

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
DOUTORADO EM SAÚDE PÚBLICA

ANDRÉIA FERREIRA DE BARROS

FIBROGÊNESE HEPÁTICA EM MODELO EXPERIMENTAL DE
ESQUISTOSSOMIASE MANSÔNICA ASSOCIADA A DESNUTRIÇÃO

RECIFE
2013

ANDRÉIA FERREIRA DE BARROS

**FIBROGÊNESE HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA
ASSOCIADA À DESNUTRIÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Orientadoras:

Dra. Eridan de Medeiros Coutinho

Dra. Sheilla Andrade de Oliveira

Dra. Vláudia Maria de Assis Costa

RECIFE

2013

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

B268f Barros, Andréia Ferreira de.
Fibrogênese hepática em modelo experimental de esquistossomíase mansônica associada a desnutrição / Andréia Ferreira de Barros. - Recife: s.n, 2013.
102 p.: ilus., graf., tab.

Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

Orientadoras: Eridan de Medeiros Coutinho, Sheilla Andrade de Oliveira, Vladia Maria de Assis de Costa.

1. Esquistossomose mansoni - imunologia. 2. Esquistossomose mansoni - patologia. 3. Esquistossomose mansoni - parasitologia. 4. Fibrose Hepática -. patologia. 5. Fibrose Hepática – parasitologia. 6. Fibrose Hepática – imunologia. 7. Citocinas – secreção. 8. Desnutrição Proteico-Calórica – imunologia. 9. Desnutrição Proteico-Calórica – patologia. 10. Desnutrição Proteico-Calórica - parasitologia. I. Coutinho, Eridan de Medeiros. II. Oliveira, Sheilla Andrade de. III. Costa, Vladia Maria de Assis de. IV. Título.

CDU 616.36-002

ANDRÉIA FERREIRA DE BARROS

**FIBROGÊNESE HEPÁTICA NA ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA
ASSOCIADA À DESNUTRIÇÃO EM MODELO EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovada em: 04/07/2013

BANCA EXAMINADORA

Dra. Eridan de Medeiros Coutinho
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Dra. Constança Clara Gayoso Simões Barbosa
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Dr. Sival Brandão Filho
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Dra. Virginia Maria Barros de Lorena
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz

Dra. Joelma Rodrigues de Souza
Universidade Federal da Paraíba/UFPB

À razão da minha existência, minha família
À minha vizinha Maria Lima (*in memoriam*), pelo exemplo de ser humano.
Aos meus pais, Cícera Barros e Valdemir Barros,
pelo amor, formação moral e incentivo constante.
Aos meus irmãos, Adriana Barros e Dayvson Barros,
sinônimos de amor cada um ao seu modo.
Ao meu sobrinho David Barros,
pela alegria que me proporciona através da sua existência.
Ao meu noivo, Marcos Roberto,
pela paciência, dedicação e amor;
A todos os meus amigos, principalmente, Roni Evêncio de Araújo,
sinônimo de amizade verdadeira, lealdade, dedicação, ajuda e incentivo constante.

AGRADECIMENTOS

A Fundação Oswaldo Cruz; ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; ao Biotério Experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães; aos Bibliotecários e à coordenação do curso de Doutorado em Saúde Pública; ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA); ao Departamento de Nutrição da UFPE.

A Deus por tudo que tem realizado em minha vida, por tudo que ainda fará, e por sua grandiosa presença que me acompanha em todos os momentos.

Aos meus pais, Valdemir e Cícera Barros, por todo amor, dedicação e grandes sacrifícios que possibilitaram abertura de todas as oportunidades de um futuro promissor. Mãe, muito obrigada por tantas vezes que abdicastes dos teus sonhos para realizar os meus e abristes mão das tuas vontades para atender minhas necessidades.

Aos meus irmãos Adriana Barros e Dayvson Barros, por terem me apoiado, cada um ao seu modo, com muito carinho para a conclusão desse sonho acadêmico.

Ao meu pequeno príncipe, David Barros, por ter proporcionado força em vários momentos de fraqueza e desânimo, devido a sua contagiante alegria. Por isso, sou a Titia mais feliz do mundo.

Ao meu noivo, Marcos Roberto, pelo amor e compreensão, pela tranquilidade que me proporcionou nos momentos mais difíceis dessa longa caminhada. Seu apoio as minhas decisões foi de fundamental importância.

Ao meu grande irmão/amigo Roni Evêncio que com muita dedicação, paciência e lealdade me ajudou a concretizar cada etapa da minha vida acadêmica, profissional e pessoal.

A minha amiga/irmã Fabiana Letícia que incondicionalmente me apoiou em cada momento no decorrer da minha vida acadêmica, profissional e pessoal.

A Luciana Macêdo uma amiga/irmã que desde a graduação na UFRPE até os dias atuais compartilha de todos os meus anseios e felicidades.

Em especial agradeço minha orientadora Dra. Eridan Continho que desde a minha iniciação científica foi uma excelente mentora, estando sempre presente, esclarecendo minhas dúvidas e inquietações para a conclusão do Doutorado, com

muita competência, ética e responsabilidade. Além disso, agradeço pela amizade que construímos ao longo dessa convivência.

A minha co-orientadora Dra. Sheilla Andrade de Oliveira pelos conselhos, ensinamentos e oportunidades acadêmicas oferecidas durante o processo de doutoramento.

A minha co-orientadora Dra. Vláudia Costa pela paciência e oportunidade na troca de conhecimentos proporcionados na área imunologia e por acreditar no meu potencial acadêmico.

A Cláudia Lopes Cavalcanti, pelo acolhimento, cuidado, companheirismo e por todos os ensinamentos desde a minha iniciação científica até o doutorado na área de bioterismo e confecção da Dieta Básica Regional.

Agradeço a Sr. Paulino (*IN MEMORIAM*) do departamento de Nutrição da UFPE por toda sua colaboração na confecção da Dieta Básica Regional.

Aos técnicos Wladimir Melo e Mineo Nakazawa pela disponibilidade ao longo dessa trajetória acadêmica.

Aos meus amigos do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, Veruska Souza, Jamerson Oliveira, Anekecia Lauro, Edna Santiago e Antônio Sergio que com muita dedicação colaboraram para realização desse doutorado.

As iniciações científicas Caroline Guimarães e Leyllane Moreira, pelo carinho, dedicação e empenho para conclusão desse doutorado.

Em especial agradeço a minha amiga Camila Carvalho por sua dedicação e lealdade colaboração de forma imensurável na execução de várias etapas desse projeto.

A Professora Maria do Carmo (Nena) por sua generosidade exemplificada na concessão de reagentes fundamentais ao meu doutorado e a minha vida acadêmica.

Ao pesquisador Roberto Werkhäuser pelas orientações na vida pessoal e acadêmica.

As pesquisadoras e amigas, Dra. Virginia Lorena e Dra. Joelma Souza, pelos inúmeros esclarecimentos em imunologia, como também pelo acolhimento nos momentos difíceis e por terem compartilhado os vários momentos de conquistas.

Aos meus colegas da turma de Doutorado 2009-2013 do CPqAM-FIOCRUZ que compartilharam saberes e muitas felicidades.

A Graça Ferreira e Carmen Magalhães que me ajudaram na confecção da Dieta Básica Regional, como também a equipe de segurança que tiveram o todo cuidado com a minha proteção pessoal.

Ao Dr. Carlos Gustavo pela amizade e seu apoio no desenvolvimento dessa tese.

A toda comunidade do CPqAM/Fiocruz e a todos do Departamento de Imunologia, e em especial o Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular que colaboraram para a realização dessa Tese.

E todos que se disponibilizaram direta ou indiretamente para o desenvolvimento desse grande sonho, a obtenção do título de Doutorado.

A Todos concedo a co-autoria por essa conquista!!!

*“Entrega teu caminho ao Senhor;
confia Nele e Ele tudo fará.”*

(Salmo 37; v. 5)

*“Sem a curiosidade que me move, que me inquieta, que me insere na busca, não
aprendo nem ensino”.*

(Paulo Freire)

*“A Luta está difícil, mas não posso desistir.
Depois da tempestade, flores voltam a surgir
Mas quando a tempestade demora a passar
A vida até parece fora do lugar
Não perca a fé em Deus
Fé em Deus que tudo irá se acertar
Pois o sol de um novo dia vai brilhar
E essa luz vai refletir na nossa estrada
Clareando de uma vez a caminhada
que nos levará direto ao apogeu
Tenha fé, nunca perca a fé em Deus!”*

(Flavinho Silva e Flavio Venutes)

BARROS, Andréia Ferreira. **Fibrogênese hepática na esquistossomiase mansônica associada à desnutrição em modelo experimental**. 2013. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

RESUMO

Doenças hepáticas crônicas fibrosantes representam grave problema de saúde pública. Nelas pode ocorrer excessiva deposição de matriz extracelular. No caso da esquistossomiase mansônica, o agente causal são os ovos do parasito. Nas endêmicas, é freqüente a ocorrência de desnutrição associada à infecção de populações humanas pelo *Schistosoma mansoni*. O objetivo foi investigar no modelo experimental murino, as repercussões da desnutrição sobre a biologia do hospedeiro e do parasito e suas relações com a fibrogênese hepática. Metodologia: curvas ponderais do hospedeiro, carga parasitária, maturação e viabilidade dos ovos de *S. mansoni*, morfologia e morfometria hepática, produção de colágeno I, imunomarcagem de α -SMA, níveis de produção de TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17 e IL-23. Quatro grupos de camundongos foram utilizados. Resultados - As curvas ponderais foram significativamente inferiores nos desnutridos, independentemente da infecção. A quantidade de colágeno e a imunomarcagem para colágeno I foram significativamente inferiores no grupo desnutrido infectado, em relação ao grupo eutrófico. Imunomarcagem para α -SMA foi equivalente, nos desnutridos e eutróficos com infecção. A produção das citocinas TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17 e IL-23, bem como a de MMP-9 e TIMP-1 também foi significativamente menor no grupo desnutrido infectado, em relação ao grupo eutrófico. Conclusão: A associação mórbida esquistossomiase/desnutrição influenciou, negativamente, a fibrogênese hepática, com acentuada redução da síntese de colágeno I, das citocinas TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17 e IL-23, bem como baixa produção de MMP-9 e TIMP-1, moduladores da deposição de MEC. A incapacidade de camundongos desnutridos para desenvolverem a fibrose periportal esquistossomótica, pode ser explicada por alterações da fibrogênese, que guardaram relação com a reduzida síntese de colágeno e com a deficiente produção de importantes citocinas pró-fibrogênicas sobretudo TGF- β 1 e IL-13 e outras alterações, estas dependentes do estado de má-nutrição do hospedeiro, induzido pela deficiência dietética de proteína.

