicia-se durante o período Th1 e continua durante a emergência de citocinas Th2 (STADECKER, 1999). Os granulomas periovulares que se formam, à medida que a doença evolui da fase aguda para a fase crônica, decrescem em tamanho e em celularidade, devido à imunomodulação, apesar de haver progressão da fibrose hepática (WYNN et al., 1998).

O granuloma periovular, principal característica da patologia da esquistossomose, é constituído por eosinófilos, linfócitos T, mastócitos, linfócitos B, macrófagos, células gigantes e alguns neutrófilos em torno do ovo maduro depositado nos tecidos do hospedeiro, sendo sua estrutura influenciada por anticorpos, quimiocinas, moléculas de adesão e apoptose. Contudo, devido à constante modificação das populações celulares, o granuloma sofre mudanças em seu tamanho e composição durante a infecção (HOFFMANN; WYNN;

DUNNE, 2002). Seu crescimento atinge um tamanho máximo em torno da oitava semana pós-infecção e o volume passa a ser controlado imunologicamente (imunomodulação) em torno da décima segunda a décima sexta semanas pós-infecção (JANKOVIC et al., 1998).

O componente que atua como corpo estranho é a casca quitinosa do ovo, mas os elementos mais complexos surgem da interação entre as secreções do miracídio, que são eliminadas através dos microporos da casca e estado imunológico do hospedeiro. As secreções ovulares são potentes estimuladoras da produção de IL-10 tanto pelos linfócitos Th1 como Th2 (SORNASSE et al., 1996) juntamente com IL-4 e IL-5. Mas, na fase crônica, quando os granulomas aparecem bem modulados, a inversão para uma reação tipo Th1 não se delinea nitidamente, pois a produção de IFN- γ é sempre muito baixa. A modulação imunológica do granuloma periovular é bastante curiosa uma vez que é bem evidente nos granulomas hepáticos, menos evidente nos granulomas intestinais e não é observada nos granulomas pulmonares (SILVA et al., 2000), sugerindo uma compartimentalização da resposta imunológica.

A formação dos granulomas em torno do ovo e sua composição com alta densidade de células tem mostrado que a sua presença protege o hospedeiro contra os efeitos hepatotóxicos dos antígenos. Se o hospedeiro falha em desenvolver, durante a infecção, o granuloma maduro circunscrito, tal como ocorre em situações de polarização Th1, os antígenos hepáticos de ovo podem ser arrastados para o parênquima e induzir extenso dano hepático (HOFFMANN; WYNN; DUNNE, 2002).

Sendo assim, torna-se de grande importância o estudo da mudança de padrão de resposta na evolução da esquistossomose murina, a fim de melhor compreender a imunopatologia da esquistossomose humana.

1.5 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO) foi descoberto inicialmente como um fator liberado pelas células endoteliais, causando vasodilatação ao relaxar o músculo liso vascular (ROBBINS, 2000) e foi caracterizado como um radical livre lipofílico secretado endogenamente como um bioproduto da conversão da arginina e oxigênio em citrulina, em uma reação enzimática mediada pela óxido nítrico sintetase (NOS) (HIBBS et al., 1987; MICHEL; FERON, 1997). Existem três isoformas de NOS envolvidas na produção do NO (nNOS ou NOS-1, iNOS ou NOS-2 e eNOS ou NOS-3), contudo a forma que merece maior destaque é a NOS-2 ou iNOS, que é a forma induzível produtora de altos níveis de óxido nítrico quando os

macrófagos são ativados por citocinas (TNF- α e IFN- γ) ou outros agentes (ROBBINS, 2000).

Na esquistossomose, a inibição da iNOS está associada com dano hepatocelular exacerbado e aumento da fibrose, com apoptose de hepatócitos (BRUNET et al., 1999).

O NO desempenha importante papel na função vascular durante as respostas inflamatórias, reduzindo a agregação e aderência plaquetárias, inibindo características da inflamação induzidas por mastócitos e servindo como regulador do recrutamento de leucócitos. Também atua na resposta do indivíduo a infecções apresentando atividade antimicrobiana e aumentando sua produção durante a defesa do hospedeiro e a inativação genética da iNOS aumenta a replicação microbiana em animais de laboratório. Níveis altos de produção de NO parecem limitar a replicação de helmintos, bactérias, protozoários e vírus (bem como células tumorais), sob risco de lesão inflamatória intensa das células e tecidos do hospedeiro (ROBBINS, 2000). Na esquistossomose, o NO é importante para o hospedeiro não somente devido às suas características antimicrobianas, mas também servindo como um potente mediador inflamatório e antifibrótico (HESSE et al., 2001).

Durante a infecção pelo *Schistosoma mansoni*, a produção de NO aumenta no fígado após a oviposição. Com a indução da resposta Th2 pelos ovos do parasita, a resposta Th1 é inibida e ocorre regulação da produção excessiva de NO e, conseqüentemente, de seus efeitos como mediador inflamatório (BRUNET et al., 1999). Além disso, Patton e cols. (2002) observaram que camundongos C57BL/6 infectados desenvolveram uma resposta de perfil Th2 e uma doença hepática crônica, enquanto os camundongos deficientes em IL-4 desenvolveram uma resposta de perfil Th1 com altos níveis de NO e de IFN- γ e uma síndrome aguda letal, decorrentes da ausência da resposta Th2 e de granulomas bem estruturados. Isto mostra a importância da IL-4 no controle da produção de NO, formação de granuloma e sobrevivência do camundongo na fase aguda da infecção. Contudo, o papel preciso do NO não está completamente esclarecido na infecção esquistossomótica, demandando investigações adicionais.

2 JUSTIFICATIVA

Freqüentemente as áreas de desnutrição humana coexistem com regiões endêmicas para esquistossomose. Portanto, é relevante estudar a interação entre desnutrição e esquistossomose, juntamente com os mecanismos imunopatológicos subjacentes.

Além disso, uma das estratégias para investigar a função de determinados componentes biológicos é utilizar camundongos deficientes nesses elementos. Assim, a presente proposta avalia os camundongos desnutridos e deficientes em iNOS (óxido nítrico sintetase induzível) para analisar essa associação e seu papel na formação dos granulomas esquistossomóticos, na fase aguda da infecção.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Estudar a resposta imune celular em camundongos deficientes em iNOS, desnutridos e com infecção esquistossomótica aguda.

3.2 Específicos

- Analisar a produção de citocinas (IL-4, IL-10 e IFN- γ);
- Avaliar os granulomas através da histopatologia hepática;
- Estudar aspectos morfométricos do granuloma hepático;
- Determinar a carga parasitária através da contagem de vermes no sistema portal mesentérico.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Dietas

A desnutrição foi induzida nos grupos indicados abaixo (4.2.1 e 4.2.2) pela administração da dieta básica regional (DBR), que se caracteriza por ser uma dieta multideficiente, essencialmente hipoprotéica contendo aproximadamente 7,87% de proteína (Tabela 1), baseada no padrão dietético de populações humanas de áreas endêmicas de esquistossomose do nordeste do Brasil (COUTINHO; FREITAS; ABATH, 1992).

A dieta controle utilizada para alimentação dos animais eutróficos, foi fornecida a dieta comercial NUVILAB (Nuvital Nutrients LTDA., Colombo, Paraná, Brasil), contendo 22% de proteína (Tabela 1). Foram oferecidas dieta e água “ad libitum”.

O estado nutricional foi devidamente avaliado através das curvas ponderais (registro semanal do peso corporal) além da observação do aspecto dos pêlos, postura e motilidade.

Tabela 1. Composição Percentual das Dietas Utilizadas (*).

COMPONENTE	g%	PROTEÍNAS %	CARBOHIDRATOS %	GORDURA %	MINERAIS %	FIBRAS %
DBR:						
Feijão Mulatinho (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	18,44	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09
Farinha de Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	65,05	0,84	48,59	0,12	0,43	0,64
Charque	3,75	2,74	0,43	0,06	0,06	-
Batata doce (roxa) (<i>Iponaea batatas</i>)	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48
TOTAL	100,00	7,87	69,67	0,80 (**)	1,26	7,21
NUVILAB CR-1						
(Nuvital Nutrientes Ltda)	100,00	22,00			10,0	8,0

(*) A tabela foi baseada em Coutinho et al, (1992,1997). (**) Gordura da carne e gordura da manta

4.2 Animais

Camundongos machos C57BL/6 recém – desmamados (21 dias), normais (C57) ou deficientes em iNOS (KO), pesando entre 11 e 15 g, foram obtidos do CECAL (Centro de Criação de Animais de Laboratório / FIOCRUZ / Rio de Janeiro) e mantidos em gaiolas individuais, em condições padronizadas de temperatura e luminosidade (Certificado da Comissão de Ética em Anexo – protocolo P0201/03).

Foi realizado estudo experimental do tipo caso-controle comparando animais deficientes em iNOS e controles, desnutridos e eutróficos, expostos ou não a infecção pelo *Schistosoma mansoni*, sendo os animais divididos em:

Grupos experimentais – Foram constituídos de camundongos KO (n = 100), subdivididos em: desnutridos infectados (KO DI; n = 25) e desnutridos não infectados (KO DNI; n = 25); eutróficos infectados (KO EI; n = 25) e eutróficos não infectados (KO ENI; n = 25).

Grupo normal – Foi formado por camundongos C57 (n = 100) e subdividido em desnutridos infectados (C57 DI; n = 25) e desnutridos não infectado (C57 DNI; n = 25); eutróficos infectados (C57 EI; n = 25) e eutróficos não infectados (C57 ENI; n = 25).

O esquema abaixo detalha melhor a formação dos grupos.



De cada grupo de 25 animais, 10 foram utilizados para avaliação da carga parasitária e 15 para avaliação dos fígados e cultura de células, a cada tempo de infecção (45, 60 e 90 dias).

4.3 Infecção

Realizou-se após 30 dias do início das dietas nos grupos a serem infectados. Para obtenção de cercárias, caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* infectados com *Schistosoma mansoni* da cepa BH (Belo Horizonte) foram expostos à luz por cerca de 40 minutos para eliminação de cercárias. Após este tempo, aproximadamente 30 cercárias foram distribuídas para cada animal, juntamente com um volume de água de 10 ml. Os animais

foram mantidos em contato com essa suspensão por 1 hora e então removidos para suas respectivas gaiolas.

4.4 Estudo dos Baços e Fígados dos animais infectados

Após o sacrifício dos animais aos 45, 60 e 90 dias pós-infecção, com um $n = 5$ de animais por grupo, os fígados e os baços foram removidos e processados de acordo com os itens 4.5.1 e 4.5.2.

4.4.1 Cultura de Células Esplênicas – As suspensões de células esplênicas foram obtidas por maceração dos baços em meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo/Brasil) acrescido de antibióticos (1 % de Penicilina e 1 % de Estreptomicina) e aminoácido (1% de L-glutamina) e centrifugadas por 5 minutos a $300 \times g$, a 4°C . As hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado por 18 segundos. As células foram então ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10 % de SBF (soro bovino fetal; WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro/Brasil), e a viabilidade observada pelo emprego de Trypan Blue a 10%. As suspensões celulares foram distribuídas em placas de cultura de 48 poços, em duplicata, na concentração de 5×10^6 células/ml e submetidas a diferentes tratamentos: MEIO (sem estímulo), SEA (antígeno solúvel de ovo) na concentração de $20 \mu\text{g/ml}$ e Con A (Concanavalina A) na concentração de $5 \mu\text{g/ml}$ e cultivadas por 24 e 48 horas a 37°C a 5% de CO_2 para obtenção de sobrenadante e posterior dosagem de citocinas e óxido nítrico.

4.4.2 Análise Histopatológica e Morfométrica do Fígado – Os fígados foram fixados em Bouin (75 ml de solução saturada de ácido pícrico, 25 ml de formaldeído e 5 ml de ácido acético glacial) por um período de 8 h. A partir desse momento, foram realizadas lavagens diárias com etanol a 70% para a completa remoção do fixador. Em seguida, os exemplares foram desidratados em concentrações crescentes de etanol a partir de 70% até álcool absoluto. Após esta fase, o material foi clareado em xilol e impregnado em parafina fundida a 60°C . Posteriormente, foi cortado em micrótomo rotativo com $5 \mu\text{m}$ de espessura, usando-se duas amostras escolhidas randomicamente de cada exemplar, submetidos a coloração pelo Picrosirius vermelho e Hematoxilina-Eosina.

Realizou-se a morfometria semi-automática através do sistema de análise de imagem LEICA QWIN PLUS (v.2,8) acoplado a uma câmera digital JVC TK 1380, sendo avaliados em 5 campos aleatórios de cada lâmina, o percentual de tecido fibroso, o volume dos granulomas, a densidade de volume e a densidade numérica dos granulomas.

Volume dos granulomas (V) – Foram medidos os diâmetros de todos os granulomas centralizados por ovos. A partir dos diâmetros, foram obtidos os valores dos seus respectivos raios (R). Considerando que os granulomas assumem forma esférica, foram calculados os volumes destes a partir do cálculo do volume da esfera utilizando-se, para isso, os raios dos granulomas mensurados. A unidade de medida utilizada foi μ^3 .

Densidade de volume dos granulomas (Vv) – É o volume total ocupado pelas estruturas ou granulomas no compartimento considerado. É o somatório dos volumes dos granulomas dividido pelo volume do compartimento estudado. É o resultado da divisão do somatório dos volumes de cada granuloma nos 5 campos microscópicos estudados, pelo somatório dos volumes totais de cada compartimento estudado.

Densidade numérica dos granulomas (Nn) – O número total de granulomas analisados em conjunto com o valor da densidade de volume, na fórmula de Weibel (1963). O resultado é expresso em Nn/mm^{-4} ou $1/mm^{-4}$

Percentual de tecido fibroso (%) – O programa de morfometria computadorizado foi capaz de marcar o tecido fibroso diferenciado pela coloração com picro-sirius vermelho, e, em seguida, quantificou o percentual de tecido selecionado. Ao final, os percentuais dos cinco campos foram somados.