Palavras-chaves: Esquistossomiase mansônica experimental. Fibrogênese hepática. Citocinas. Desnutrição.

BARROS, Andréia Ferreira. **Hepatic fibrogenesis in schistosomiasis mansoni associated with malnutrition in experimental model**. 2013. Thesis (Doctorate of Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

ABSTRACT

Chronic fibrous liver diseases are an important public health problem. They can be due to different etiologies, including parasites, and are characterized by an excessive deposition of extracellular matrix. Manson's schistosomiasis, its etiology is linked to the parasite eggs. In endemic areas, undernutrition and schistosomiasis are frequently associated in human populations. Objective: Investigation aimed to study the effects of undernutrition on the host and parasite biology and their relationships with liver fibrogenesis using the mouse as experimental model, as well as to explain the cause of the hepatic schistosomiasis periportal fibrosis detected in well-fed animals but not develop in deficient mice. Methodology: evaluation of weight curves, parasites load, maturation and viability of *S. mansoni* eggs, hepatic morphology, morphometry, production of collagen I, counting of activated hepatic stellate cells, levels of TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17 and IL-23. Four mice groups. Results: Weight curves were significantly lower in the undernourished mice, regardless the infection. Amount of collagen was significantly lower in undernourished infected mice, as compared to well nourished animals. Immune marking for α -SMA was equivalent in undernourished and well nourished infected mice. There was a significant decreased synthesis of TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17, IL-23, and MMP-9, TIMP-1 in the undernourished infected animals. Conclusion: Morbid association between undernutrition and schistosomiasis mansoni had a negative influence on the host biology and on the hepatic fibrogenesis, showing a drastic reduction in the synthesis of collagen, of the TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17, IL-23, as well MMP-9 and TIMP-1. So, the inability of undernourished infected mice to develop the periportal type of fibrosis seen in schistosomiasis "pipestem", may be due to an alteration in hepatic fibrogenesis related to dietetic protein deficiency, leading to a decreased synthesis of collagen and of several cytokines, mainly TGF- β 1 and IL-13, in deficient mice.

Key words: Experimental Manson's schistosomiasis. Liver fibrogenesis. Cytokines. Undernutrition.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Curvas ponderais dos grupos eutróficos e desnutridos infectados pelo <i>Schistosoma mansoni</i> e seus respectivos controles (não infectados), nas fases aguda (A) e crônica (B) da parasitose	53
Figura 2 -	Parasitas recuperados por perfusão do sistema porta-mesentérico, em camundongos desnutridos e eutróficos, infectados pelo <i>S. mansoni</i> , nas fases aguda (FA) e crônica (FC)	54
Figura 3 -	Quantidade de ovos encontrados no fígado e intestino de camundongos infectados com <i>S.mansoni</i> , nas fases aguda (A) e crônica (B)	55
Figura 4 -	Percentual de ovos de <i>S.mansoni</i> no intestino de camundongos desnutridos (DI) e eutróficos (EI), em relação à sua viabilidade e estágio de maturação, nas fases aguda (A) e crônica (B) da parasitose	56
Figura 5 -	Histopatologia hepática	58
Figura 6 -	Quantificação bioquímica do colágeno hepático nas fases aguda (FA) e crônica (FC) da esquistossomíase mansônica	59
Figura 7 -	Quantificação morfométrica do colágeno hepático e outros parâmetros em camundongos desnutridos (DI) ou eutróficos (EI), nas fases aguda (FA) e crônica (FC) da esquistossomíase mansônica	60
Figura 8	Imunomarcção por Alexa fluor 488 para colágeno I (verde), no fígado de camundongos cronicamente infectados por <i>S. mansoni</i> , pela técnica da imunofluorescência indireta	62

Figura 9 -	Percentual de área com imunomarcção positiva para colágeno tipo I, na fase crônica da infecção por <i>S. mansoni</i> , em fígado de camundongos eutróficos ou desnutridos e seus respectivos controles	62
Figura 10 -	Imunomarcção por Alexa-fluor 647 para alfa-actina de músculo liso (α -SMA), em miofibroblastos (vermelho) e paredes vasculares, no fígado de camundongos cronicamente infectados pelo <i>S.mansoni</i>	64
Figura 11 -	Percentual de imunomarcção positiva para α -SMA em células estreladas ativadas (miofibroblastos), nas fases aguda e crônica da infecção por <i>S. mansoni</i> , em camundongos eutróficos e/ou desnutridos e seus respectivos controles	65
Figura 12 -	Níveis de metaloproteinase 9 (MMP-9), após 72h, no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e/ou eutróficos (EI), infectados pelo <i>S. mansoni</i> , nas fases aguda (FA) e crônica (FC) ..	66
Figura 13 -	Níveis de produção, após 72h, do inibidor de metaloproteinase TIMP-1, detectados no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos isogênicos C57BL/6, desnutridos (DI) e/ou eutróficos (EI) infectados pelo <i>S. mansoni</i> , nas fases aguda (FA) e crônica (FC)	67
Figura 14 -	Níveis de produção, após 24h, do fator de transformação do crescimento (TGF- β 1) detectados no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e/ou eutróficos (EI), infectados pelo <i>S. mansoni</i> , nas fases aguda (FA) e crônica (FC)	68
Figura 15 -	Níveis de produção, após 72h, das interleucinas 4, 13, 17 e 23,	

detectados no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e/ou eutróficos (EI), infectados pelo *S. mansoni*, nas fases aguda (FA) e crônica (FC)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CD25+	Célula T regulatória 25
CD4+	Célula T regulatória 4
CEUA	Comissão Ética no Uso de Animais
ConA	Concavalina A
CTGF	Fator de crescimento de tecido conectivo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DBR	Dieta Básica Regional
DI	Desnutrido infectado
DNI	Desnutrido não infectado
EI	Eutófico infectado
ENI	Eutrófico não infectado
FA	Fase aguda
FC	Fase crônica
FoxP3	Fator transcrição nuclear
GFAP	Ácido glial fibrilar
HE	Hematoxilina Eosina
HSCs	Células estreladas hepáticas
IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG1	Imunoglobulina 1
IgG2a	Imunoglobulina 2 ^a
IgG2b	Imunoglobulina 2b
IgG3	Imunoglobulina 3
IL	Interleucina
MEC	Matriz extra celular
MMPs	Metaloproteinases
nm	Nanômetro
SBF	Soro Bovino Fetal
SEA	Antígeno solúvel ovular
TGF β	Fator de transformação do crescimento
Th	T helper

TIMPs	Inibidores de metaloproteinases
TNF- α	Fator de necrose tumoral
α -SMA	Alfa acitina de músculo liso

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	22
2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS GERAIS: ESQUISTOSSOMIASE MANSÔNICA	22
2.2 PATOLOGIA GERAL DA ESQUISTOSSOMÍASE E PATOGÊNESE DAS FIBROSES HEPÁTICAS (GRANULOMATOSA E PERIportal)	25
2.3 IMUNOPATOLOGIA DA FIBROSE HEPÁTICA ESQUISTOSSOMÓTICA ...	26
2.3.1 PAPEL DAS CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS (HSCs)	26
2.3.2 PAPEL DAS CITOCINAS TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17 E IL-23	29
2.3.3 PAPEL DOS AGENTES REGULADORES DA SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC): METALOPROTEINASES (MMPS) E INIBIDORES TECIDUAIS DAS METALOPROTEÍNASES (TIMPS)	29
2.4 DESNUTRIÇÃO PROTÉICO - CALÓRICA E FIBROSE HEPÁTICA ESQUISTOSSOMÓTICA	32
2.5 O MODELO EXPERIMENTAL MURINO NO ESTUDO DA ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA	34
3 JUSTIFICATIVA	37
4 PERGUNTA CONDUTORA	39
5 OBJETIVOS	40
5.1 OBJETIVO GERAL	41
5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
6 METODOLOGIA	41
6.1 ANIMAIS	42
6.2 DESENHO EXPERIMENTAL	42
6.3 DIETAS	42

6.4 ESTADO NUTRICIONAL DOS ANIMAIS	43
6.5 INFECÇÃO DOS ANIMAIS	43
6.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS	44
6.7 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA	44
6.7.1 COLETA E QUANTIFICAÇÃO DOS PARASITOS DE <i>S. mansoni</i>	44
6.7.2 CONTAGEM DE OVOS DE <i>S. mansoni</i> EM AMOSTRAS DE FÍGADO E INTESTINO	45
6.7.3 OOGRAMA	45
6.8 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	46
6.8.1 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	46
6.9 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO HEPÁTICO	46
6.9.1 ESTUDO BIOQUÍMICO	46
6.9.2 ESTUDO MORFOMÉTRICO	47
6.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA (ESTUDO DO COLÁGENO TIPO I E DAS CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS)	48
6.11 RESPOSTA IMUNE CELULAR	49
6.11.1 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE OVO (SEA)	49
6.11.2 CULTURA DE ESPLÊNOCITOS	50
6.11.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17, IL-23 DA METALOPROTEINASE MMP-9 E DO SEU INIBIDOR TIMP -1	51
6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
7 RESULTADOS	52
7.1 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DOS ANIMAIS (FASES AGUDA E CRÔNICA)	52
7.2 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA	53
7.2.1 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE PARASITOS	53
7.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE OVOS DE <i>S. mansoni</i> NO FÍGADO E INTESTINO	54
7.2.3 OOGRAMA	55
7.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	56
7.4 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO HEPÁTICO	58
7.4.1 QUANTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	58
7.4.2 QUANTIFICAÇÃO MORFOMÉTRICA	59

7.4.1 QUANTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA	58
7.4.2 QUANTIFICAÇÃO MORFOMÉTRICA	59
7.4.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA COLÁGENO TIPO I	61
7.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS (HSCs)	63
7.6 RESPOSTA IMUNE CELULAR	65
7.6.1 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE MMP-9, TIMP-1, TGFB1, IL-4, IL-13, IL- 17 E IL-23	65
7.6.2 PRODUÇÃO DA ENZIMA DA MATRIZ EXTRACELULAR METALOPROTEINASE 9 (MMP-9)	66
7.6.3 PRODUÇÃO DO INIBIDOR DE METALOPROTEINASE TIMP-1.....	67
7.6.4 PRODUÇÃO DA CITOCINA TGF- β 1 (FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO β 1)	67
7.6.5 PRODUÇÃO DAS INTERLEUCINAS: IL-4, IL-13, IL-17 e IL-23	68
8 DISCUSSÃO	70
9 CONCLUSÕES	75
REFERENCIAS	76
APÊNDICE A – Artigo aceito	92
ANEXO A – Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais	102

1 INTRODUÇÃO

A associação entre estado nutricional do hospedeiro e infecção pelo *Schistosoma mansoni* tem sido foco de diversos estudos (COUTINHO et al., 1997a; 2003, 2007, 2010; COUTINHO; FREITAS; ABATH, 1992). Aspectos clínicos, antropométricos, anatômico - patológicos e imunológicos relacionados com essa associação mórbida vêm sendo avaliados, tanto em seres humanos quanto em hospedeiros experimentais, particularmente na forma grave hepato-esplênica da parasitose.

Na infecção experimental pelo *S. mansoni*, camundongos submetidos a baixa carga parasitária desenvolvem, durante a fase crônica, dois quadros anatomopatológicos distintos: o primeiro representado por granulomas isolados, dispersos no parênquima; e o segundo pela presença de fibrose hepática periportal. Este último apresenta semelhanças com a fibrose “*pipestem*” humana (ANDRADE; CHEEVER, 1993; ANDRADE; WARREN, 1964; WARREN, 1966).

No camundongo e no homem, a fibrose hepática decorre da deposição maciça de ovos viáveis de *S. mansoni*, com formação de granulomas ao longo das veias periportais intra-hepáticas e obstruções vasculares destrutivas e obstrutivas (ANDRADE, 1987; BOGLIOLO, 1957). Este processo ocorre porque os ovos dos parasitos produzem potentes estímulos fibrogênicos, ativando células inflamatórias e residentes, que liberam citocinas pró-fibróticas, a exemplo do fator de transformação do crescimento (TGF- β 1), e das interleucinas IL 4, 13, 17 e outras proteínas que regulam a resposta inflamatória e estimulam a ativação das células estreladas hepáticas -HSCs (FRIEDMAN, 2008a, 2008b, 2010; HERNANDEZ-GEA; FRIEDMAN, 2011; GRESSNER et al., 2002). Uma vez estimuladas, essas células assumem fenótipo de miofibroblasto, passando a expressar filamentos intermediários de alfa actina de músculo liso (α -SMA), e a secretar componentes da matriz extracelular (MEC), principalmente colágeno tipo I (FRIEDMAN, 2008a, 2013). A estabilidade da produção de elementos constituintes da MEC é, então, regulada pelas metaloproteinases (MMPs) e por seus inibidores (TIMPs) (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002; HEMMANN et al., 2007; HERNANDEZ-GEA et al., 2013; STERNLICHT; WERB, 2001).

Estudos experimentais sobre as inter-relações entre esquistossomíase e estado nutricional do hospedeiro têm demonstrado que a desnutrição protéico-calórica associada à infecção por *S. mansoni* leva à formação de granulomas periovulares hiporreativos e de pequena dimensão, com reduzida formação de tecido fibroso, não sendo observado o desenvolvimento da fibrose hepática do tipo periportal (BARROS, 2008; COUTINHO et al., 1997a, 2003). A lesão é habitualmente encontrada em cerca de 30-50% dos animais alimentados com dieta normoprotéica e submetidos a infecção de longa duração (16 semanas) e baixa carga cercariana (ANDRADE; CHEEVER, 1993; WARREN, 1966).

Trabalhos experimentais vêm procurando elucidar o papel da má nutrição na dificuldade de desenvolvimento da fibrose hepática periportal em camundongos, através da desnutrição protéico calórica induzida nos mesmos pelo uso de uma dieta humana (COUTINHO et al., 1997a, 2003, 2007, 2010). Várias abordagens investigando a influência da alternância de dietas deficiente/normoproteica e vice-versa (COUTINHO et al., 2003), o papel do genótipo de camundongos (COUTINHO, 2004) e infecções repetidas (COUTINHO et al., 2007), foram infrutíferas.

O estudo subsequente do perfil imunológico revelou, todavia, que camundongos desnutridos e infectados pelo *S. mansoni* produzem baixos níveis de citocinas fibrogênicas, tais como IL-4 (SILVA, 2008) e IL-13 (COUTINHO et al., 2010; SILVA, 2008). Esses resultados diferem daqueles encontrados em animais eutróficos, onde ocorre formação de fibrose hepática periportal associada a resposta Th2, com produção de níveis elevados das citocinas pró-fibrogênicas IL-4 e IL-13 (COUTINHO et al., 2010; HILKENS et al., 1997; SILVA, 2008; SPELLBERG; EDWARDS Jr., 2001). Baixos níveis de produção dos anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE em camundongos desnutridos e infectados indicam que a resposta imune humoral também é influenciada negativamente pela desnutrição proteico - calórica (BARROS, 2008; OLIVEIRA et al., 2004).

O estado nutricional do hospedeiro experimental também é responsável por alterações no desenvolvimento da infecção pelo *S. mansoni*, com influência negativa sobre o crescimento, desenvolvimento e oviposição dos vermes (NEVES et al., 2001, 2002; OLIVEIRA et al., 2003).

Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os fatores potencialmente capazes de inibir ou estimular o desenvolvimento da fibrose hepática, particularmente do tipo periportal, em camundongos submetidos a

desnutrição protéico - calórica e infectados pelo *S. mansoni*. Para isso, foram estudados o quantitativo de vermes e de ovos depositados pelas fêmeas de *S. mansoni* no fígado e no intestino, a maturação e viabilidade dos ovos (intestino) de camundongos infectados e desnutridos; a produção das citocinas TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17 e IL-23 e sua participação na ativação e proliferação das células estreladas hepáticas para formação do principal componente do tecido fibroso (colágeno tipo I). Tal abordagem visou elucidar o mecanismo da fibrogênese na associação mórbida desnutrição/esquistossomíase, para explicar porque a fibrose periportal, lesão mais grave da esquistossomíase crônica, não se desenvolve em camundongos simultaneamente submetidos a essas duas condições patológicas, tão frequentemente encontradas em populações humanas de áreas endêmicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS GERAIS: ESQUISTOSSOMÍASE MANSÔNICA

A relevância da esquistossomíase mansônica como problema de saúde pública diz respeito à sua cronicidade, ampla distribuição geográfica e impacto na economia, principalmente pelas suas repercussões sobre a atividade produtiva da população infectada (RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005; VIDAL et al., 2011). Ocorre em 54 países principalmente da África, leste do Mediterrâneo e da América do Sul e Caribe (BRASIL, 2009; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2005).

No Brasil, segundo Ferreira e Silva (2007), a mortalidade por esquistossomíase foi reduzida em aproximadamente 62,9% entre os anos de 1980 a 2003. Embora essa redução possa ser um ótimo indicador do sucesso das ações de controle, dados da literatura demonstram que a esquistossomíase ainda continua sendo um grave problema de saúde coletiva (BARBOSA et al., 2010; GOMES et al., 2012; KATZ; ALMEIDA, 2003). Alguns estudos regionais mostram uma situação preocupante e ainda longe da erradicação do parasito ou da sua transmissão (CUTRIM; CHIEFFI; DE MORAES et al., 1998), ocasionando sérias consequências para o desenvolvimento sócio-econômico do próprio país (FERREIRA - SILVA, 2007; RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005). Apesar dos esforços para seu controle, o Brasil é o país da América do Sul onde se concentra o maior número de registros de casos de esquistossomíase mansônica, estimando-se que afete aproximadamente 4 a 6 milhões de indivíduos (BRASIL, 2010; LAMBERTUCCI, 2010; MASCARINI, 2003; PASSOS; AMARAL, 1998; RESENDES; SOUZA, BARBOSA, 2005) sendo a parasitose encontrada em aproximadamente 19 Estados, deixando cerca de 26 milhões de habitantes sob risco de contraí-la (GAZZINELLI et al., 2002).

No Brasil, a maioria dos casos ocorre no Nordeste. Inquérito realizado pelo Ministério da Saúde entre os anos de 2001 e 2008 detectou que essa região é responsável por aproximadamente 72% dos casos confirmados da doença no país (VIDAL et al., 2011). Além disso, a esquistossomíase representa um dos principais problemas médicos, em virtude de suas variadas e graves formas de manifestação clínica (RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005). Pernambuco é um dos estados mais acometida do Nordeste. Em áreas rurais, verificaram-se taxas de infecção de

até 80% sendo, por isso, considerada historicamente uma doença endêmica rural (BARBOSA et al., 2006; CARVALHO et al., 1998; COUTINHO et al., 1997b).