4.5 Dosagem de Citocinas

As placas para realização do ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) (2595, Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com anticorpos de captura [anti-INF γ (XMG 1.2, a 2 $\mu g/ml$), anti-IL4 (BVD1D11 a 1 $\mu g/ml$), anti-IL10 (2A5, a 4 $\mu g/ml$)], diluídos em PBS (Tampão Salina Fosfato 0,01M pH 7,2) sendo distribuídos 50 μl em cada poço da placa e incubadas à temperatura de 4°C por 18 h. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 80 μl de uma solução de PBST (Tampão salina fosfato com 0,05% de Tween 20) e 10 % de SBF (WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro/Brasil) por 30 minutos.

Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBST e, em seguida, adicionados 50 μl dos respectivos padrões recombinantes de camundongos: rIFN- γ , rIL-10 e rIL-4 diluídos nas concentrações indicadas pelo fabricante ou amostras dos sobrenadantes em duplicata de cada poço da cultura de células. Os padrões foram distribuídos no volume de 100 μl nos primeiros poços nas concentrações iniciais de 20 ng/ml para rIFN- γ , de 10 ng/ml para rIL-10 e de 10 ng/ml para rIL-4 e feitas diluições seriadas até as concentrações de 0.625

ng/ml, 0,3125 ng/ml e 0,3125 ng/ml, respectivamente para cada citocina com PBS contendo BSA 0,1 % (Soro Albumina Bovina; SIGMA Chemical, St. Louis, Mo., USA) e as amostras foram distribuídas sem diluição. As placas foram então incubadas a 4°C por 18 horas. Após esta incubação, as placas foram lavadas com PBST e 50 µl dos segundos anticorpos biotinizados [anti-INF γ (AN18, a 1 µg/ml), anti-IL4 (BVD624G2, a 1 µg/ml), anti-IL10 (SXC1, a 2 µg/ml)] (gentilmente cedidos pelo laboratório de Imunologia da Universidade de São Paulo), diluídos com PBST e 0,1 % de BSA, foram adicionados seguido de incubação à temperatura ambiente por 1 hora. Após esta incubação, cada placa foi novamente lavada três vezes com PBST e o conjugado enzimático diluído 1:6000 (estreptoavidina marcada com peroxidase, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) em PBST contendo BSA 0,1 % foi adicionado às placas, 80 µl/poço, e estas incubadas à temperatura ambiente por uma hora. As placas foram lavadas novamente com PBST e a reação revelada pela adição do substrato contendo H₂O₂ e o cromógeno ABTS [(2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvidos em tampão citrato 0,1 M e fosfato de sódio 0,2 M pH = 5,5. A reação foi então bloqueada com 50 µl/poço ácido cítrico 0,2 M e a leitura realizada em leitor de ELISA (BIO RAD modelo 2550) em comprimento de onda de 405 nm.

As quantidades de citocinas nos sobrenadantes são calculadas a partir de curvas-padrão, obtidas com concentrações de 0,625 a 10 ng/ml de rINF- γ , 0,625 a 10 ng/ml de rIL-4 e 0,625 a 10 ng/ml de rIL-10. Os resultados foram apresentados como as médias aritméticas \pm desvio padrão (DP).

4.6 Avaliação da Carga Parasitária

Após 12 semanas de infecção, 10 animais de cada grupo foram sacrificados após sedação prévia com injeção intraperitoneal de Xilasina (10 mg / Kg de peso corporal) e Cetamina (115 mg / Kg de peso corporal) e foi realizada perfusão do sistema venoso portal com solução salina (cloreto de sódio a 0,85% e citrato de sódio 1,5%) para coleta e quantificação dos vermes adultos (DUVALL; DE WITT, 1967) machos e fêmeas.

4.7 Análise Estatística

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. Para análise comparativa das variáveis quantitativas foi aplicado o teste de Análise de Variância (ANOVA) e o teste t de Student para significância entre as médias. Para testar os contrastes, foi aplicado o teste de Levene a fim de verificar a suposição de homogeneidade das variâncias, assim, quando esta foi verificada utilizou-se o teste de Tukey e quando não o teste de Tamhane. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Para as análises, foi utilizado o software SPSS 8.0. (SPSS Brasil, São Paulo, Brasil).

5 RESULTADOS

5.1 Dosagem de Citocinas

5.3.1 Interferon γ

Análise intra-grupos da produção de Interferon γ

Aos 45 dias de infecção, não foi observada a produção desta citocina no grupo KO DI (Figura 2) sendo observada maior produção, neste tempo de infecção, pelo grupo KO EI.

Houve diferenças estatísticas quando comparados os grupos KO DI x KO EI e KO EI x C57 EI ($p < 0,001$). Não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos KO DI x C57 DI e C57 DI x C57 EI.

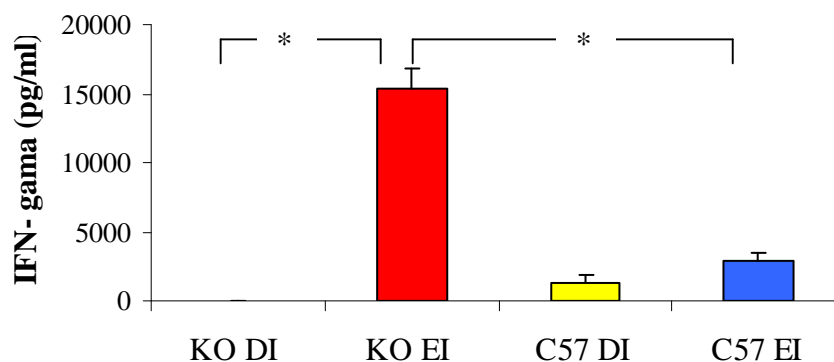


Figura 2 – Produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas aos 45 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle). * $p < 0,05$.

Aos 60 dias de infecção, houve uma diminuição dos níveis de IFN- γ exceto para o grupo KO DI. Em relação ao fator deficiência em iNOS, o grupo submetido à dieta hipoprotéica apresentou menores níveis desta citocina em relação ao seu controle KO EI. Contudo, quando os animais controles foram analisados, houve uma inversão na produção desta citocina com maiores níveis ($p < 0,001$) no grupo C57 DI (Figura 3).

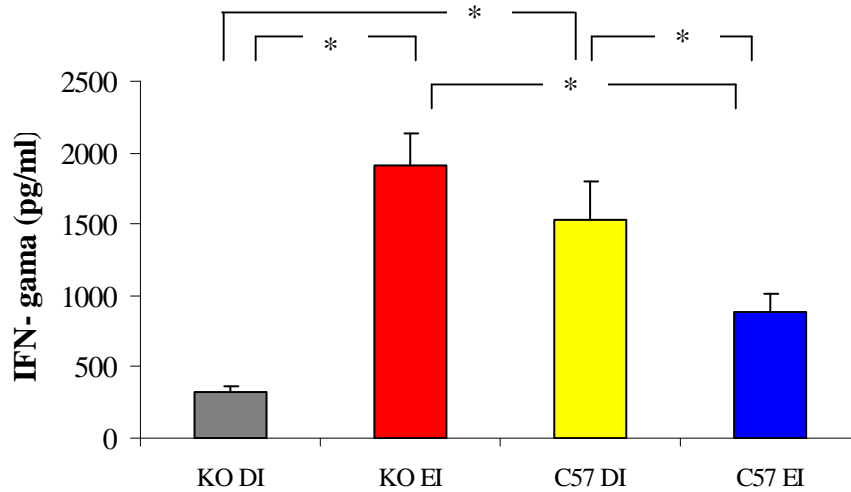


Figura 3 – Produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas aos 60 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle).

Já aos 90 dias de infecção, houve diferenças estatísticas com $p < 0,05$ entre os grupos KO submetidos às diferentes dietas. Contudo, não foram observadas diferenças significantes nos grupos controles submetidos às dietas diferentes. Ao se observar os grupos deficientes em iNOS, estes apresentaram maiores níveis de IFN- γ , que seus respectivos controles com diferenças significantes (Figura 4).

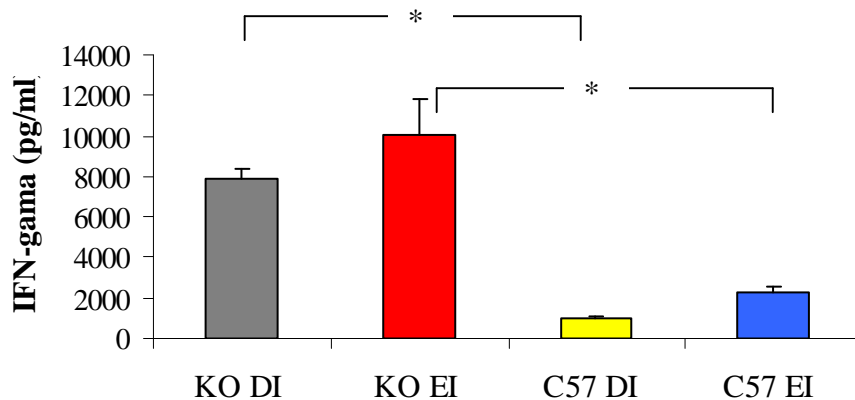


Figura 4 – Produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas aos 90 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle). * $p < 0,05$

Análise inter-grupos da produção de Interferon γ

Analisando os três tempos de infecção, pudemos observar que as maiores concentrações de IFN γ para o grupo KO EI ocorre aos 45 dias com níveis desta citocina em torno de 15000 pg/ml, decrescendo aos 60 dias para aproximadamente 2000 pg/ml, voltando a aumentar aos 90 dias com diferenças estatisticamente significantes. O grupo KO DI apresentou um retardo na produção desta citocina não sendo possível detectá-la aos 45 dias, começando a surgir aos 60 dias sem, contudo, apresentar diferenças significantes e com concentrações chegando aos 8000 pg/ml aos 90 dias apresentando diferenças significantes entre 45 e 90 dias, bem como entre 60 e 90 dias. Não houve diferenças significantes entre os tempos para os grupos controle quando estimulados com SEA (Figura 5).

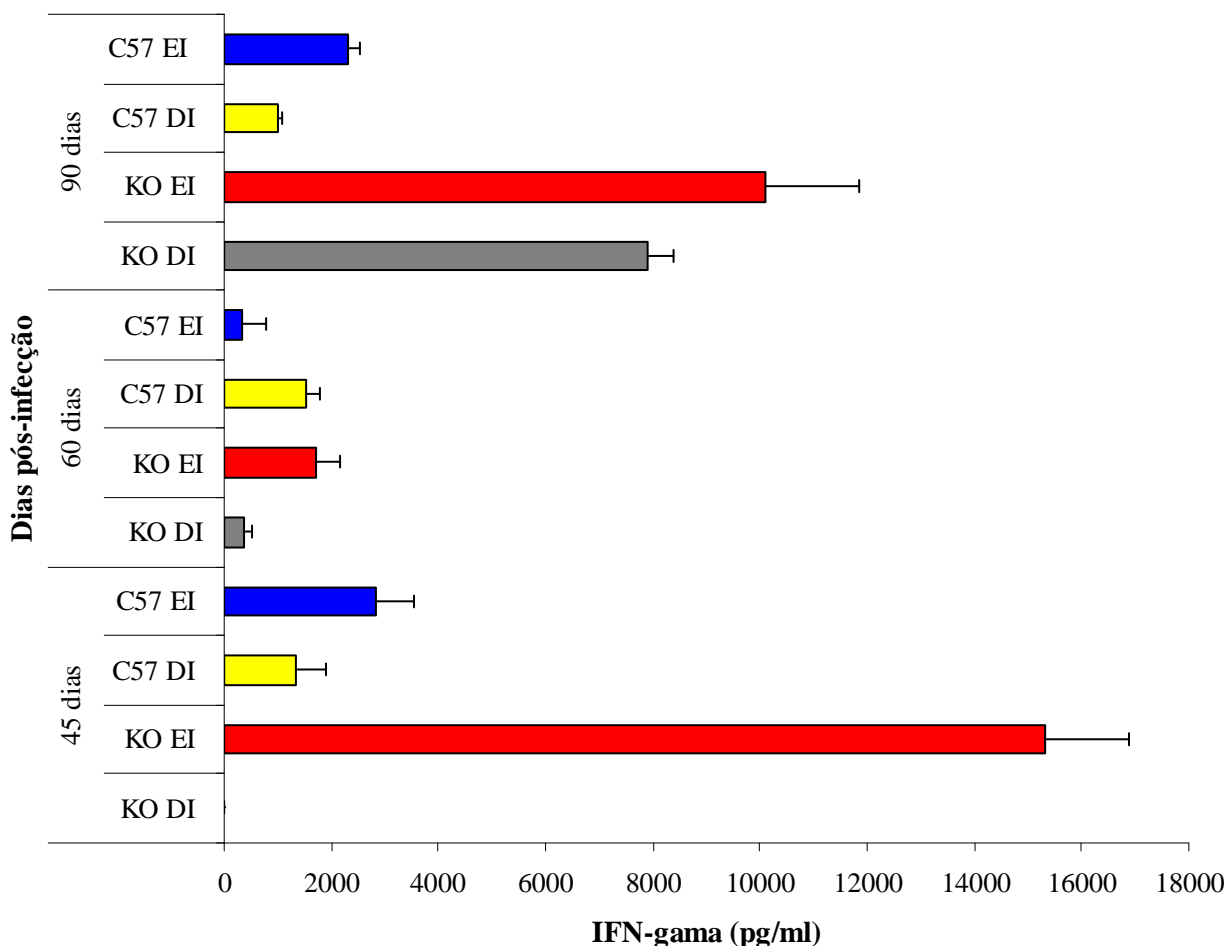


Figura 5 – Análise comparativa entre os três tempos de infecção quanto à produção de IFN- γ nos sobrenadantes de culturas nos três tempos de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle).

5.1.2 Interleucina 4

Análise intra-grupos da produção de IL-4

Aos 45 dias de infecção, foram observadas diferenças estatísticas significantes entre os animais KO submetidos às diferentes dietas com $p < 0,001$ com concentrações mais elevadas no grupo submetido à dieta controle.

Quando a dieta permaneceu constante e observamos os grupos deficientes e seus controles, houve maior produção de IL-4 pelo grupo controle com $p < 0,001$. Contudo, um fato interessante a ser observado, é a inversão da relação quando observamos os animais KO EI e os C57 EI, pois os maiores níveis de IL-4 são observados no primeiro grupo.

Ao se comparar os grupos controles, a dieta básica regional parece estimular a maior produção desta citocina em relação ao seu controle (Figura 6).

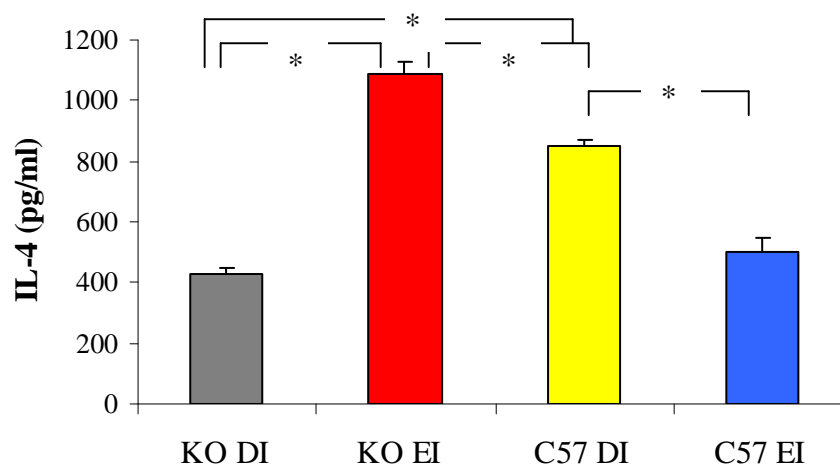


Figura 6 - Produção de IL-4 nos sobrenadantes de culturas aos 45 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 24 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle). * $p < 0,05$

Quando passou-se a analisar a produção desta citocina aos 60 dias de infecção (Figura 7), o grupo KO DI apresentou um aumento maior que seis vezes dessa produção, ao contrário do observado no seu controle KO EI ($p < 0,05$). Também foi observada maior concentração de IL-4 quando o KO DI foi comparado ao C57 DI ($p < 0,05$). Em relação à dieta controle, o

grupo KO EI apresentou menores concentrações de IL-4 em relação ao seu controle C57 EI ($p < 0,05$).

Houve diferença estatística quando foram comparados os grupos controles submetidos às diferentes dietas ($p < 0,05$).

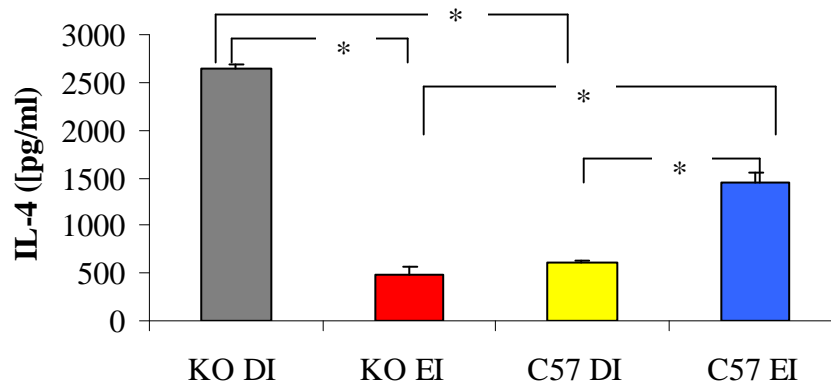


Figura 7 – Produção de IL-4 nos sobrenadantes de culturas aos 60 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 24 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle). * $p < 0,05$

Quando a produção de IL-4 foi analisada aos 90 dias, observou-se um decréscimo na produção desta citocina no grupo KO DI em relação ao KO EI, porém ainda sendo maiores as concentrações no grupo submetido à dieta hipoprotéica, em relação ao seu controle, bem como entre ele e o grupo controle desnutrido ($p < 0,001$). Contudo, neste tempo de infecção, o grupo KO EI volta a apresentar maiores concentrações desta citocina em relação ao grupo controle submetido à dieta controle. Há uma inversão na produção da IL-4 pelos grupos controles submetidos às dietas diferentes (Figura 8).

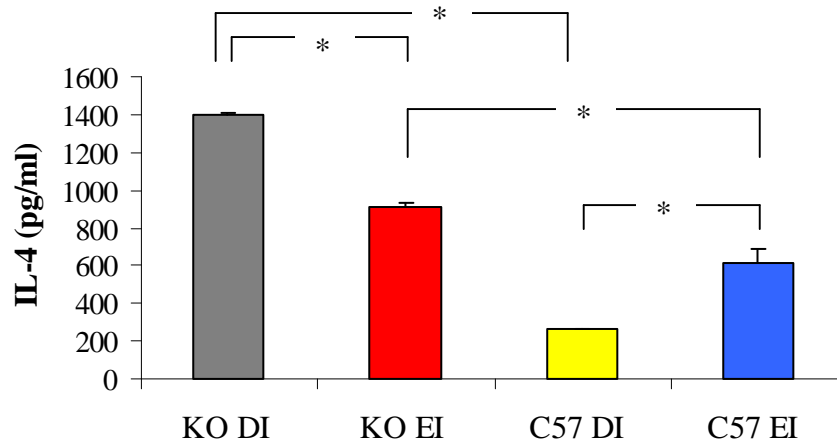


Figura 8 - Produção de IL-4 nos sobrenadantes de culturas aos 90 dias de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 24 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle). * p < 0,05

Análise inter-grupos da produção de IL-4

Quando observamos a cinética da produção de IL-4, foi possível notar que os níveis desta citocina são maiores aos 45 dias para os grupos KO EI e C57 DI, decrescendo aos 60 dias e sofrendo um pequeno aumento aos 90 dias com diferenças estatisticamente significantes.

As maiores concentrações de IL-4 para os grupos KO DI ocorreram aos 60 dias de infecção, sofrendo redução para quase a metade aos 90 dias com $p < 0,001$ quando comparados os três tempos. Já o grupo C57 EI, mesmo apresentando maiores concentrações aos 60 dias, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os tempos 45 e 90 pós-infecção (Figura 9).

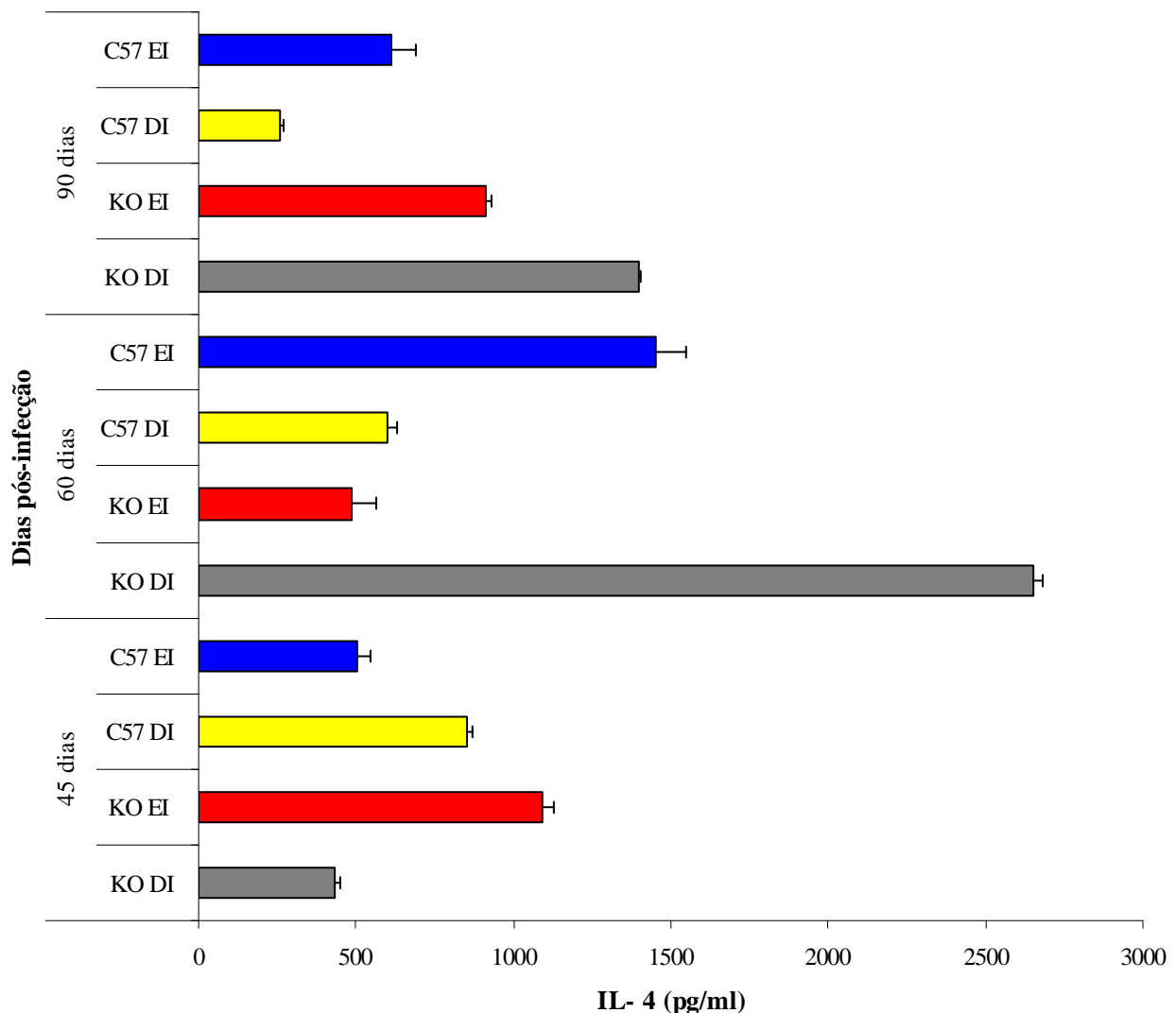


Figura 9 - Análise comparativa entre os três tempos de infecção quanto à produção de IL-4 nos sobrenadantes de culturas nos três tempos de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 24 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle).

5.1.3 Interleucina 10

Análise intra-grupos da produção de IL-10

Analisando a produção de IL-10 aos 45 dias de infecção, podemos observar que os grupos submetidos à dieta controle apresentam maiores concentrações desta citocina em relação aos respectivos grupos submetidos à dieta hipoprotéica ($p < 0,001$). Não houve diferenças estatísticas significantes entre os grupos deficientes em iNOS e seu controle quando submetidos à DBR. Contudo, quando observada a dieta controle, o grupo controle

apresentou maiores níveis de IL-10 com diferenças estatisticamente significantes. A dieta hipoprotéica parece inibir a produção desta citocina neste tempo de infecção (Figura 10).

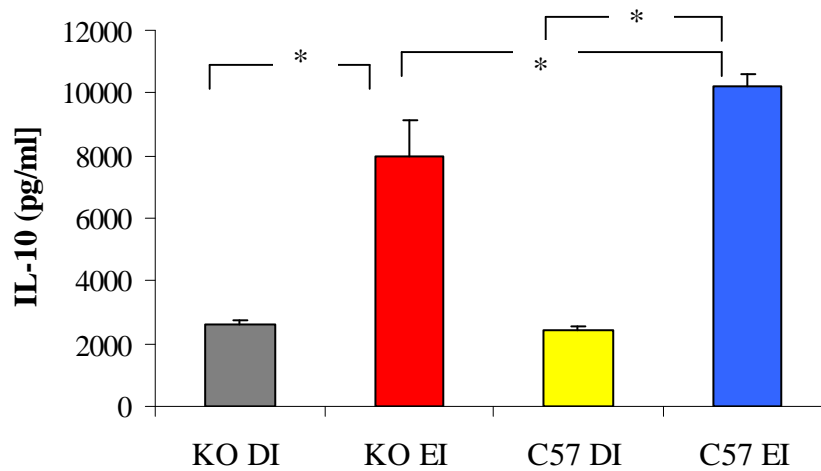


Figura 10 – Produção de IL-10 nos sobrenadantes de culturas aos 45 dias de infecção estimuladas com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle). * $p < 0,05$

Aos 60 dias, observou-se que os níveis de IL-10 são semelhantes entre os grupos KO sem diferenças estatisticamente significantes. Há uma maior produção desta citocina pelo grupo C57 DI em relação ao grupo KO submetido à mesma dieta ($p < 0,01$) e em relação ao seu controle submetido à dieta controle ($p < 0,001$).

Não foi observada diferença significativa quando comparou-se a deficiência em iNOS nos grupos submetidos à dieta controle (Figura 11).

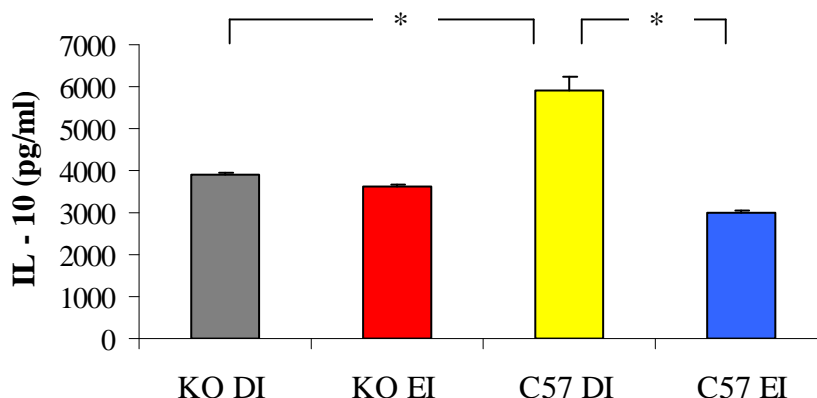


Figura 11 – Produção de IL-10 nos sobrenadantes de culturas aos 60 dias de infecção estimuladas com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle). * $p < 0,05$

Já aos dias 90 de infecção (Figura 12), os maiores níveis de IL-10 foram detectados no grupo KO DI com diferenças estatísticas significantes quando comparado aos KO EI e com seu controle C57 DI. O grupo controle submetido à dieta controle apresentou maiores níveis desta citocina quando observada a deficiência em iNOS ($p < 0,001$) e quando comparado com seu controle submetido à dieta hipoprotéica ($p < 0,001$).