No entanto, vários estudos vêm demonstrando que o perfil epidemiológico da esquistossomíase em Pernambuco tem se modificado (SILVA; DOMINGUES, 2011). Em áreas rurais, a doença se manifesta predominantemente sob a forma crônica intestinal, incidindo na classe social de baixa renda e tendo como vetor o molusco *Biomphalaria straminea*. No litoral, ela é representada por casos agudos, ocorrendo em pessoas de classes média e alta, tendo como vetor o molusco *Biomphalaria glabrata* (ARAÚJO et al., 2007; BARBOSA; PIERI; BARBOSA, 2000; LEAL- NETO et al., 2013).

Atualmente, o aumento da incidência da esquistossomíase mansônica nas áreas urbanas e costeiras é ocasionado, principalmente, pelo declínio nos investimentos da indústria sucroalcooleira, promovendo a diminuição das oportunidades de emprego nas áreas rurais, fazendo com que os trabalhadores migrem para os centros urbanos, onde se estabelecem em locais desprovidos de infraestrutura, resultando no aparecimento de focos peri e intradomiciliares (BARBOSA, 1996; BARBOSA et al., 2010). Este fenômeno resultou, certamente, na difusão da esquistossomíase mansônica nas regiões metropolitanas e costeiras, mostrando que essa parasitose é uma endemia atrelada ao fator comportamental humano e à ocupação, de forma desordenada, dos espaços urbanizados (ARAÚJO et al., 2007; BARBOSA, 2000; BARBOSA et al., 2010; BARBOSA; PEIRI; BARBOSA; SILVA; BARBOSA, 1996; KLOOS et al., 2012).

Nas regiões metropolitanas e nas áreas costeiras do Estado de Pernambuco, a esquistossomíase mansônica vem se expandindo, com aparecimento de novos focos de transmissão em Ipojuca (Praia Porto de Galinhas), Goiana (Praia de Carne de Vaca), Itamaracá (Praia do Forte e Enseada dos Golfinhos), Paulista (Praia do Janga e Pau Amarelo), Igarassu (Praia do Mangue Seco), Jaboatão dos Guararapes (Lagoa Olho D'água) e Tamandaré (BARBOSA et al., 2010; GOMES et al., 2012). Os casos de infecção aguda em humanos, detectados no litoral pernambucano, acometeram, em sua maioria, indivíduos jovens e adultos que visitaram essa região e se expuseram à infecção, sendo por isso chamada, por alguns autores, de “doença dos viajantes”, ou seja, de indivíduos que nunca foram expostos ao antígeno do parasito (BARBOSA et al., 1998; JESUS et al., 2002; REY, 2001; ROSS et al., 2002). Silva e Domingues (2011) ressaltam a migração dos trabalhadores da

zona rural de Pernambuco para a cidade do Recife e sua Região Metropolitana, fato constatado pela elevada frequência de casos detectados nesse estudo.

A elevada aglomeração desordenada de indivíduos em espaços limitados com precárias condições de saneamento básico gera um modelo econômico desigual, favorecendo a disseminação e manutenção da infecção pelo *S. mansoni* (GOMES et al., 2012). É necessária uma compreensão holística dos determinantes dessa parasitose, ou seja, tanto no âmbito biológico, quanto dos fatores históricos, sócio-econômicos, culturais e ambientais envolvidos na sua disseminação. Por isso, é preciso elencar esse conjunto de fatores para que haja o controle e erradicação dessa doença, que apresenta manifestações patológicas severas e que, além de comprometer o estado de saúde, transforma indivíduos produtivos em seres impossibilitados de desenvolverem suas atividades sócio-econômicas. Além disso, é de suma importância a implementação de políticas públicas e medidas de controle exequíveis e contínuas, que visem não apenas o tratamento, mas, principalmente, à redução da infecção e de reinfecções.

As políticas públicas necessitam ser intersetoriais, visando a integralidade das ações, estando aliadas a um planejamento estratégico nas áreas litorâneas e costeiras, pautado na realidade dessas áreas, como também, promover ações de saneamento básico e educação em saúde para as populações atingidas. É sabido que a informação é o pilar principal de promoção da saúde. O desenvolvimento de uma população com consciência crítica promoverá o reconhecimento do impacto sobre a saúde e o perfil socioeconômico. Além disso, ajudará no reconhecimento da importância das políticas públicas e, principalmente, na mudança de comportamento para o combate dessa doença incapacitante e letal (VIDAL et al., 2011).

2.2 PATOLOGIA GERAL DA ESQUISTOSSOMIASE E PATOGÊNESE DAS FIBROSES HEPÁTICAS (GRANULOMATOSA E PERIportal)

A esquistossomíase mansônica é uma doença parasitária causada pelo trematódeo *S. mansoni*, cuja sintomatologia depende do estágio de evolução do parasito no hospedeiro vertebrado (PORDEUS et al., 2008). A doença pode ser classificada nas formas clínicas intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (PORDEUS et al., 2008). São encontradas, ainda, as formas ectópicas, neuro-

cerebral e pulmonar (BASTOS; BRITO, 2011; CAROD, 2012; RASO et al., 2006; ROSS et al., 2002; SOARES et al., 2007).

A infecção é iniciada quando a cercária penetra a pele ou mucosa do hospedeiro definitivo, perde a cauda e se transforma em esquistossômulo. Estes migram através da corrente sanguínea e/ ou vasos linfáticos para os pulmões, onde se transformam em vermes jovens. Esses parasitos deslocam-se para o sistema porta, onde se acasalam, dando início à deposição de ovos pelas fêmeas. Os ovos são, então, disseminados para vários órgãos do hospedeiro, especialmente fígado e intestino (ANDRADE, 2009; REY, 2001).

No fígado, a deposição dos ovos do parasito nos sinusoides conduz ao desenvolvimento de reações inflamatórias decorrentes de secreções eliminadas pelos miracídios (BURKE, 2009). Essas secreções funcionam como potente estímulo fibrogênico, agindo diretamente sobre as células que secretam a matriz extracelular (MEC) (ANDRADE, 1991, 2005; BURKE, 2010; WYNN et al., 2004). Na tentativa de isolar e/ou destruir o estímulo agressor, tem início a formação dos granulomas esquistossomóticos (ANDRADE, 2009; WYNN; CHEEVER, 1995). Este é um processo dinâmico, em que o tamanho e a composição celular desses granulomas variam com o tempo e a resposta imune do hospedeiro (ANDRADE, 2009; FRIEDMAN, 2008a, 2008b; WYNN; CHEEVER, 1995).

Os granulomas esquistossomóticos são definidos, morfológicamente, como formações nodulares onde as células exsudativas são dispostas em arranjos característicos no foco inflamatório, formando estruturas com aspectos peculiares e arquitetura que permite o diagnóstico da doença nas diferentes fases (LENZI et al., 1995; RASO et al., 2012; SILVA et al., 2000).

Na fase aguda, os granulomas formados são bastante volumosos, predominantemente exsudativos, com acúmulo de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos ao redor do ovo recém depositado (ANDRADE, 2009; BURKE, 2010; RASO et al., 2012), quase sempre apresentando uma zona central de necrose, periferia irregular, tendo ao redor fibras colágenas finas e frouxamente arrumadas de forma concêntrica (LENZI et al., 1995; RASO et al., 2012; SILVA et al., 2000). A reação inflamatória dessa fase é caracterizada por uma rápida resolução das alterações vasculares e edema (FRIEDMAN, 2004, 2008a, 2008b TOMASEK et al., 2002). Por outro lado, na fase crônica, os granulomas assumem os tipos necrótico-exsudativo, produtivo e de cura por fibrose (LENZI et al., 1995; RASO

et al., 2012). Os ovos do *S. mansoni* tornam-se degenerados e desintegrados, fibrócitos e fibras colágenas se tornam mais proeminentes e os linfócitos, células plasmáticas e alguns eosinófilos formam uma zona adicional na periferia da lesão (BURKE, 2010; RASO et al., 2012). Fibroblastos e fibras colágenas passam a ser preponderantes (fibrose granulomatosa), enquanto ocorre diminuição no número de outros tipos celulares (HSU et al., 1972; HURST; WILLINGHAM; LINDBERG, 2000). Os granulomas no estágio involutivo têm tamanho reduzido e podem exibir extensa deposição de fibras colágenas, enquanto o ovo é desintegrado, e pode tornar-se calcificado (HSU et al., 1972; HURST; WILLINGHAM; LINDBERG, 2000; RASO et al., 2012).

A simultaneidade do processo inflamatório em torno de muitos ovos e sua contínua produção leva à formação de nódulos fibróticos antigos a confluírem, desenvolvendo extensas áreas cicatriciais (ANDRADE, 2005, 2009) características da fibrose periportal ou “fibrose em haste de cachimbo de barro” (*clay pipestem fibrosis*), descrita pela primeira vez no homem por *Symmers* em 1904 (BOROS; WARREN, 1970), e no camundongo, por Warren (1966). Esse processo fibroso estrelar generalizado, em torno das ramificações intra-hepáticas da veia porta, é acompanhado de graus variáveis de telangiectasia, ou seja, neoformação e dilatação vascular nesse tecido (ANDRADE, 2005; BOGLIOLO, 1957).

Em linhas gerais, a fibrose periportal resulta do desequilíbrio entre síntese e degradação de produtos da MEC em resposta aos estímulos liberados pelos ovos do *S. mansoni*, os quais envolvem interações complexas entre muitos tipos celulares, incluindo os hepatócitos (ANDRADE, 2005, 2009). Todavia, as células estreladas hepáticas (HSCs), conhecidas como células de Ito, pericitos, células lipocíticas ou perisinusoidais, são, também, fatores que participam deste processo (ANDRADE, 2009; BRENNER, 2009; FRIEDMAN, 2008a, 2008b; FRIEDMAN, 2013).