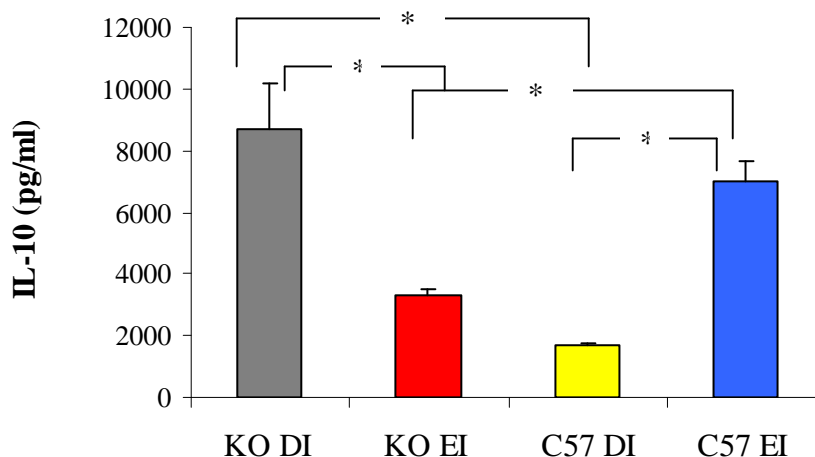


Figura 12 – Produção de IL-10 nos sobrenadantes de culturas aos 90 dias de infecção estimuladas com SEA, submetidos à cultura por 48 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle). * $p < 0,05$

Análise inter-grupos da produção de IL-10

Ao analisar a cinética da produção desta citocina nos três tempos estudados, observou-se que, com o passar da infecção, ou seja, com o cronificar da patogenia, os níveis de IL-10 do grupo KO DI aumentaram a cada tempo com diferenças estatísticas significantes ($p < 0,05$) exatamente ao contrário de seu grupo controle KO EI sem, contudo apresentar diferenças significantes entre 60 e 90 dias pós-infecção. O grupo controle submetido à dieta hipoprotéica apresentou níveis mais elevados desta citocina aos 60 dias de infecção com diferenças significantes entre 45 X 60 dias e 60 X 90 dias não sendo observada significância quando comparados 45 X 90 dias.

O grupo controle submetido à dieta controle apresentou maiores níveis de IL-10 aos 45 dias, com valores decrescendo para aproximadamente um terço aos 60 dias e voltando a crescer aos 90 dias, com diferenças significantes em todas as comparações (Figura 13).

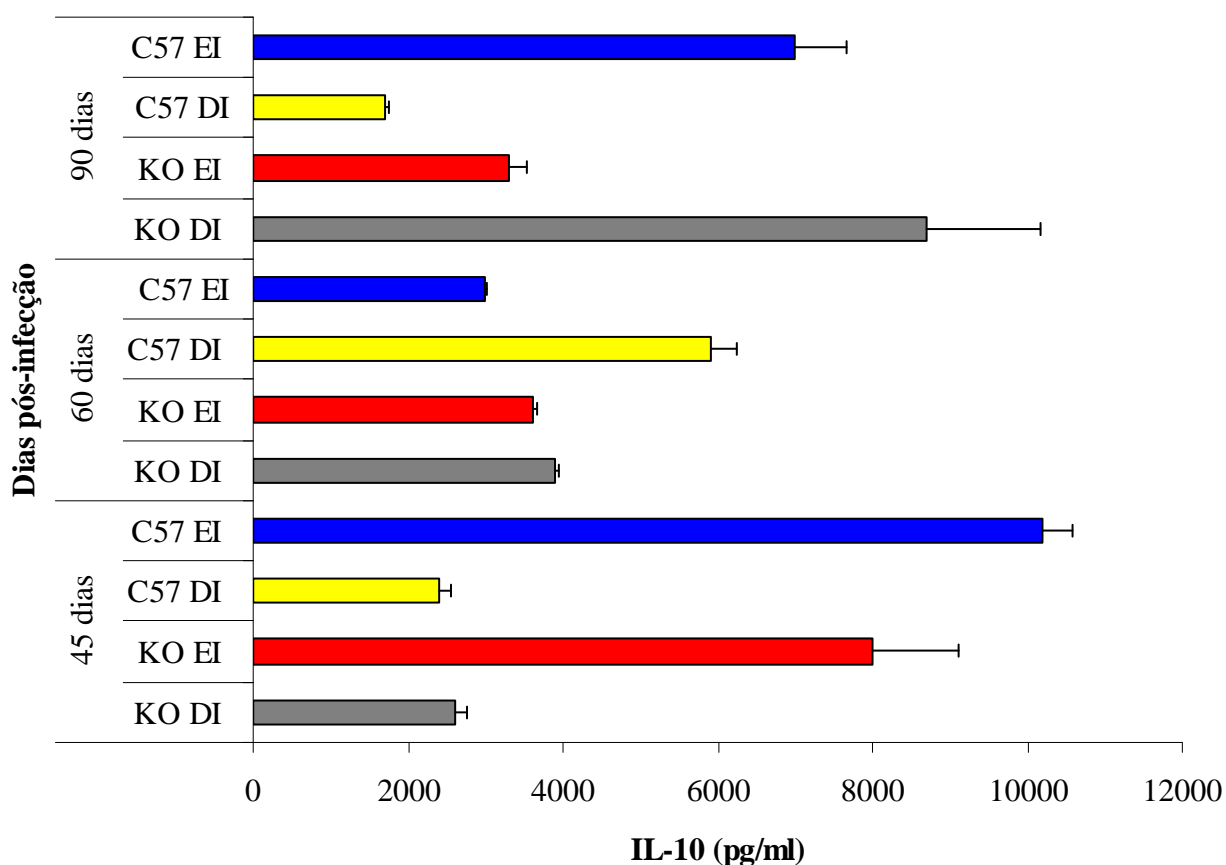


Figura 13 - Análise comparativa entre os três tempos de infecção quanto à produção de IL-10 nos sobrenadantes de culturas nos três tempos de infecção estimulados com SEA, submetidos à cultura por 24 h a 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. Os grupos apresentados são o KO DI (deficiente em iNOS e submetido à dieta hipoprotéica), KO EI (deficiente em iNOS e submetido à dieta controle), C57 DI (controles submetidos à dieta hipoprotéica) e C57 EI (controles submetidos à dieta controle).

5.2 Análise Histopatológica e Morfométrica do Fígado

5.2.1 Estudo Histopatológico

Em relação à histopatologia, aos 45 dias de infecção foram visualizados, nos animais KO DI, apenas alguns pequenos focos de infiltração inflamatória aguda em alguns espaços-porta.

Aos 60 dias, o processo inflamatório era intenso, com presença de numerosos granulomas periovulares em fase de exsudação inicial, presença de ovos de *Schistosoma mansoni* não fertilizados ou com raros polimorfonucleares e eventuais focos de necrose coagulativa aguda do parênquima. O colágeno aparecia como delicadas e raras fibrilas dispostas concentricamente na periferia dos granulomas.

Aos 90 dias, a maioria dos granulomas ainda se encontrava em fase exsudativa, eram de pequeno tamanho e a fibrose ocorria sob a forma de fibras colágenas um pouco mais espessas, mas ainda não caracterizando uma colagenização evidente.

Nos animais KO EI, aos 45 dias, a infiltração inflamatória aguda era moderada, ocorrendo focos eventuais de necrose coagulativa aguda no parênquima.

Aos 60 dias, notavam-se a presença de granulomas periovulares maiores, predominantemente colagenizados, com persistência do processo inflamatório agudo nos espaços-portais.

Aos 90 dias de infecção, os granulomas eram mais abundantes, isolados e com abundante colagenização, em comparação com os grupos anteriores, embora esse colágeno se restringisse à periferia dos mesmos e fosse de aspecto fibrilar, pouco denso.

Quando os animais controles foram avaliados, o grupo C57 DI apresentou, aos 45 dias de infecção, focos de metamorfose gordurosa periportal e de infiltração inflamatória aguda intensa nos espaços-porta, além de raros ovos de *Schistosoma mansoni* não fertilizados.

Aos 60 dias, a infiltração inflamatória aguda persistia em grande intensidade, com aparecimento de numerosos granulomas periovulares do tipo exsudativo ou com presença de fibrilas colágenas delgadas e pouco abundantes e aos 90 dias, a exsudação era de menor intensidade e a maioria dos granulomas mostrava-se em fase de transição, exibindo forte componente exsudativo e início de colagenização de discreta ou moderada intensidade.

Já no grupo C57 EI, aos 45 dias já podiam ser visualizados alguns granulomas do tipo exsudativo circundando ovos viáveis de *S. mansoni* em degeneração, além de raros focos de necrose aguda parenquimatosa.

Aos 60 dias, a exsudação ainda era intensa na maioria dos granulomas, sendo o colágeno depositado sob a forma de fibrilas delicadas e pouco abundantes.

Aos 90 dias ainda ocorria intensa infiltração inflamatória aguda de espaços-porta, os granulomas eram do tipo exsudativo e/ou produtivo, com deposição de colágeno um pouco mais espessa que nos grupos anteriores.

Aparentemente, a dieta hipoprotéica não influenciou a formação do granuloma esquistossomótico quando foi avaliado o fator deficiência em iNOS (Figuras, 3, 4, 5 e 6).

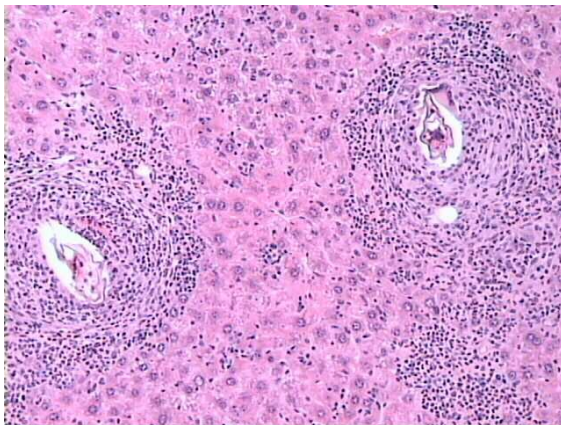


Figura 14 – Fígado de camundongo C57 DI (normal e desnutrido) com 60 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Os granulomas periovulares exibem acentuada reação exsudativa, com presença de discreta quantidade de matriz extracelular. H.E 200x

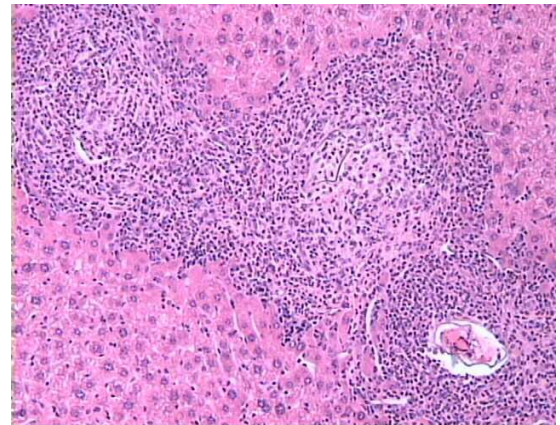


Figura 15 – Fígado de camundongo C57 EI (normal e eutrófico) com 60 dias de infecção pelo *S. mansoni* observando-se aspecto histológico semelhante ao da Figura 2. H.E. 200x



Figura 16 – Fígado de camundongo KO DI (deficiente em iNOS e desnutrido) com 60 dias de infecção pelo *S. mansoni*, exibindo focos de metamorfose gordurosa do parênquima e granulomas periovulares de dimensões reduzidas, com intensa reação exsudativa. H.E. 100x

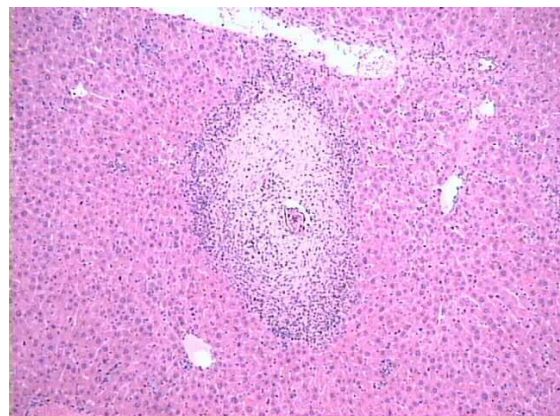


Figura 17 – Fígado de camundongo KO EI (deficiente em iNOS e eutrófico) aos 90 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Granulomas periovulares ainda de aspecto exsudativo na periferia, observando-se, porém, deposição de tecido colágeno. H.E. 100x

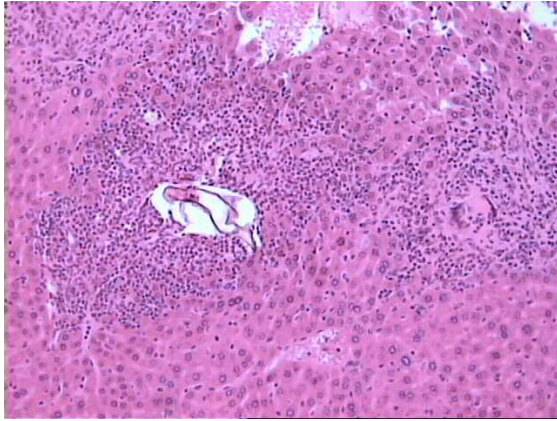


Figura 18 – Fígado de camundongo KO DI (deficientes em iNOS e desnutridos) aos 90 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Os granulomas ainda se acham em fase exsudativa intensa, com discreta deposição de matriz extracelular. H.E. 200x

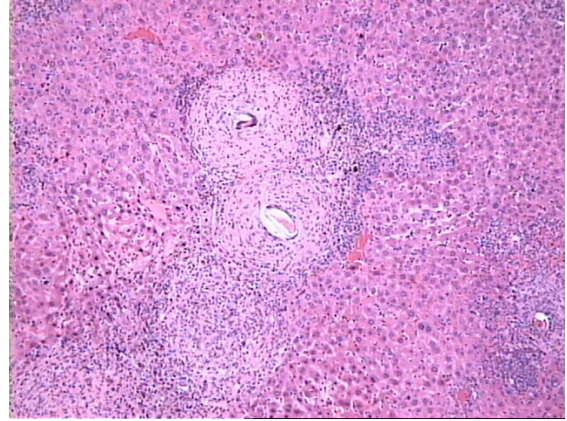


Figura 19 – Fígado de camundongo KO EI (deficientes em iNOS e eutróficos) aos 90 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Observa-se a presença de vários granulomas periportais colagenizados. H.E.100x

Segundo descrição no item 4.5.1, na morfometria, os cortes histológicos foram analisados quanto ao percentual de tecido fibroso, volume de granulomas, densidade volumétrica dos granulomas bem como quanto à densidade numérica.