2.3 IMUNOPATOLOGIA DA FIBROSE HEPÁTICA ESQUISTOSSOMÓTICA

2.3.1 PAPEL DAS CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS (HSCs)

Nos últimos anos muitos progressos foram realizados no entendimento da fibrogênese hepática de causa esquistossomótica (FRIEDMAN, 2013). Embora a patogenia da fibrose hepática periportal pareça simples, ela é, na realidade, bastante

complexa (ANDRADE, 2005). Os estudos realizados até o momento esclarecem que diferentes fatores têm participação no desenvolvimento da fibrose hepática periportal, tais como o tempo de infecção, ocorrência de reinfecções, carga parasitária, ajuste vascular hepático, fatores nutricionais associados à matriz extracelular do fígado e defeitos afetando o mecanismo de modulação imunológica dos granulomas periovulares (ANDRADE, 2005; BURKE, 2009; COUTINHO, 2008; SILVA et al., 2004).

As células estreladas hepáticas têm origem embrionária incerta (HELLERBRAND, 2013; FORBES; PAROLA, 2011; SENOO et al., 2010). Foram descobertas por *Küppfer* em 1876 e caracterizadas quase um século depois por Ito e Nemoto como células armazenadoras de gordura (SENOO et al., 2010; WINAU et al., 2008).

Em fígados normais, estas células correspondem a 1,4% do volume total do órgão ou, aproximadamente, 15% do número total de células, estando presentes na proporção de 1:20 em relação aos hepatócitos (FRIEDMAN, 2008a, 2008b; 2013; MOREIRA, 2007). Localizam-se no espaço subendotelial de Disse, entre as traves de hepatócitos e os sinusóides hepáticos (BARANOVA et al., 2011; FRIEDMAN, 2008a; FORBES; PAROLA, 2011; HELLERBRAND, 2013; JIAO; FRIEDMAN; ALOMAN, 2009; SENOO et al., 2010; SHERLOK; DOOLEY, 1997).

As HSCs podem ser encontradas em estado de quiescência ou em estado ativado (FRIEDMAN, 2003, 2008b; IREDALE; THOMPSON; HENDERSON, 2013; OLSEN et al., 2011). Quando quiescentes, expressam ácido glial fibrilar (GFAP), desempenhando a função de metabolizar e estocar a vitamina A, sob a forma de corpúsculos citoplasmáticos de gordura na forma primária de ésteres de retinol (BLOMHOFF; BLOMHOFF, 2006; FORBES; PAROLA, 2011; FRIEDMAN, 2003; GRESSNER; WEISKIRCHEN, 2006; HELLERBRAND, 2013). Nesse estágio, essas células também contêm uma pequena quantidade de triglicerídios, fosfolípidios, colesterol e ácidos graxos livres (FRIEDMAN, 2003; 2008a, 2013).

Do ponto de vista histórico, as HSCs foram as primeiras células pró-fibrogênicas identificadas em condições experimentais e clínicas (FRIEDMAN, 2003; 2008b), desempenhando papel relevante no processo de fibrogênese hepática, tanto em condições fisiológicas normais, como em situações patológicas (BARBOSA Jr.; PFEIFER; ANDRADE, 1993; FRIEDMAN, 2008a, 2008b; GABELE; BRENNER; RIPPE, 2003; HELLERBRAND, 2013; MANN; MARRA, 2010).

Quando o fígado sofre alguma agressão, as HSCs formam um eixo funcional com outros tipos celulares residentes, a exemplo das células de *Küpf*er, que produzem citocinas fibrogênicas e estimulam as HSCs a saírem de seu estado quiescente e se tornarem funcionalmente ativas (ANDRADE; OLIVEIRA-FILHO; FERNANDES, 1998; FRIEDMAN, 2008b; HELLERBRAND, 2013). A alteração do fenótipo das HSCs se dá por um processo denominado “transdiferenciação”, assumindo características semelhantes a miofibroblastos e passando a expressar alfa-actina de músculo liso (α -SMA) (ENG; FRIEDMAN, 2000; FRIEDMAN, 2008a, 2008b; KISSELEVA; BRENNER, 2008; OKUYAMA; SHIMAHARA; KAWADA, 2002).

Ao adquirirem fenótipo de miofibroblastos as HSCs sintetizam componentes da MEC (matriz extracelular), principalmente colágenos dos tipos I, III e IV (MAHER et al., 1988; OKUYAMA; SHIMAHARA; AKAWADA, 2002), proteoglicanos, fibronectina e ácido hialurônico (ANDRADE, 2005). Além disso, as HSCs atuam como apresentadoras de antígenos (WINAU et al., 2008), participam na síntese e liberação de citocinas, de fatores quimiotáticos e vasodilatadores, além de secretarem metaloproteinases (MMPs) e seus inibidores (TIMPs) (BATALLER; BRENNER, 2005; GRESSNER; WEISKIRCHEN, 2006; HELLERBRAND, 2013). Por isso, são capazes de manter e perpetuar não apenas o processo da fibrogênese, como também a neo-angiogênese e respostas inflamatórias crônicas (FORBES; PAROLA, 2011).

Os mecanismos de ativação das HSCs desenvolvem-se em três etapas: iniciação (onde ocorrem mudanças na expressão fenotípica dessas células); perpetuação (fase que corresponde à manutenção do fenótipo recém ativado) e, por último, estabelecimento do processo de fibrose e/ou resolução, que corresponde à morte celular ou reversão para o estado de quiescência (FRIEDMAN, 2003, 2008a, 2008b, 2013; IREDALE; THOMPSON; HENDERSON, 2013; OLSEN et al., 2011).

As HSCs representam a população de células mais investigadas em relação aos seus mecanismos de ativação e características pró-fibrogênicas (FRIEDMAN, 2008a, 2008b, 2013; HELLERBRAND, 2013). Na esquistossomíase masônica, essas células exercem importante papel na fibrogênese e regulação da pressão portal (FRIEDMAN, 2008a,b). São consideradas células-chave no mecanismo da fibrose, tanto nas hepatopatias humanas, como nas induzidas no modelo experimental murino eutrófico (ANDRADE, 2005; GEA; FRIEDMAN, 2011; GUYOT et al., 2006; SENOO et al., 2010).

2.3.2 PAPEL DAS CITOCINAS TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17 e IL-23

As secreções liberadas pelos ovos do *S. mansoni* são provenientes dos miracídios e compostas por enzimas proteolíticas e complexas frações glicoprotéicas, cujos componentes induzem o aparecimento de anticorpos e de células imunes sensibilizadas. Essas secreções líticas compõem o SEA (antígeno ovular solúvel) e são responsáveis pela proliferação fibroblástica *in vitro*, podendo, também, estimular linfócitos T (ANDRADE, 2005, 2009).

Como descrito na literatura, a alteração mais importante na imunopatologia da esquistossomíase é a reação inflamatória granulomatosa desenvolvida em torno dos ovos depositados pelos parasitos nos tecidos (PEARCE; MACDONALD, 2002; WARREN, 1966). Os granulomas esquistossomóticos representam reações de hipersensibilidade do tipo tardio (BURKE, 2009; PEARCE; MACDONALD, 2002; WEINSTOCK; BOROS, 1983).

Os granulomas esquistossomóticos podem sofrer alterações de tamanho, forma e composição com o passar do tempo. Esse fenômeno, denominado “modulação imunológica”, foi primeiro descrito por Andrade e Warren (1964) e tem sido atribuído, principalmente, a fatores imunes (BURKE, 2009; SILVA et al., 2004).

A modulação do granuloma é, primariamente, decorrente da resposta imune dependente de células T auxiliares (CD4⁺), que produzem linfocinas dos padrões Th1, Th2 e Th17. Na esquistossomíase mansônica murina, pesquisas diversas têm associado o início da inflamação granulomatosa a uma resposta Th1 de curta duração. Todavia, outros estudos indicam que as alterações patológicas encontradas são decorrentes da produção de citocinas do tipo Th2 (HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000; PEARCE et al., 1992; WYNN et al., 1993). De fato, esta dicotomia Th1/Th2 foi inicialmente descrita em estudos com clones de células TCD4⁺ murinas, cuja diferenciação depende das citocinas secretadas. O perfil Th1 é preponderante no início da infecção (4 – 6 semanas) e na fase intermediária, sendo desencadeado por esquistossómulos e vermes adultos imaturos (BURKE, 2009), responsáveis pelo estímulo de mecanismos dependentes de fagócitos e de citotoxicidade celular chamados “pró-inflamatórios”. Suas principais citocinas são IL-1, IL-2, IL-6, TNF α e IFN- γ (ABATH et al., 2006; PEARCE; MACDONALD, 2002). O perfil Th2 tem início com a oviposição e, ao contrário do perfil Th1, estimula a resposta imune celular tendo como principais citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13

(HESSE et al., 2001; HILKENS et al., 1997; MORAIS et al., 2002, 2008; PEARCE: MACDONALD, 2002; SPELLBERG; EDWARDS Jr., 2001).

Estudos realizados por Jankovic et al. (1999) utilizando camundongos esquistossomóticos, mostraram a existência de uma compensação entre as citocinas IL-13 e IL-4. Quando ambas as citocinas são suprimidas, pequenos granulomas são formados, uma vez que a IL-13 está claramente associada à resposta Th2 que ocorre durante o aparecimento da fibrose hepática em camundongos esquistossomóticos (CHEN; BOROS, 1999; HERNANDEZ; SHARPE; ESTADECKER, 1999; HESSE et al., 2000; HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000).

O balanço entre os padrões de resposta Th1/Th2 e seus efeitos imunopatológicos é regulado pelas células T regulatórias (Tregs) (HESSE et al., 2004). Essas células são classificadas como CD4⁺, CD25⁺ e FoxP3 possuem subpopulações que podem ser divididas em Tregs naturais (nTregs) ou Tregs induzíveis (iTregs) (BURKE, 2009). As Tregs representam uma importante fonte de IL-10 na regulação do balanço Th1/Th2 (HESSE et al., 2004) e podem influir sobre o quadro da imunopatologia da esquistossomíase mansônica, suprimindo a resposta Th1 ou prevenindo a resposta Th2 exagerada, que pode ocorrer durante a inflamação granulomatosa (HESSE et al., 2004; TAYLOR; MOHRS; PEARCE, 2006).