Os resultados encontrados foram agrupados em subitens descritos abaixo.

5.2.2 Estudo Morfométrico do Fígado

5.2.2.1 Análise morfométrica dos animais deficientes em iNOS e normais submetidos à dieta controle e sacrificados nos dias 45, 60 e 90 após a infecção.

A Tabela 2 mostra os resultados da análise morfométrica dos camundongos deficientes em iNOS onde se observou diferenças estatísticas entre os grupos de 45 e 60 e entre 45 e 90 dias em relação ao percentual de fibrose ($p < 0,0001$) com aumento maior aos 90 dias. Para as demais variáveis, não houve significância nas diferenças encontradas. Nesse grupo analisado, houve retardo no aparecimento dos granulomas, os quais só foram observados a partir dos 60 dias de infecção.

Tabela 2 – Análise morfométrica dos animais deficientes em iNOS submetidos à dieta controle (KOEI) e sacrificados nos dias 45, 60 e 90 após infecção.

	Dias pós-infecção	N	Média	EPM	p
Fibrose (%)	45	5	1,73*	0,63	< 0,01
	60	5	9,63	1,46	
	90	5	11,54	1,46	
Densidade volumétrica dos granulomas	45	5	-	-	> 0,05
	60	5	0,09	0,02	
	90	5	0,12	0,04	
Densidade numérica dos granulomas (1/mm⁴)	45	5	-	-	> 0,05
	60	5	25,30	3,92	
	90	5	36,58	13,88	
Volume dos granulomas (μ³)	45	5	-	-	> 0,05
	60	5	334,20	34,73	
	90	5	491,10	99,16	

Os valores do volume dos granulomas foram divididos por 10.000; KO (deficientes em iNOS); EPM (erro padrão da média). Onde existe o (-), significa que não houve observação de granulomas. * A média da fibrose nos animais sacrificados aos 45 dias pós-infecção foi significativamente diferente daqueles sacrificados após 60 e 90 dias ($p < 0,0001$)

N = amostra

Na Tabela 3, estão apresentados os resultados das análises dos camundongos normais, C57 EI mostrando diferenças estatísticas entre os grupos sacrificados nos dias 45 e 60, 45 e 90 e 60 e 90 pós-infecção em relação ao percentual de fibrose, ocorrendo aumento aos 60 dias, voltando a diminuir aos 90 dias. Nesse grupo, a formação dos granulomas já ocorre aos 45 dias.

Tabela 3 – Análise morfométrica dos animais normais submetidos à dieta controle (C57EI) e sacrificados nos dias 45, 60 e 90 após infecção.

	Dias pós-infecção	N	Média	EPM	p
Fibrose (%)	45	5	2,28*	0,45	
	60	5	10,3 §	1,09	< 0,05
	90	5	6,09	0,37	
Densidade volumétrica dos granulomas	45	5	0,04	0,02	
	60	5	0,09	0,03	> 0,05
	90	5	0,07	0,02	
Densidade numérica dos granulomas (1/mm⁻⁴)	45	5	15,26	6,77	
	60	5	48,09	15,08	> 0,05
	90	5	78,24	31,13	
Volume dos granulomas (μ³)	45	5	118,00	55,07	
	60	5	222,19	33,40	> 0,05
	90	5	120,79	16,10	

Os valores do volume dos granulomas foram divididos por 10.000; C57 (controles); EPM (erro padrão da média). * A média da fibrose nos animais sacrificados aos 45 dias pós-infecção foi significativamente diferente daqueles sacrificados após 60 e 90 dias bem como a § média entre os animais sacrificados aos 60 e aos 90 dias ($p < 0,0001$).

N = amostra

5.2.2.2 Análise morfométrica dos animais deficientes em iNOS e normais submetidos à dieta hipoprotéica e sacrificados nos dias 45, 60 e 90 após a infecção.

Em relação aos camundongos KO DI não houve diferenças estatísticas significantes na análise desses animais submetidos à dieta hipoprotéica e sacrificados nos dias 45, 60 e 90 após infecção. Não foi observada, aos 45 dias, a presença de granulomas.

Os dados apresentados na Tabela 4 são resultantes da análise morfométrica dos camundongos normais submetidos à dieta hipoprotéica nos mesmos tempos citados.

Observou-se um aumento do percentual de fibrose aos 90 dias pós-infecção sem haver diferenças estatísticas entre os tempos estudados. A densidade numérica dos granulomas foi aproximadamente 60 vezes maior aos 90 dias em relação aos analisados aos 45 dias ($p < 0,019$). Outro dado importante diz respeito ao volume dos granulomas que foi maior aos 60 dias, observando-se volumes menores mas ainda elevados aos 90 dias, quando comparados aos 45 dias ($p < 0,001$).

Tabela 4 – Análise morfométrica dos animais normais submetidos à dieta hipoprotéica (C57DI) e sacrificados nos dias 45, 60 e 90 após infecção.

	Dias pós-infecção	N	Média	EPM	p
Fibrose (%)	45	5	3,48	1,05	> 0,05
	60	5	3,38	0,67	
	90	6	5,22	0,82	
Densidade volumétrica dos granulomas	45	5	0,0013	0,00	> 0,05
	60	5	0,0726	0,02	
	90	6	0,1448	0,06	
Densidade numérica dos granulomas (1/mm⁻⁴)	45	5	1,89*	1,89	< 0,05
	60	5	37,93	11,94	
	90	6	62,72	17,44	
Volume dos granulomas (μ³)	45	4	19,90**	15,91	< 0,05
	60	5	192,25	23,61	
	90	6	137,86	17,24	

Os valores do volume dos granulomas foram divididos por 10.000; C57 (controles); EPM (erro padrão da média). * A densidade numérica dos granulomas dos animais sacrificados aos 45 dias pós-infecção foi significativamente diferente daqueles sacrificados após 90 dias ($p < 0,05$). ** A média do volume dos granulomas nos animais sacrificados aos 45 dias pós-infecção foi significativamente diferente daqueles sacrificados após 60 e 90 dias ($p < 0,0001$).

N = amostra

5.2.2.3 Análise morfométrica dos animais deficientes em iNOS submetidos às diferentes dietas aos 45, 60 e 90 dias após infecção.

Não foi observada diferença estatística significativa quando feita a análise entre os animais KO aos 45 dias de infecção submetidos às diferentes dietas. A esse tempo da infecção não foram observados granulomas em ambas as dietas.

A Tabela 5 mostra os resultados da análise morfométrica comparativa entre os animais deficientes em iNOS aos 60 dias de infecção submetidos às diferentes dietas. Neste tempo, os animais KO EI apresentaram densidades volumétricas dos granulomas significativamente maiores ($p < 0,041$). Diferentemente da análise com 45 dias de infecção, os granulomas estão aparentes e o percentual de fibrose é mais elevado no grupo KO EI, embora esta diferença não seja significativa.

Tabela 5 – Análise morfométrica comparativa entre os animais deficientes em iNOS aos 60 dias de infecção submetidos às diferentes dietas.

	Grupos	N	Média	EPM	p
Fibrose (%)	EI	5	9,63	1,46	> 0,05
	DI	5	5,27	2,43	
Densidade volumétrica dos granulomas	EI	5	0,09*	0,02	< 0,05
	DI	5	0,04	0,01	
Densidade numérica dos granulomas (1/mm ⁴)	EI	5	25,30	3,92	> 0,05
	DI	5	22,94	13,05	
Volume dos Granulomas (μ³)	EI	5	334,20	34,72	> 0,05
	DI	5	225,53	67,76	

Os valores do volume dos granulomas foram divididos por 10.000; KO (deficientes em iNOS); EPM (erro padrão da média); EI (eutrófico infectado); DI (desnutrido infectado).* A média da densidade volumétrica dos animais KO submetidos à dieta controle foi significativamente ($p < 0,05$) maior que os animais KO submetidos à dieta hipoprotéica.

N = amostra

Aos 90 dias de infecção, nos animais KO não houve diferenças estatísticas entre nenhuma das variáveis.

5.2.2.4 Análise morfométrica dos animais normais submetidos às diferentes dietas aos 45, 60 e 90 dias após infecção.

Aos 45 dias de infecção, os animais C57 submetidos às diferentes dietas não apresentaram diferenças estatísticas significantes entre nenhuma das variáveis.

A Tabela 6 mostra os resultados da análise morfométrica comparativa entre os animais normais aos 60 dias de infecção submetidos às diferentes dietas. Neste tempo de infecção, todos os valores referentes ao grupo EI, submetidos à dieta controle foram maiores que os do grupo DI, submetidos a dieta hipoprotéica, observando-se diferenças estatísticas significantes ($p < 0,001$) em relação ao percentual de fibrose.

Tabela 6 – Análise morfométrica comparativa entre os animais normais aos 60 dias de infecção submetidos às diferentes dietas.

	Grupo	N	Média	EPM	p
Fibrose (%)	EI	5	10,30*	1,08	< 0,05
	DI	5	3,38	0,66	
Densidade volumétrica dos granulomas	EI	5	0,09	0,03	> 0,05
	DI	5	0,07	0,02	
Densidade numérica dos granulomas (1/mm ⁻⁴)	EI	5	48,09	15,08	> 0,05
	DI	5	37,93	11,94	
Volume dos granulomas (μ³)	EI	5	222,19	33,40	> 0,05
	DI	5	192,25	23,61	

Os valores do volume dos granulomas foram divididos por 10.000; C57 (controles); EPM (erro padrão da média); EI (eutrófico infectado); DI (desnutrido infectado). * O percentual de fibrose do grupo C57 EI foi significativamente maior que o do grupo C57 DI (p < 0,05).

N = amostra

Aos 90 dias de infecção, os animais C57 submetidos às diferentes dietas não apresentaram diferenças estatisticamente significantes na análise morfométrica.

5.2.2.5 Análise morfométrica comparativa entre os animais deficientes em iNOS e normais aos 45, 60 e 90 dias após infecção, submetidos à dieta controle.

Não foram observadas diferenças estatísticas significantes na análise morfométrica realizada aos 45 dias após a infecção.

A Tabela 7 apresenta os resultados da análise morfométrica comparativa entre os animais deficientes em iNOS e normais submetidos à dieta controle aos 60 dias de infecção sendo observado maior volume de granulomas nos animais KO submetidos à dieta controle (p = 0,049) quando comparado com os seus controles C57. Para os demais parâmetros não houve diferenças estatísticas.

Tabela 7 - Análise morfométrica comparativa entre os animais deficientes em iNOS e normais submetidos à dieta controle aos 60 dias de infecção.

	Animais	N	Média	EPM	p
Fibrose (%)	KO	5	9,63	1,46	> 0,05
	C57	5	10,30	1,08	
Densidade volumétrica dos granulomas	KO	5	0,09	0,02	> 0,05
	C57	5	0,09	0,03	
Densidade numérica dos granulomas (1/mm ⁻⁴)	KO	5	25,3	3,92	> 0,05
	C57	5	48,09	15,08	
Volume dos granulomas (μ³)	KO	5	334,20*	34,72	< 0,05
	C57	5	222,19	33,40	

Os valores do volume dos granulomas foram divididos por 10.000; KO (deficientes em iNOS), C57 (controles); EPM (erro padrão da média). * O volume dos granulomas foi maior (p < 0,05) no grupo KO em relação ao seu controle C57.

N = amostra

A Tabela 8 apresenta os resultados da análise morfométrica comparativa entre os animais deficientes em iNOS e normais aos 90 dias de infecção submetidos à dieta controle. O percentual de fibrose, bem como o volume dos granulomas apresentaram-se estatisticamente maiores no grupo KO. Para os outros parâmetros, não houve diferenças estatísticas significantes.

Tabela 8 – Análise morfométrica comparativa entre os animais deficientes em iNOS e normais aos 90 dias de infecção, submetidos à dieta controle.

	Animais	N	Média	EPM	p
Fibrose (%)	KO	5	11,54*	1,46	< 0,05
	C57	5	6,09	0,37	
Densidade volumétrica dos granulomas	KO	5	0,12	0,04	> 0,05
	C57	5	0,07	0,02	
Densidade numérica dos granulomas (1/mm ⁻⁴)	KO	5	36,58	13,88	> 0,05
	C57	5	78,24	31,13	
Volume dos granulomas (μ³)	KO	5	491,10*	99,16	< 0,05
	C57	5	120,79	16,10	

Os valores do volume dos granulomas foram divididos por 10.000; KO (deficientes em iNOS); C57 (controles); EPM (erro padrão da média). * O percentual de fibrose do grupo KO EI foi estatisticamente maior (p < 0,05) que o do grupo C57 EI no mesmo período.