Atualmente, o papel da IL-17, secretada por uma nova subpopulação (Th17) de células T-auxiliadoras, vem sendo investigado na esquistossomíase mansônica (RUTITZKY; STADECKER, 2006; SHAINHEIT et al., 2011; STEINMAN, 2007). Essa sub-população parece estar envolvida na patogênese da esquistossomíase murina, estando associada ao desenvolvimento de patologia grave e polarização para resposta do tipo Th1. Em camundongos CBA, foi evidenciado desenvolvimento de forte resposta inflamatória com níveis elevados de IFN- γ (RUTITZKY et al., 2005, 2008; RUTITZKY: STADECKER, 2006). Essa indução de patologia grave ocorre em concomitância com a expressão da citocina IL-17 e a polarização da resposta Th17, dependentes da presença da IL-23 (RUTITZKY et al., 2008; RUTITZKY: STADECKER, 2006). Um balanço ajustado das citocinas produzidas nas respostas do tipo Th1, Th2 e, possivelmente, Th17 durante a infecção esquistossomótica, é essencial para prevenir o desenvolvimento de alterações tissulares intensas (BURKE, 2009).

As citocinas dos perfis Th1 e Th2 estão envolvidas com as respostas inflamatórias granulomatosa e fibrosante, as quais constituem uma das maiores causas de morbidade e mortalidade associadas com a esquistossomíase mansônica (ABATH et al., 2006; MORAIS et al., 2002). Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que a diferenciação das células proinflamatórias CD4+ em Th17 constitui uma nova via imunopatogênica, com papel importante no desenvolvimento de lesões graves induzidas pelos ovos do parasito (RUTITZKY et al., 2005, 2008).

No fígado, os eventos que se sucedem após o dano do hepatócito, geram a formação de corpos apoptóticos que são fagocitados pelas células de *Küpffer*, além de ativação das HSCs e infiltração de linfócitos no parênquima hepático (BATALLER; BRENNER, 2005). Tanto a infiltração de linfócitos quanto a apoptose de hepatócitos, em conjunto com as HSCs, recrutam células inflamatórias e formam um complexo celular que passa a produzir várias citocinas, e outros mediadores, tais como: fator de transformação do crescimento – TGF- β (LEASK; ABRAHAM, 2004; ROSS et al., 2002); metaloproteínases (MMPs), principalmente a MMP-9; e seus inibidores (TIMPs), com ênfase no TIMP-1 (BAKER; EDWARDS; MURPHY, 2002; HERNANDEZ–GEA et al., 2013; STERNLICHT; WERB, 2001).

O TGF- β é constituído por proteínas de uma família de citocinas multifuncionais que regulam vários aspectos da função celular, e conseqüentemente, têm efeitos diversos sobre uma variedade de células e tecidos (ANDRADE, 2005; GORDON; BLOBE, 2008; FRIEDMAN, 2008a, 2008b; SHI; MASSAGUE, 2003). Por apresentar uma grande plasticidade funcional, o TGF- β 1 desenvolve várias atividades biológicas (GRESSNER et al., 2002). A sua especificidade é o resultado de muitos fenômenos diferentes de sinalização, vários ainda não elucidados (GORDON; BLOBE, 2008; GRESSNER et al., 2002). Possui, principalmente, três isotipos, TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 (INAGAKI; OKAZAKI, 2007; SENOO et al., 2010). Dentre esses, o TGF- β 1 destaca-se por ter uma maior participação na fibrogênese hepática, principalmente nas lesões mais severas, que evoluem para fibrose (BATALLER; BRENNER, 2005). Essa citocina tem papel crucial (MORIYA et al., 2012) no estímulo para ativação de HSCs e na sua transdiferenciação em miofibroblastos (TAHASHI, 2002). Por isso, essa molécula tem sido bastante estudada, principalmente por ser identificada como um possível alvo terapêutico anti-fibrosante (SUBEQ, 2011).

A interleucina 13 é um mediador fundamental na estimulação das células de *Küpffer* do fígado e produção de TGB- β 1 na infecção pelo *S. mansoni* (LI et al., 2004; TIDBALL, 2005). Além disso, a IL-13 ativa o TGB- β 1 ao regular a expressão das MMPs (LI et al., 2004; TIDBALL, 2005). É uma citocina pró-fibrogênica muito importante e se encontra associada à estimulação de colágeno dos tipos I, III e V, tanto em camundongos, quanto em humanos (FALLON et al., 2000; KURODA et al., 2005; WYNN et al., 2004).

A interleucina 23 é uma citocina heterodimérica, intimamente relacionada com a IL-12 do ponto de vista estrutural, porém não do ponto de vista funcional. Elas parecem ter papéis completamente diferentes na regulação das respostas imunes do hospedeiro (MCKENZIE; KASTELEIN; CUA, 2006). Apesar das semelhanças, essas citocinas são distintas quanto às suas funções. A IL-12 induz, preferencialmente, a produção de IFN- γ pelos linfócitos Th1, o qual é importante na destruição de patógenos intracelulares, enquanto a IL-23 induz a produção de IL-17, citocina que também possui atividade pró - inflamatória (AGGARWAL et al., 2003; KOLLS; LIDEN, 2004) e deriva de uma linhagem distinta de linfócitos TCD4⁺, descrita como Th17 (WEAVER et al., 2006).

Na esquistosomíase mansônica, há relatos de que a IL-23 contribui criticamente para a imunopatologia dessa doença, potenciando a exacerbação da patologia esquistossomótica por induzir o desenvolvimento de células Th17 e reduzir a produção da IL-10, envolvida na cadeia regulatória, resultando na liberação de várias citocinas pró-inflamatórias, ativação e recrutamento de neutrófilos e liberação de óxido nítrico associado ao aparecimento de fagócitos (RUTITZKY et al., 2008).

2.3.3 PAPEL DOS AGENTES REGULADORES DA SÍNTESE E DEGRADAÇÃO DA MATRIZ EXTRACELULAR (MEC): METALOPROTEINASES (MMPS) E INIBIDORES TECIDUAIS DAS METALOPROTEÍNASES (TIMPS)

As metaloproteinases de matriz são proteases dependentes de cálcio e zinco, as quais, conjuntamente, desempenham papel importante na remodelação da MEC, na degradação do colágeno e de outros filamentos extracelulares, estando também envolvidas em muitos processos biológicos, tais como: embriogênese, angiogênese e cicatrização tecidual (VISSE; NAGASSE, 2003; WYNN, 2007). Nos vertebrados, a família das MMPs consiste em mais de vinte tipos que apresentam expressão

diferente, dependendo do tecido onde estejam atuando (TALLANT; MARRERO; GOMIS-RUTH, 2010). Dentre as MMPs que agem na fibrogênese hepática, destaca-se a MMP-9, um tipo de colagenase IV que está envolvida em vários aspectos da inflamação hepática crônica, incluindo o acúmulo de células inflamatórias, a cura do tecido lesionado e o processo de remodelação do tecido (BRUMANN et al., 2012; HEMMANN et al., 2007). No entanto, tem participação efetiva na ativação da forma latente do TGF- β 1, o qual estimula a produção de colágeno na fase inicial de ativação das HSCs (HEMMANN et al., 2007). Especificamente, demonstra ser mediadora do extravasamento vascular e na migração inicial de células inflamatórias, como também na indução do reparo tecidual (TALLANT; MARRERO; GOMIS-RUTH, 2010). Sabe-se que vários tipos de células podem expressar a MMP-9, tais como: queratinócitos, eosinófilos, neutrófilos e principalmente, células de *Küpf*er (ARTHUR, 2000; SORSA et al., 2006).

No fígado com lesão, quando as células estreladas hepáticas tornam-se mais ativas, ocorre um aumento significativo da expressão de MMP-9, possivelmente na tentativa de conter o excesso de formação de MEC (IREDALE, 2007). São secretadas em forma de pró-enzimas não ativas, em resposta a uma gama de mediadores inflamatórios e sua produção é limitada pelo inibidor tecidual de metaloproteínase 1, TIMP-1 (BRUMANN et al., 2012).

Os TIMPs encontram-se envolvidos na remodelação de tecidos e regulação do metabolismo da MEC (BRUMANN et al., 2012). São moléculas que possuem dupla ação: além de inibir a atividade das MMPs, impedem a apoptose das células estreladas hepáticas (MURPHY et al., 2002). Estes inibidores de metaloproteínas compartilham características estruturais semelhantes e são denominados TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 (BRUMANN et al., 2012). Dentre os diferentes tipos de inibidores, o TIMP-1 demonstra ser o mais potente inibidor endógeno de MMPs, principalmente das atividades da MMP-9 (BRUMANN et al., 2012). O TIMP-1 é produzido em níveis bastante elevados quando as células estreladas hepáticas estão ativadas, sendo essas células apontadas como as maiores produtoras desse tipo de inibidor (ARTHUR, 2000; NEUBAUER; SAILE; RAMADORI, 2001), mas também podem ser produzidos pelas células de *Küpf*er e hepatócitos (HEMMANN et al., 2007). Na deposição excessiva da MEC ocorre uma super expressão de TIMPs que é correlacionada com uma diminuição significativa de MMPs (NEUMAN et al., 2012). Por isso os inibidores de metaloproteínas, principalmente TIMP-1, têm sido alvo

de vários estudos, sobretudo em testes para validar sua importância como biomarcadores na ativação das células estreladas hepáticas, em diferentes doenças do fígado (LEROY et al., 2004; LICHTINGHAGEN, 2001).

Vale salientar que, em condições fisiológicas normais do fígado, as MMPs e seus inibidores são encontrados em proporções equivalentes (VISSE; NAGASSE, 2003). Assim, um balanço equilibrado entre MMPs e TIMPs desempenha um papel essencial na degradação do colágeno (FALLOWFIELD et al., 2007; TENCY et al., 2012).

Na esquistossomíase mansônica os níveis equilibrados das MMPs e os seus TIMPs, contribuem para a remodelação do tecido fibroso tanto em camundongos como em seres humanos (BARTLEY et al., 2006; TENCY et al., 2012; ZOU et al., 2007). Em modelo murino infectado foi visto que o desequilíbrio entre MMP/TIMP está associado ao aparecimento da fibrose hepática e uma das consequências desse processo é a produção de níveis elevados de citocinas fibrogênicas (BURKE, 2009).

2.4 DESNUTRIÇÃO PROTÉICO-CALÓRICA E FIBROSE HEPÁTICA ESQUISTOSSOMÓTICA

Fatores múltiplos parecem estar envolvidos na fibrogênese hepática esquistossomótica, entre eles o estado nutricional do indivíduo (ANDRADE, 2005; COUTINHO, 2008; COUTINHO et al., 2010).

A desnutrição calórico protéica (DCP) é definida como uma condição patológica gerada pela deficiência simultânea de proteínas e calorias. Constitui-se em um dos mais importantes problemas de saúde coletiva em diversas regiões do mundo, devido à sua magnitude e consequências biológicas, acometendo milhões de indivíduos em todo o mundo (MALAFAIA, 2009).

A Organização das Nações Unidas vem apresentando estatísticas negativas a respeito da DCP, destacando que 1 bilhão de indivíduos na América Latina, Ásia e África, aproximadamente 1/5 da população mundial, encontra-se acometida por desnutrição crônica (DOUGLAS, 2002; ELIA; STRATTON, 2000).

Nos países pobres ou em desenvolvimento, observa-se, frequentemente, a presença de um estado nutricional deficiente em indivíduos residentes em áreas menos favorecidas, onde fatores sócio-econômicos, políticos, culturais e ambientais

exercem influencia direta nos hábitos alimentares, repercutindo sobre o crescimento e/ou desenvolvimento da população (ATINMO et al., 2009; MARTINEZ, 2001).

Estudos demonstram que a desnutrição geralmente encontra-se associada com doenças de base, principalmente do tipo renal, cardíaco, oncongênico e hepático, acarretando, assim, agravamento da morbimortalidade dos pacientes (MALAFAIA, 2009; STRATTON; ALVARENGA, 2002).

Nas doenças parasitárias, a exemplo da infecção pelo *S. mansoni*, o estado nutricional do hospedeiro parece intervir na resposta imunológica, causando reflexos diretos sobre o tamanho e composição dos granulomas hepáticos (RAMOS, 2007).

O estado nutricional parece ser, também, um determinante crítico na gênese da fibrose hepática periportal (COUTINHO et al., 1997a, 2003, 2007, 2010), onde pode exercer interferência direta nos mecanismos de síntese e degradação da MEC.

Estudos prévios têm demonstrado que a desnutrição agrava a infecção esquistossomótica e vice-versa, uma vez que ocorre um efeito sinérgico entre essas patologias (COUTINHO et al., 1997a). Camundongos na fase crônica da infecção pelo *S. mansoni*, mantidos em uma dieta multideficiente com aproximadamente 7% de proteína, não foram capazes de desenvolver a fibrose periportal murina equivalente à de *Symmers'* dos seres humanos, detectada geralmente em 30 a 40% dos animais controles alimentados com ração balanceada (COUTINHO et al., 1997a). O que ocorre com os camundongos desnutridos, tem sido objeto de estudo em vários trabalhos experimentais (COUTINHO, 2004; COUTINHO et al., 1997a, 2003, 2007, 2010; COUTO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2004).

Pesquisas anteriores têm detectado os principais efeitos do parasitismo por *S. mansoni* sobre o estado de nutrição e condições de saúde do hospedeiro experimental (COUTINHO, 2008). Abordagens diferentes têm sido utilizadas (COUTINHO, 2004) para reproduzir a fibrose tipo periportal no hospedeiro murino desnutrido infectado pelo *S. mansoni*. Dentre essas abordagens foi tentada a alternância de dietas, onde foi induzida uma desnutrição “precoce” em camundongos, utilizando-se inicialmente, dieta deficiente seguida de dieta balanceada e, em outro grupo, induzindo-se desnutrição “tardia”, onde a dieta balanceada precedeu a dieta deficiente. Os camundongos de ambos os grupos não desenvolveram a fibrose hepática periportal. A desnutrição “tardia” promoveu, porém, alterações na dinâmica do processo de deposição e reabsorção do colágeno, com atraso na reabsorção, havendo formação de granulomas periovulares fibrosos

volumosos. Todavia, o modo pelo qual a desnutrição pode interferir no processo de reabsorção fibrosa, ainda não foi totalmente esclarecido (COUTINHO et al., 2003).

Uma segunda abordagem avaliou a relação entre infecções repetidas e o aparecimento da fibrose hepática periportal em camundongos desnutridos (COUTINHO et al., 2007). Nesse estudo, foi observado que as sucessivas infecções promoveram aumento na concentração de tecido fibroso, tanto no grupo eutrófico, quanto no grupo desnutrido, comprovada por análise bioquímica e morfométrica (COUTINHO et al., 2007). No entanto, a fibrose tipo *pipestem* não foi evidenciada no grupo desnutrido, contrariamente ao que aconteceu no grupo eutrófico.

Em estudos sobre o perfil genômico do hospedeiro, foi observado que camundongos *inbred* BALB/c infectados pelo *S. mansoni* e submetidos a desnutrição, também não desenvolveram fibrose hepática periportal, evidenciando que a lesão independe da linhagem dos animais (CARVALHO, 2004; COUTINHO, 2008), porém guarda relação com o estado nutricional deficiente por ingestão de dieta hipoproteica.

A resposta imune humoral em camundongos desnutridos também é influenciada pela insuficiência de nutrientes, uma vez que os níveis de anticorpos (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE) são significativamente mais baixos nesse grupo, quando comparados aos dos camundongos eutróficos (BARROS, 2008; OLIVEIRA et al., 2004). Da mesma forma, a resposta imune celular é negativamente influenciada pela desnutrição, com níveis de citocinas (IFN- γ , IL-5, IL-4 e IL-13) significativamente mais baixos nos camundongos desnutridos, em comparação com os eutróficos (COUTINHO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2004; SILVA, 2008).

Apesar do acervo de publicações já existentes a respeito das interações entre a esquistossomíase mansônica e o estado nutricional do hospedeiro vertebrado, são necessárias novas investigações que possam elucidar aspectos ainda mal esclarecidos, tais como: resposta imune, imunorregulação e imunopatologia em hospedeiros desnutridos, relações entre desnutrição e fibrose hepática esquistossomótica, tanto no homem como no modelo experimental.

2.5 O MODELO EXPERIMENTAL MURINO NO ESTUDO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

Moore et al. (1979) e Stirewalt; et al. (1997), investigando a susceptibilidade de vários mamíferos infectados com *S. mansoni*, verificaram que os camundongos desenvolvem vermes adultos sexualmente maduros e eliminam ovos viáveis do parasito nas fezes. Tendo em vista que estes animais são hospedeiros de baixo custo e de fácil manuseio e manutenção em laboratório, tornaram-se os hospedeiros definitivos mais utilizados em estudos experimentais (CAPRON et al., 1982).

Do ponto de vista da doença, os camundongos apresentam várias semelhanças com a patologia humana, inclusive pelo desenvolvimento, nos animais eutróficos, de lesão hepática semelhante à fibrose periportal do homem (ANDRADE; CHEEVER, 1993; WARREN, 1966). Este modelo experimental de fibrose hepática *pipestem* foi desenvolvido por Warren e De Witt (1958) e, posteriormente, estudado com detalhes por Andrade e Warren (1964) e Andrade e Cheever (1993).

A caracterização das fases aguda e crônica, no modelo murino, é relativamente difícil, mas a infecção é considerada aguda aproximadamente até a 6ª semana e crônica a partir da 12ª (FALLON, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002). A fibrose *pipestem* que se desenvolve, na fase crônica da esquistossomíase mansônica, em camundongos eutróficos, é um dos modelos experimentais de fibrose hepática utilizados para elucidar os mecanismos envolvidos nos processos de fibrogênese em geral (OLIVEIRA et al., 2008).

As relações entre esquistossomíase mansônica e desnutrição vêm sendo estudadas em modelo murino ao longo dos anos (COUTINHO et al., 1997a, 2003, 2007, 2010; COUTINHO; FREITAS; ABATH, 1992). O quadro de desnutrição protéico-calórica tipo marasmático, em camundongos, pode ser induzido pela ingestão de uma dieta humana, confeccionada a partir de dados obtidos em inquéritos sobre hábitos alimentares de populações de áreas endêmicas do Nordeste do Brasil (COUTINHO et al., 1997b). A dieta é essencialmente hipoprotéica, resultante de uma mistura de compostos alimentícios, com baixo teor energético-protéico (COUTINHO et al., 1997a). Camundongos desnutridos, submetidos a infecções de pequena intensidade e longa duração pelo *S. mansoni*, não desenvolvem, na fase crônica da parasitose, a fibrose tipo *pipestem* ou em forma de “cachimbo de barro” equivalente à fibrose periportal de Symmers', considerada a

lesão mais grave do quadro anatomo-patológico da esquistossomíase mansônica humana, por suas repercussões clínicas e fisiopatológicas, podendo levar o paciente à morte.

3 JUSTIFICATIVA

A esquistossomíase mansônica é uma parasitose amplamente difundida no Brasil, estando localizados em Pernambuco um dos mais importantes focos endêmicos do país.