N = amostra

5.2.2.6 Análise morfométrica comparativa entre os animais deficientes em iNOS e normais aos 45, 60 e 90 dias após infecção, submetidos à dieta hipoprotéica (DI).

Não houve diferenças estatísticas significantes em nenhum dos três tempos estudados para esse grupo de animais.

5.3 Avaliação da Carga Parasitária

Dez animais de cada grupo infectado (experimental e controle) foram sacrificados para recuperação de vermes machos e fêmeas localizados no sistema porta mesentérico. Ao fim do experimento, os resultados foram analisados e comparados entre grupos (Figura 1). O grupo controle infectado submetido à dieta hipoprotéica apresentou maior homogeneidade no número de vermes macho e fêmea. Contudo, não houve diferenças entre nenhum dos grupos analisados ($p > 0,05$).

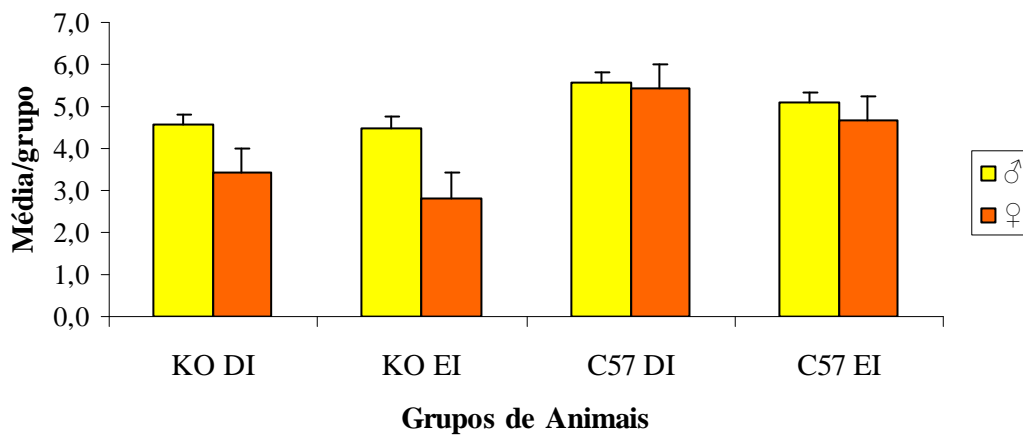


Figura 20 – Contagem de vermes adultos machos e fêmeas após perfusão nos quatro grupos infectados: deficientes em iNOS desnutridos e infectados (KO DI); deficientes em iNOS eutróficos e infectados (KO EI); controles desnutridos e infectados (C57 DI); controles eutróficos e infectados (C57 EI). Os resultados foram expressos em Médias (barras laranja e amarelas) e EPM (Erro Padrão da Média); traços verticais.

6 DISCUSSÃO

A esquistossomose mansônica é um importante problema de saúde mundial, especialmente em países em desenvolvimento, onde está, muitas vezes, associada a um precário estado nutricional.

Uma vez que a subnutrição é capaz de prejudicar a capacidade defensiva e a resposta imunológica do hospedeiro, pode ser necessário combater, inicialmente, a desnutrição e depois a esquistossomose por esta ter a capacidade de agravar o estado de má nutrição já existente (COUTINHO et al., 1979).

Como o Nordeste Brasileiro apresenta áreas endêmicas para a esquistossomose parasitose onde, muitas vezes, o paciente convive com a desnutrição, este estudo teve como um dos objetivos conhecer o padrão de resposta imunológica de camundongos, o modelo experimental mais adequado para o estudo da esquistossomose, deficientes em iNOS, desnutridos e com infecção esquistossomótica aguda (ANDRADE; CHEEVER, 1993) nos dias 45, 60 e 90 pós-infecção.

A esquistossomose murina em linhagens isogênicas, proporciona um modelo útil para o estudo da influência do padrão genético no desenvolvimento da doença.

Por outro lado, o estudo desenvolvido com os animais deficientes em iNOS (KO) serviu para que fosse possível conhecer alguns aspectos envolvidos na patogenia da esquistossomose aguda, relacionando também o óxido nítrico com a desnutrição e a esquistossomose. A iNOS está presente virtualmente em todas as células e é expressa em resposta as citocinas próinflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-1 β liberando prolongadas taxas de NO, que vão atuar na esquistossomose como um regulador da resposta inflamatória. Na ausência dessa enzima, o NO em taxas reduzidas poderá comprometer a formação do granuloma esquistossomótico e associado ao estado nutricional mostrou resultados decorrente dessa associação (iNOS x desnutrição) ainda inédita na literatura.

É importante salientar que, apesar de ser relativamente difícil caracterizar as fases aguda e crônica da esquistossomose murina, a infecção é considerada aguda até mais ou menos a 8ª semana de infecção (WYNN et al., 1998) e a infecção crônica começa a ser caracterizada a partir da 12ª semana pós-infecção (FALLON, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002). Portanto, estes estudos foram desenvolvidos na forma aguda da doença e os parâmetros estudados também foram analisados no período inicial da infecção crônica, considerada, ainda, como um período de transição entre as duas fases.

6.1 Avaliação das Citocinas

A reação em torno do ovo do *S. mansoni*, denominada de granuloma é descrita como uma manifestação de hipersensibilidade retardada e é observada nos hospedeiros susceptíveis, ocorrendo variações na morfologia, dependendo do tempo de infecção e da espécie de modelo estudada, parecendo ter uma relação também com o sistema imunológico e o estado de nutrição (WARREN; DOMINGO; COWAN, 1967).

Do ponto de vista imunológico, oito semanas após a infecção com *Schistosoma mansoni*, a produção de citocinas Th2 por células esplênicas e por células do granuloma hepático é predominante se comparada à produção de citocinas Th1 (STAVITSKY, 2004) justificando que a expressão de Th2 é predominante e está relacionada com a formação do granuloma hepático e que o aumento de Th2 é acompanhado pela diminuição de Th1.

Boros e Lukacs (1992), observaram que a produção de IL-2 e IL-4 estavam fortemente associadas com a formação do granuloma hepático e que essa produção diminuía com a modulação da resposta granulomatosa.

Alguns trabalhos mostram que a IL-4 não interfere no tamanho do granuloma e diminui a fibrose (CHEEVER et al., 1994) e que a IL-10 provoca aumento do tamanho do granuloma bem como o número de eosinófilos, não interferindo no processo fibrogênico (BOROS; WHITFIELD, 1998), enquanto o IFN- γ aumenta o número de eosinófilos, mas não atua sobre o tamanho do granuloma nem na formação da fibrose (SHER et al., 1990).

A fibrose, algumas vezes, aparece no granuloma, no entanto, trata-se de um processo complexo, controlado por um número de citocinas produzidas por vários tipos de células mas sua regulação é claramente independente da regulação da formação do granuloma (STAVITSKY, 2004).

Na esquistossomose murina, os linfócitos CD4⁺ desempenham um papel importante central na formação e crescimento dos granulomas hepáticos e as citocinas dirigem a sua resposta inflamatória em torno dos ovos. As citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 são as principais que são secretadas por células do tipo Th2 e tornam-se presentes em maiores níveis após o início da deposição e contato com os antígenos dos ovos, que são eliminados pelas fêmeas adultas do *S. mansoni* entre a 4^a e 5^a semana pós-infecção. Nesse período, as citocinas do tipo Th1 (IFN-g e IL-12), são inibidas e começa a ser notado uma diminuição do tamanho da formação do granuloma (WYNN et al., 1998).

Deve-se ressaltar que o modelo murino é considerado o mais adequado por apresentar alterações patológicas semelhantes às dos humanos (ANDRADE; CHEEVER, 1993), desta

forma, foram avaliadas a produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 para se conhecer o perfil de produção de citocinas Th1 e Th2.

Quanto à produção de IFN- γ , os dados desse trabalho não apresentaram diferenças estatísticas ($p > 0,05$) entre os grupos estudados apresentando, contudo, maiores concentrações desta citocina nos animais KO EI em relação ao seu controle C57 EI, concordando com os estudos de Hesse et al. (2000) de que a deficiência em iNOS é responsável por um aumento da produção desta citocina nos eutróficos e se contrapondo aos achados de Brunet et al. (1999) onde a inibição da produção de NO, pela administração de aminoguanidina aos 46 dias de infecção em animais infectados com *S. mansoni* provocou uma diminuição da produção de IFN- γ *in vitro*, talvez devido ao período analisado por este grupo, o que ainda não seria representativo aos 60 dias pós-infecção. Contudo, esses resultados se apresentaram de maneira inversa quando foram comparados os animais submetidos à dieta hipoprotéica, isto, é, os camundongos C57 DI apresentaram maiores níveis desta citocina quando comparados com os animais KO DI, sugerindo que a desnutrição associada à deficiência de NO teriam papel inibitório sobre os macrófagos, sendo representado pela diminuição da concentração de IFN- γ .

Como o presente estudo também avalia a cinética da produção das três citocinas na fase aguda da esquistossomose murina, foi observada uma constância na relação entre KO EI e C57 EI com maiores concentrações do IFN- γ aos 45 dias de infecção, ou seja, no início da oviposição.

Os KO EI, em todos os três tempos, apresentaram aumento da concentração de IFN- γ em relação ao seu controle C57. Um fato interessante é que, segundo Lyons (1995), o aumento da produção de NO está comumente associada com o aumento de outros mediadores inflamatórios como IFN- γ , que sofrem sinergismo com NO e potencializam seus efeitos. Desta forma, a partir do presente estudo, era esperado que a baixa produção de NO influenciasse a produção desta citocina, o que não foi observado.

Em relação à produção de IL-4, contudo, os resultados apresentados nesse trabalho divergiram dos obtidos por Hesse et al (2000), uma vez que os níveis desta citocina mostraram-se maiores no grupo KO EI ao serem comparados ao grupo C57 EI ($p > 0,05$). Após 45 e 90 dias. Mais uma vez, foi observada inversão das razões quando foram observados os animais submetidos a dieta hipoprotéica parecendo haver um mecanismo de compensação, quando associadas dieta hipoprotéica e deficiência em iNOS, há uma diminuição das citocinas

Th2 para prevenir patologia severa. Estes dados surpreenderam, pois, assim como Hesse et al. (2000), eram esperadas concentrações mais elevadas de IL-4 pelo grupo C57 EI.

Em trabalho desenvolvido por Boros e Lukacs (1992), foi observado que o pico da formação do granuloma ocorre apenas quando os linfócitos presentes neste produzem significantes quantidades de IL-4, o que não foi observado nesse estudo uma vez que as altas concentrações desta citocina ocorreram aos 45 dias de infecção, momento no qual não observou-se granulomas nos animais KO EI.

Da mesma forma, nossos dados referentes à produção de IL-10 divergem dos obtidos por Brunet et al. (1999), onde foram observadas maiores concentrações desta citocina pelo grupo C57 DI. Nossos dados revelam um discreto aumento no grupo KO DI em relação ao KO EI ($p > 0,05$).

Um fato interessante a ser observado é, que, ao contrário do observado com as outras citocinas em relação à associação entre dieta hipoprotéica e deficiência em iNOS e um provável mecanismo compensatório para prevenir a morbidade, as maiores concentrações de IL-10 foram observadas nos animais C57 DI ($p < 0,001$).

Uma vez que a IL-10 foi identificada como um fator solúvel responsável pela inibição da síntese de citocinas Th1, observou-se a imediata produção desta citocina ao tempo da deposição dos ovos e permanência dos níveis elevados no estágio crônico da doença tendo um importante papel regulatório durante a esquistossomose (HOFFMANN; WYNN; DUNNE, 2002). Em trabalho desenvolvido por Flores-Villanueva et al. (1996), a administração de IL-10 em camundongos com esquistossomose provocou diminuição do tamanho dos granulomas circunscritos durante a fase aguda da infecção. Wynn et al., 1998 observaram que camundongos deficientes em IL-10 apresentavam aumento tanto de citocinas de perfil Th1 como Th2, sendo, desta forma, danoso para este hospedeiro. Essas informações ressaltam a importância da indução da IL-10 para que haja o desenvolvimento de uma eficiente resposta Th2 na esquistossomose.

Deve-se salientar que além desses mecanismos de células T, existem diversos outros para explicar a imunorregulação na esquistossomose murina, incluindo um papel importante das células T CD8⁺, as células regulatórias e as células B, que precisam ser investigados.

Desta forma, mais estudos em modelo murino precisam ser realizados para que esses pontos levantados no trabalho possam ser mais fundamentados. Além disso, outros modelos experimentais necessitam ser ainda desenvolvidos para investigar mecanismos imunopatogênicos e para se testar intervenções terapêuticas que possam ser utilizadas na doença humana.

6.2 Análise Histopatológica Hepática

A lesão macroscópica, em si, já se constitui uma característica, possuindo um aspecto micronodular esbranquiçado, porém a lesão microscópica pode assumir um maior significado ao exibir diversos graus de lesões inflamatórias destrutivas e obstrutivas dos ramos porta intra-hepáticos (ANDRADE; BINA, 1983).

Em relação à análise da morfologia microscópica do fígado, estudos desenvolvidos por Coutinho (2004) e Oliveira et al. (2004) mostraram que a má nutrição afeta vários mecanismos de regeneração, como a diminuição da proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e albumina e que o estado nutricional do hospedeiro tem papel importante modificando os tecidos conectivos na esquistossomose hepática murina.

Nesse sentido, o estudo em camundongos normais demonstrou que a resposta inflamatória hepática foi mais intensa nos animais eutróficos (C57EI), em comparação com os desnutridos (C57 DI) confirmando que a nutrição adequada do hospedeiro favorece a resposta inflamatória contribuindo para o aumento da deposição de colágeno (Coutinho, 2004). Apesar disso, foi observado também que nos camundongos desnutridos (C57DI) essa resposta inflamatória, apesar de menos intensa, já era visível aos 45 dias após a infecção e se intensificava aos 60 dias após a infecção.

A fibrose hepática da esquistossomose é uma fibrose típica que envolve essencialmente os espaços porta, cuja etiologia é ainda não totalmente esclarecida. Em humanos, ambas as lesões, tanto as granulomatosas periovulares como a fibrose progressiva periportal, participam da formação da chamada fibrose “pipestem” ou de Symmers (COUTINHO, 2004). Além disso, podemos salientar que a fibrogênese é um processo dinâmico, regulado por citocinas, mas sua regulação é independente daquela encontrada na formação do granuloma (STAVITSKY, 2004).

No modelo experimental murino essa fibrose de Symmers ou “clay pipestem”, visualizada em humanos tem sido reproduzida em camundongos bem nutridos (ANDRADE; CHEEVER, 1993). No entanto, não se tem tido sucesso na reprodução em animais desnutridos. Por outro lado, alguns camundongos desnutridos desenvolveram uma fibrose denominada de “pipestem-like”, em trabalhos realizados por Coutinho et al., (1997; 2003 e 2004).

6.3 Estudo Morfométrico do Fígado

Do ponto de vista morfométrico os fígados analisados no grupo submetido à dieta controle acrescidos da deficiência em iNOS (KOEI) apresentou maior percentual de fibrose

aos 90 dias de infecção, correspondendo ao encontrado nas fases de transição e nas crônicas já estabelecidas, com baixo percentual de fibrose aos 45 dias de infecção (Tabela 2).

Contudo, quando foram avaliados os animais normais eutróficos (C57 EI), os maiores percentuais de fibrose foram observados aos 60 dias de infecção, indicando que o KO EI sofreu um provável retardo na formação da fibrose devido à deficiência em iNOS (Tabela 3).

Ao serem comparadas as Tabelas 3 e 4, é possível observar que, quanto ao percentual de fibrose, os animais C57 EI apresentaram maiores níveis aos 60 dias de infecção (Tabela 3), contrapondo-se ao grupo C57 DI que parece apresentar um retardo na formação da fibrose observado aos 60 dias (Tabela 4). A densidade volumétrica, bem como o volume dos granulomas observado nos 45 e 60 dias após a infecção, foi maior no grupo submetido à dieta controle (Tabelas 3 e 4), confirmando os achados de Coutinho (2004) de que animais bem nutridos apresentam esses parâmetros maiores em relação aos desnutridos. No entanto, aos 90 dias esses parâmetros analisados foram maiores nos animais submetidos à dieta hipoproteica.

De modo geral, o fator desnutrição foi capaz de retardar, inicialmente, a fibrose bem como os demais parâmetros, corroborando com os achados de Oliveira et al (2004) e Coutinho (2004) de que a desnutrição prejudica os mecanismos de reparo quanto aos animais controles. Entretanto, quando foram avaliados os animais deficientes em iNOS, os resultados obtidos revelaram que o fator dieta não interfere na resposta inflamatória entre os animais KO, influenciando apenas na densidade volumétrica desses animais (Tabela 5).

O fator dieta parece influenciar apenas o parâmetro densidade volumétrica dos granulomas aos 60 dias de infecção sendo maiores as densidades no grupo KO EI ($p < 0,05$) (Tabela 6).

Quando comparados em relação à dieta controle, o volume dos granulomas, aos 60 dias de infecção, apresentou-se maior no grupo KO EI que em seu controle C57 EI (Tabela 7).

O NO desempenha importante papel na função vascular durante as respostas inflamatórias, reduzindo a agregação e aderência plaquetárias, inibindo características da inflamação induzidas por mastócitos e servindo como regulador do recrutamento de leucócitos. Na esquistossomose, o NO é importante para o hospedeiro não somente devido às suas características antimicrobianas, mas também servindo como um potente mediador inflamatório e antifibrótico (HESSE et al., 2001). No presente estudo, mesmo com a deficiência em iNOS, principal produtora de NO, é preciso lembrar que pequenas quantidades dessa molécula podem ser produzidas pela nNOS e eNOS.

A análise morfométrica revelou que, em relação ao fator deficiência em iNOS, os animais KO DI (dados não mostrados) e C57 DI, aos 45 dias de infecção, apresentaram

achados inflamatórios de menor intensidade, não sendo observadas diferenças nos demais tempos, concordando com os achados de Brunet et al. (1999) sobre a importância do NO no desenvolvimento da inflamação das fases iniciais da infecção pelo *S. mansoni*.

Apesar de nos estudos de Coutinho (2004) e Oliveira et al. (2004) os animais terem sido estudados durante a fase crônica, é importante contribuir com a informação de que estes achados também são encontrados no granuloma de fase aguda.

Com relação à ação do NO na formação do granuloma é importante lembrar que o iNOS é um importante fator regulador, controlando a inflamação induzida pelo ovo do *S. mansoni*. A esse respeito devemos salientar que a produção de iNOS é induzida por várias citocinas pró-inflamatórias incluindo IFN- γ e TNF- α cuja produção contínua pode induzir um dano tecidual e contribuir para o aumento da patologia durante a resposta imune (Hesse et al., 2000).

Em ensaio desenvolvido, por Brunet et al. (1999), onde o NO foi inibido pela administração de aminoguanidina, foi observada caquexia, hepatoesplenomegalia reduzida e exacerbada patologia hepática. O ensaio revelou a importância do NO quando inibido em tempos diferentes de infecção (6 e 32 semanas pós-infecção) para prevenir os danos desencadeados pela oviposição pois, na fase crônica, essa inibição não causou alterações na morbidade. Em contraste, no estudo realizado por Hesse et al. (2000), nenhum sinal de caquexia foi detectado na fase aguda nos animais deficientes em iNOS e foi sugerido que o papel mais importante do NO durante uma resposta Th1 dominante, no caso animais IL-4 KO, é a de servir antes como anti-inflamatório do que como mediador hepatotóxico.

Neste caso, o presente trabalho parece confirmar os achados de Hesse et al. (2000) atribuindo o papel importante do NO como anti-inflamatório ao ser observado maior percentual de fibrose nos animais normais, que são os animais que não apresentam a deficiência do NO, em relação aos KOs, que são os grupos de animais deficientes em iNOS (Tabela 2 e 3).

6.4 Avaliação da Carga Parasitária

Os camundongos separados para avaliação da carga parasitária (10/grupo) foram sacrificados após 90 dias de infecção, ou seja, na fase de transição da doença. Esses resultados apresentaram um maior número de vermes adultos nos grupos normais (DI e EI) ao se comparar com os grupos deficientes em iNOS (DI e EI) e uma quantidade semelhante de vermes adultos machos e fêmeas obtidos dos animais C57 DI. Contudo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos. Portanto não foi observado diminuição na carga

parasitária nos grupos desnutridos, contrariando o que foi encontrado por outros autores (DE WITT, 1957; MAGALHÃES et al., 1986).

No entanto, seria interessante analisar a morfologia destes vermes a fim de identificar diferenças anatômicas entre eles a partir dos animais submetidos às diferentes dietas e avaliar a importância da presença do NO quanto ao tamanho dos vermes e anatomia de seus órgãos.

7 CONCLUSÕES

Diante do estudo realizado em camundongos, onde analisamos a infecção por *S. mansoni*, a desnutrição e a deficiência do NO, e após utilizarmos análises estatísticas para avaliarmos esses dados com os referentes à carga parasitária, morfometria, histopatologia e produção de citocinas, podemos concluir que:

- A semelhança entre a quantidade e sexo dos vermes adultos de *S. mansoni* nos grupos analisados ocorre possivelmente devido ao número pequeno de animais da amostra. Informações adicionais poderão ser observadas se fossem avaliadas alterações morfológicas e anatômicas dos vermes e seus respectivos órgãos;
- Relacionado à variável deficiência em iNOS, esta atua inibindo a resposta inflamatória dos granulomas no início da infecção nos grupos deficientes em iNOS (DI e EI);
- Estudando a variável deficiência de iNOS, no grupo KO EI, o único parâmetro morfométrico hepático mais elevado foi o volume dos granulomas em relação ao seu controle C57 EI, salientando que a ausência de NO sugere um aumento da reação inflamatória em torno dos ovos;
- Comparando deficientes em iNOS x normais em relação à dieta controle, o grupo C57 apresenta reação inflamatória já aos 45 dias enquanto o grupo deficiente em iNOS apresentou retardo em todos os parâmetros morfométricos, exceto para o percentual de fibrose, indicando que a ausência de NO retarda o processo fibrótico no início da infecção;
- Aos 60 dias de infecção, a variável deficiência em iNOS causou aumento do tamanho dos granulomas no grupo KO EI em relação ao seu controle C57 EI sugerindo que a ausência de NO é crítica no início da infecção, não sendo observado isso com o surgimento da resposta Th2;

- Em relação à variável dieta, os animais submetidos à dieta controle apresentaram alguns parâmetros morfométricos hepáticos mais elevados com destaque para o percentual de fibrose do grupo C57 EI aos 60 e 90 dias pós-infecção, caracterizando que os animais eutróficos, apresentam melhores condições imunológicas;
- O fator dieta parece não interferir na resposta inflamatória entre os animais deficientes em iNOS, em todos os tempos analisados;
- O IFN- γ apresentou maior concentração no grupo KO EI em relação ao seu controle C57 EI em todos os tempos analisados, havendo inversão da relação quando analisados os KO DI e seus controles C57 DI aos 45 e 60 dias pós-infecção, provavelmente devido à associação entre deficiência de NO e desnutrição inibindo macrófagos;
- A citocina IL-4 apresentou menores concentrações no grupo KO EI em relação ao seu controle C57 EI ao se comparar com os níveis de IFN-g aos 45 e 90 dias, sugerindo a predominância de uma resposta Th1 e inibição da resposta Th2 para prevenir a patologia severa;
- A produção de IL-10 mostrou-se inalterada quando a variável deficiência em iNOS foi observada nos animais submetidos a dieta hipoprotéica, aos 45 dias, parecendo não ter relevância o papel da desnutrição na produção desta citocina.

BIBLIOGRAFIA

ABATH, F. G. C. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 85-91, fev. 2006.

ABBAS, A. A; MURPHY, K. M; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, London, n. 383, p. 787-793, out., 1996.

ANDRADE, Z. A.; AZEVEDO, T. M. A contribution to the study of acute schistosomiasis (an experimental trial). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n. 82, p. 311-317, jul./set., 1987.

ANDRADE, Z. A; BINA, J. C. The pathology of the hepatosplenic form of schistosomiasis mansoni in its advanced form (study of 232 complete necropsies). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 285-305, jul./set., 1983.

ANDRADE, Z. A; CHEEVER, A. W. Characterization of the murine model of schistosomal hepática periportal fibrosis ("pipestem" fibrosis). **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 74, n. 2, p. 195-202, abr., 1993.

BARBOSA, C. S et al. An outbreak of acute schistosomiasis at Porto de Galinhas beach, Pernambuco, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17 n. 3 p. 725-728 maio/jun., 2001.

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

BOROS, D. L.; WHITFIELD, J. Endogenous IL-10 relates IFN- γ and IL-5 cytokine production induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 94, n.4, p. 481-487, ago., 1998.

BRASIL. Secretaria de Executiva. Departamento de Informática do SUS. **Esquistossomose**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>> Acesso em: 8 mar. 2007.

BRUNET, L. R.. et al. Nitric oxide and the th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. **The Journal of Immunology**, Baltimore, n. 163, p. 4976-4977, nov., 1999.

CHEEVER, A. W et al. Anti-IL-4 treatment of *Schistosoma mansoni*-infected mice inhibits development of T cells and non-B, non-T cells expressing Th2 cytokines while decreasing egg-induced hepatic fibrosis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 153, n. 2, p. 753-759, jul., 1994.

CARVALHO, E. M.; ANDRADE, Z. A. Imunopatologia da Esquistossomose. In: **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Volume 1, 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. 2025p. p. 947-958.

COUTINHO, E. M. Estado nutricional e esquistossomose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v.13, n.1/6, p. 91-96, 1979.

COUTINHO, E. M. et al. Nutrition and acute schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, n. 87, p. 297-301, 1992a.

COUTINHO, E. M.; FREITAS, L. P. C. G.; ABATH, F. G. C. The influence of the regional basic diet from Northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, n. 25, p. 13 – 20, jan./mar. 1992b.

COUTINHO, E. M et al. Pathogenesis of schistosomal pipestem fibrosis in mice. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, n. 78, p. 337-342, out. 1997.

COUTINHO, E. M. et al, Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 98, p. 919-925, out., 2003.

COUTINHO, E. M. Malnutrition and Hepatic Fibrosis in Murine Schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 85-92, out. 2004.

DE WITT, W. B. Experimental schistosomiasis mansoni in mice maintained on nutritionally deficient diet. II. Survival and development of *Schistosoma mansoni* in mice maintained on a Torula yeast diet deficient in factor 3, vitamine E and cystine. **The Journal of Parasitology**, Washington, v. 42, p. 129-135, 1957.

DUVAL, R. H; DE WITT, W. Na improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 16, p. 483-486, 1967.

FALLON, P. G. et al Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. **Journal of Immunology**, Baltimore, n. 164, p. 2585-2591, mar., 2000.

FAVRE, T. C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 569-576, nov./dez., 2001.

[FLORES-VILLANUEVA, P. O. et al.](#) Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 156, n. 9, p. 3315-3320, maio 1996.

GIBBONS, A. Researchers fret over neglect of 600 million patients. *Science*, **Washington**, v. 256, n. 5060, p. 1135-1140, maio 1992

GRYZCH, J. M. et al. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine *Schistosomiasis mansoni*. **The Journal of Immunology**, Baltimore, n. 146, p. 1322-1327, fev. 1991.

HESSE, M et al. NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and Antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 157, n. 3, p. 945-955, set. 2000.

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

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

JANKOVIC, D. 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**, New York, n. 187, p. 619-629, fev. 1998.

KATZ, N; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 303-308, maio/jun. 2000.

HOFFMANN, K. F; CHEEVER, A. W; WYNN, T. A. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses incuse distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, n. 164, p. 6406-6116, jun., 2000.

HOFFMANN, K. F; WYNN, T. A; DUNNE D. W. Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopatology. **Advances in Parasitology**, London, n. 52, p. 265-307, 2002.

LACAZ, C. S, MENDES, E, AMATO NETO, V. **Imunopatologia Tropical**. Rio de Janeiro: Atheneu, 1969, p 123-134.

LYONS, C. R. The role os nitric oxide in inflammation. **Advances in Immunology**. New York, n.60, p. 323-371, 1995.

MAGALHÃES, L. A et al. Esquistossomose mansônica em camundongos experimental subnutridos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, n. 20, p. 362-368, 1986.

MASON, J. B; MUSGROVE, P; HABICHT J. P. At least one-third of poor countries diseases burden is due to malnutrition. Working Paper n. 1, **Disease Control Priorities Project**, Bethesda, Maryland; Fogarty International Center, National Institutes of Health, 2003

MELO, R. R. Introdução. In:_____ **Prevalência da esquistossomose em pacientes atendidos pelo PCE (Programa de Controle da Esquistossomose) na cidade de Aliança – PE (Período de janeiro a outubro de 2005)**. 2006. Monografia (Bacharelado em Biomedicina) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

MEIRA, D. A. Interaction of infection, nutrition and immunity. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, n. 28, p. 315 – 319, 1995.

MICHEL, T; FERON, O. Nitric oxide synthases: which, where, how and why? **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, n. 100, p. 2146-2152, 1997.

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

NEVES, D. P. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494 p

OLIVEIRA, S. A. *et al.* Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research.**, Berlin, v. 93, p. 30- 35, mar 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Schistosomiasis**. Fact Sheet nº 115, may 2000. Disponível em: <<http://www.who.int/ctd/schisto/index.html>>. Acesso em 8 mar. 2007.

PARISE FILHO, R; SILVEIRA, M. A. B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 123-135, maio/ago. 2001.

PATTON, E. A *et al.* Severe schistosomiasis in the absence of interleukin-4 (IL-4) Is IL-12 independent. **Infection and Immunity**, Washington, v. 69, n. 1, p. 589-592, jan. 2001.

PATTON, E. A *et al.* Central role for Interleukin-4 regulating nitric oxide-mediated inhibition of T-Cell proliferation in Schistosomiasis. **Infection and Immunity**, Washington, v. 70 n. 1, p. 177-194, jan. 2002.

PEARCE, E. J *et al.* Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a helminth, *Schistosoma mansoni*. **Journal of Experimental Medicine**, New York, n. 173, p. 159-166, jan. 1991.

PEARCE, E. J; MACDONALD, A. S. The immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews-Immunology**, London, v. 7, n.2, p. 499-511, jul. 2002.

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

[RAMASWAMY, K; He Y. X; SALAFSKY, B.](#) ICAM-1 and iNOS expression increased in the skin of mice after vaccination with gamma-irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, New York, v. 86, n. 2, p. 118-132, jun. 1997.

RESENDES, A. P. C.*et al.* Hospitalization and mortality from mansoni schistosomiasis in the State of Pernambuco, Brazil, 1992/2000. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.21, n.5, p.1392-1401, set./out. 2005.

REY, L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomíase: O Parasito. In: **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 856 p. p. 413-425

RIBEIRO DE JESUS, A et al. Human immune responses to *Schistosoma mansoni*: vaccine candidate antigens. **Infection and Immunity**, Washington, n. 68, 2757-2803, mai, 2000.

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

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

SHER, A. R. et al. Ablation of eosinophil and IgE responses with anti-IL-5 or anti-IL-4 antibodies fails to affect immunity against *Schistosoma mansoni* in the mouse. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 145, n. 11, p. 3911-3916, dez. 1990.

SILVA, L. M et al. Significance of schistosomal granuloma modulation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 353-361, maio/jun. 2000.

SORNASSE, T et al. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naïve human neonatal CD4⁺ T cells, analyzed at the single-cell level. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 184 n. 2, p. 473-483, ago. 1996.

STADECKER, M. J. The regulatory role of the antigen-presenting cell in the development of hepatic immunopathology during infection with *Schistosoma mansoni*. **Pathobiology : journal of immunopathology, molecular and cellular biology**, New York, n. 67, p. 269-272, 1999.

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

WARREN, K. S; DOMINGO, E. O; COWAN, R. B. T. Granuloma formation around schistosome egg as manifestation of delayed hypersensitivity. **The American Journal of Pathology**, Bethesda, v. 51, p. 735-756, nov. 1967.

WEIBEL, E. R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. **Laboratory Investigation**, Baltimore, v. 12, p. 131, 1963.

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

ANEXO



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO

Certificamos que o Programa nº **P.0201/03**, intitulado “**Infecção esquistossomótica aguda: produção de citocinas em camundongos desnutridos e deficientes em iNOS**” sob a responsabilidade da **Dra. Silvia Maria Lucena Montenegro – CPqAM - Fiocruz**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA - FIOCRUZ) em 01/09/05. Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade 01 de setembro de 2009.

Rio de Janeiro, 01 de setembro de 2005.

Dr. Hugo Caire Castro Faria Neto

Coordenador da CEUA-FIOCRUZ

APÊNDICE

Preliminary results on interleukin-4 and interleukin-10 cytokine production in malnourished, inducible nitric oxide synthase-deficient mice with schistosomiasis mansoni infection

Renata P Ramos/⁺⁺⁺, Vladia MA Costa*, Camila F Melo/⁺⁺⁺, Valdênia MO Souza*, Elizabeth Malagueño*, Eridan M Coutinho, Frederico G C Abath/⁺⁺, Silvia ML Montenegro/^{+/++}

Departamento de Imunologia, Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- Fiocruz, Av. Prof. Moraes Rego s/nº, Cidade Universitária, 52020-020 Recife, PE, Brasil
*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, UFPE, Recife, PE, Brasil

Schistosoma mansoni infected C57Bl/6 inducible nitric oxide synthase (iNOS)-deficient and non-deficient malnourished mice, both fed a balanced controlled diet were studied. Interleukins, IL-4 and IL-10 responses to soluble egg antigens (SEA) 90 days after infection, were determined. Our results suggest that in iNOS deficient, malnourished mice, 90 days after of infection, nitric oxide has a downregulating effect on IL-4 and IL-10 production. We are currently investigating the biological significance of these findings.

Key words: *Schistosoma mansoni* - cytokines - malnutrition - mice

In Northeastern Brazil, a large number of people infected with *Schistosoma mansoni* suffer from malnutrition. The mouse model is appropriate to investigate aspects relating to the pathogenesis of the association of schistosomiasis and malnutrition about which little is known (Coutinho et al. 1992).

The inhibition of iNOS (inducible nitric oxide synthase), the enzyme responsible for the formation of nitric oxide (NO), resulted in cachexia and exacerbated hepatic pathology, suggesting that, in schistosomiasis NO limits hepatocyte damage (Brunet et al. 1999, Abath et al. 2006). However, another group (Patton et al. 2002) observed that infected wild mice developed a Th2 profile response and chronic liver disease, while the interleukin (IL-4) deficient mice developed a Th1 profile response with high levels of NO and interferon (IFN- γ) and an acute lethal syndrome deriving from the absence of the Th2 response and well-structured granuloma. This study presents preliminary results on the production of IL-4 and IL-10 in mice deficient in the production of nitric oxide synthase (KOiNOS) and in control C57BL/6 wild type (WT) mice, subjected to hypoproteic diets (Region Basic Diet-RBD) or a normal diet and infected or not with *S. mansoni*, in an effort to correlate the production of these cytokines with the function of NO.

Male 21-day old C57BL/6 mice, deficient in iNOS (KOiNOS) were used along with control mice. The mice were obtained from Fiocruz and kept in the CPqAM animal facilities. All the procedures involving the mice were approved by ethical committees for the use of animals (CEUA/Fiocruz, P0201/03). A *S. mansoni* strain isolated from Belo Horizonte (BH) and kept in our laboratory was used. Mice were infected percutaneously with 30 cercariae shed from *Biomphalaria glabrata*. Malnutrition was induced by administering a RBD diet, based on the dietary standards of the human population in areas where schistosomiasis is endemic in the Northeast (Coutinho et al. 1992). The KOiNOS group was subdivided into infected malnourished (KOiNOS IM), n = 10, and infected eutrophic mice (KOiNOS IE), n = 10. The WT group was likewise subdivided into: infected malnourished (WT IM), n = 10, and infected eutrophic (WT IE), n = 10. After 90 days of infection, the mice were anaesthetized and sacrificed and their spleens were removed and processed. The spleen cells obtained from a pool of three mice per group were cultivated in RPMI 1640 containing 10% FCS (fetal calf serum), and stimulated by SEA (soluble egg antigens) at a concentration of 20 $\mu\text{g/ml}$ or phorbol myristate acetate (PMA)/ionomycin (20 $\mu\text{g/ml}$), for 48 h, at 37°C under 5% CO₂ and the supernatants were collected for quantification of IL-4 and IL-10, using the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Statistical significance was determined using Student's two-tailed *t* test and significance was assumed for a *p* value < 0.05.

iNOS is present in virtually all cells, and is expressed in response to proinflammatory cytokines, such as IFN- γ , tumor necrosis factor (TNF- α) and IL-1 β , resulting in the prolonged production of large amounts of NO (Brunet et al. 1999). In contrast, IL-4 can inhibit NO production by upregulating arginase expression thereby providing an alternative pathway for metabolism of L-arginine, the precursor for NO (Patton et al. 2002). On the other hand, the

Financial support: Capes, Fapece, Fiocruz

⁺Corresponding author: silvia@cpqam.fiocruz.br

⁺⁺CNPq research scholarships

⁺⁺⁺Capes fellowship

⁺⁺⁺⁺Pibic/Fiocruz fellowship

Received 25 May 2006

Accepted 26 June 2006

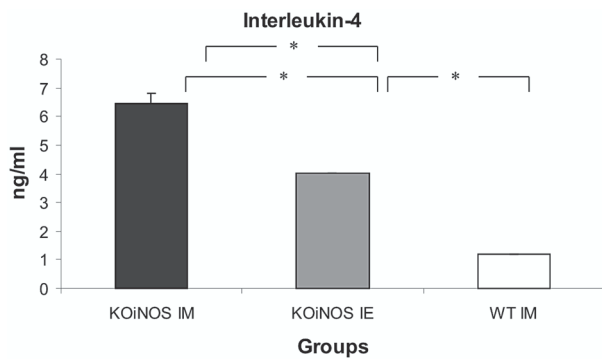


Fig. 1: interleukin-4 (ng/ml) levels in spleen cells from inducible nitric oxide synthase deficient infected malnourished mice (KO*i*NOS IM), inducible nitric oxide synthase deficient infected eutrophic mice (KO*i*NOS IE) and wild type infected malnourished mice (WT IM) 90 days after *Schistosoma mansoni* infection. Spleen cells were stimulated with soluble egg antigens; * $p < 0.05$.

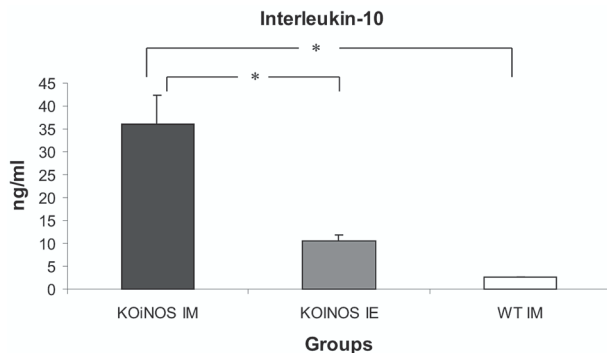


Fig. 2: interleukin-10 (ng/ml) levels in spleen cells from inducible nitric oxide synthase deficient infected malnourished mice (KO*i*NOS IM), inducible nitric oxide synthase deficient infected eutrophic mice (KO*i*NOS IE) and wild type malnourished infected mice (WT IM) 90 days after *Schistosoma mansoni* infection. Spleen cells were stimulated with soluble egg antigens; * $p < 0.05$.

effects of iNOS on cytokine production is less clear. In the present communication, the effects of disruption of the gene encoding iNOS on cytokine production was investigated in eutrophic or malnourished *S. mansoni* infected mice.

The mice from the KO*i*NOS IM group, after 90 days of infection, produced more IL-4 and IL-10 than the KO*i*NOS IE group ($p < 0.05$). Comparing the KO*i*NOS IM group with the WT IM group, over the same period, the levels of IL-4 and IL-10 were lower in the WT IM group ($p < 0.05$, Figs 1, 2). Although there have been several reports demonstrating that NO is capable of inhibiting cytokine production by T cells (Patton et al. 2002), the effects on selective Th1 or Th2 responses is still contradictory. Our results suggest that both iNOS deficiency and malnutrition enhance the Th2 response, possibly by down-regulating Th1 cytokines. Furthermore, it seems that these situations (iNOS deficiency and malnutrition) act synergistically.

In order to analyze if the diet and the presence of NO enhance the production of IL-10 and IL-4 cytokines, we are repeating the experiment and increasing the number of animals per group to obtain more significant values and comparisons. In addition, we are currently investigating the biological consequences of these findings for granuloma formation and pathology.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Luiz Carlos Figueiredo and Wladimir Gomes de Melo for technical support.

REFERENCES

- Abath FGC, Morais CNL, Montenegro CEL, Wynn TA, Montenegro SML 2006. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol* 2: 85-91.
- Brunet LR, Beall M, Dunne DW, Pearce EJ 1999. Nitric oxide and the Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. *J Immunol* 163: 4976-4977.
- Coutinho EM, Freitas LPCG, Abath FGC 1992. The influence of the regional basic diet from Northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop* 25: 13-20.
- Patton EA, La Flamme AC, Pedras-Vasconcelos JA, Pearce EJ 2002. Central role for interleukin-4 regulating nitric oxide-mediated inhibition of T-cell proliferation in schistosomiasis. *Infect Immun* 70: 177-194.