A patologia da esquistossomíase é inicialmente devida à inflamação granulomatosa ao redor dos ovos depositados pelo *S. mansoni*, com subsequente desenvolvimento de fibrose periportal grave, na fase crônica. No entanto, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa lesão ainda necessitam de melhor elucidação, principalmente no que se refere à influência do estado nutricional do hospedeiro.

Trabalhos anteriores têm revelado que camundongos infectados pelo *S. mansoni* e submetidos a desnutrição calórico-protéica não são capazes de desenvolver fibrose hepática periportal, como ocorre em camundongos eutróficos. Nesse contexto, o tipo e mecanismos de resposta imune celular, a atuação das células estreladas hepáticas (principais responsáveis pela deposição excessiva de tecido fibroso no fígado), a carga parasitária, maturação e viabilidade dos ovos e outros fatores, precisam ser mais profundamente investigados.

A elucidação dos fatores e mecanismos envolvidos no processo da fibrogênese hepática poderá explicar a ausência de desenvolvimento da fibrose “pipestem” no camundongo esquistossomótico desnutrido e contribuir para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas visando restringir ou promover a regressão da fibrose na esquistossomíase e em outras hepatopatias fibrosantes do homem.

4 PERGUNTA CONDUTORA

Quais os fatores que influenciam a fibrogênese hepática, em modelo experimental desnutrido, infectado com *Schistosoma mansoni*?

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Investigar se o estado nutricional do hospedeiro influencia a síntese da matriz extracelular no fígado, a resposta imune-celular e o perfil imunopatológico em camundongos desnutridos infectados com *Schistosoma mansoni* (fases aguda e crônica).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o estado nutricional dos camundongos, através do estudo das curvas ponderais;
- b) Determinar a carga parasitária, quantidade de ovos depositados nos tecidos, sua viabilidade e estadiamento de maturação, em relação à produção de colágeno hepático;
- c) Estudar a formação do granuloma periovular e o desenvolvimento da fibrose hepática granulomatosa e periportal, na infecção esquistossomótica associada à desnutrição;
- d) Mensurar os granulomas periovulares e o tecido fibroso hepático resultante da infecção;
- e) Avaliar a produção da metaloproteinase da matriz extracelular MMP-9 e seu inibidor TIMP-1;
- f) Quantificar as células estreladas hepáticas após sua ativação, relacionando os achados com a fibrogênese hepática;
- g) Verificar níveis das citocinas TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17 e IL-23 e relacioná-los com a imunopatologia hepática.

6 METODOLOGIA

6.1 ANIMAIS

Camundongos machos, isogênicos, da linhagem C57BL/6, recém desmamados (21 dias), pesando entre 10 a 15g, foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério Experimental da FIOCRUZ-Recife (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM), sob condições padronizadas de temperatura (entre 21 e 22°C), luminosidade (ciclos de claro/escuro de 12 em 12 horas) e umidade (45 a 55%). Os animais foram oriundos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz / MS (Rio de Janeiro). Um grupo de camundongos albinos Swiss, eutanasiados com 60 dias de infecção, foi usado para obtenção do antígeno solúvel de ovo (SEA) segundo Gazzinelli et al. (1983). A utilização desses animais foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - FIOCRUZ), sob licença nº L 0028/07, cujo certificado encontra-se como Anexo A.

6.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O desenho experimental foi do tipo intervencionista. Foram formados, quatro grupos de camundongos C57BL/6 - EI (eutróficos infectados); ENI (eutróficos não infectados); DI (desnutridos infectados) e DNI (desnutridos não infectados). Os grupos foram formados tanto na fase aguda (60 dias de infecção), como na crônica (150 dias de infecção). Em cada fase da infecção (aguda, crônica) foram utilizados 40 camundongos, sendo 10 para cada um dos quatro grupos, repedindo-se o experimento três vezes para cada fase.

6.3 DIETAS

A desnutrição foi induzida pela administração da dieta básica regional (DBR), essencialmente hipoprotéica (Tabela 1), contendo aproximadamente 7% de proteína (COUTINHO et al., 1997a). Os animais eutróficos foram alimentados com Nuvilab, dieta comercial balanceada (Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo, Paraná, Brasil),

contendo 22% de proteína. As dietas foram administradas aos animais “ad libitum”, em forma de *pellets* (biscoitos).

Tabela 1 - Composição percentual das dietas.

COMPONENTES	g %	PROTEÍNA%	CARBOIDRATOS%	GORDURA%	MINERAIS%	FIBRAS%
DBR:						
Feijão Mulatinho (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	18,34	3,99	10,66	0,24	0,57	1,09
Farinha de mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	64,81	0,84	48,59	0,12	0,43	5,64
Charque	3,74	2,74	0,43	0,41**	0,06	-
Batata Doce (roxa) (<i>Iponaea batatas</i>)	12,76	0,30	9,99	0,03	0,20	0,48
TOTAL	99,65	7,87	69,67	0,80	1,26	7,21
NUVILAB			OBS: Dieta comercial balanceada, para camundongos.			
(Nuvital Nutrientes Ltda)	100,0	22,00				

Fonte: Coutinho et al. (1997a).

Nota: (*) Este valor refere-se à gordura total da charque “magra” e da manta de gordura (0,21+ 0,20 =0,41)

6.4 ESTADO NUTRICIONAL DOS ANIMAIS

A avaliação do estado nutricional foi realizada através das curvas ponderais obtidas pela determinação semanal da massa corpórea dos camundongos, em balança eletrônica (Petit Balance, modelo mk500-C). Diariamente, foram observados o comportamento e aspecto clínico dos animais. Este modo de avaliação simplificada do estado nutricional justifica-se pelo fato dessas dietas terem sido estudadas em trabalhos anteriores, sendo já bastante conhecida sua composição, preparo e repercussões clínicas e fisiopatológicas (COUTINHO; FREITAS; ABATH, 1992; TEODÓSIO et al., 1990).

6.5 INFECÇÃO DOS ANIMAIS

Os camundongos foram infectados, individualmente, com 40 cercárias de *S. mansoni* (cepa LE - Belo Horizonte), oriundas de moluscos *Biomphalaria glabrata* criados no Laboratório de Esquistossomose do CPqAM - FIOCRUZ. A infecção foi realizada por via percutânea, 30 dias após a administração das dietas. A partir de quarenta e cinco dias após a infecção, todos os animais foram submetidos a exame

parasitológico qualitativo (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934), para comprovar a positividade da infecção.

6.6 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS

Todos os grupos de camundongos C57BL/6 foram submetidos à eutanásia com 60 e 150 dias de infecção (fases aguda e crônica, respectivamente). O grupo de camundongos Swiss utilizados para obtenção do SEA foram submetidos a eutanásia com 60 dias de infecção. Todos os camundongos do experimento foram anestesiados, por via intraperitoneal com Ketamina (115 mg/Kg) associada à Xilasina (10 mg/Kg). O efeito positivo do anestésico foi avaliado segundo as normas da CEUA-FIOCRUZ, pela constatação da ausência dos reflexos digital e caudal dos animais.

Os procedimentos efetuados após a eutanásia foram: a) remoção do baço (para cultura de células esplênicas, visando obter sobrenadante celular para estudo imunológico); b) perfusão do sistema venoso portal (para coleta e quantificação dos vermes); c) remoção e pesagem do fígado e baço. Posteriormente, o lobo maior do fígado foi seccionado em cinco fragmentos: um fragmento foi retirado para histologia, morfometria e imunofluorescência (fixado em formol a 10%); e os demais foram utilizados para dosagem de hidroxiprolina, quantificação de colágeno (adicionado a HCl 6N) e digestão cáustica em KOH a 4% para contagem de ovos (CHEEVER, 1970). Os camundongos mortos foram congelados e, posteriormente, recolhidos para serem incinerados, conforme as normas de Biossegurança vigentes.

6.7 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

6.7.1 COLETA E QUANTIFICAÇÃO DOS PARASITOS DE *S. mansoni*

Os camundongos foram perfundidos após 60 e 150 dias de infecção segundo a técnica de Duvall e De Witt (1967), da seguinte maneira: foi realizada, inicialmente uma incisão longitudinal, próxima aos órgãos genitais, com o auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas, indo até a caixa torácica. As vísceras foram expostas e a veia porta cortada. Através de agulha introduzida no ventrículo esquerdo, foi injetada, na artéria aorta solução de perfusão composta de 8,5g cloreto de sódio (VETEC, Rio de

Janeiro, RJ), 15g de citrato de sódio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), completando-se com quantidade suficiente de água destilada para 1000mL. Os vermes recuperados foram, inicialmente, acondicionados em cálice de sedimentação e, posteriormente, separados de acordo com o sexo e quantificados.

6.7.2 CONTAGEM DE OVOS DE *S. mansoni* EM AMOSTRAS DE FÍGADO E INTESTINO

A quantidade de ovos no fígado e intestino foi determinada pela técnica de Cheever (1970), conforme se segue: (1) fragmentos de fígado e de intestino total foram pesados e colocados individualmente em tubos de ensaio identificados, contendo 60mL de solução de hidróxido de potássio a 4% (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) e acondicionados em estufa de 37°C (Fanem LTDA, modelo 002CD) durante 3h; (2) Após digestão dos fragmentos, obteve-se uma solução de onde foi retirada uma amostra de 1000 μ L, distribuída em câmara de contagem de *Sedgewick Rafter* (Graticules Limited, modelo S50, Tonobridge, England). Nessa amostra foram contados os ovos encontrados com o auxílio de um microscópio óptico (LEICA, modelo Leitz Laborluxs, Nussloch, Germany) com objetiva de 4x. A quantidade de ovos presente nesses 1000 μ L foi extrapolada para a quantidade total da solução (60mL), objetivando-se obter o número de ovos em todo o fígado e intestino.

6.7.3 OOGRAMA

A classificação segundo a viabilidade e maturação dos ovos de *S.mansoni* foi realizada através da técnica do oograma (PELLEGRINO; FARIA 1965). Um fragmento da porção mediana do intestino foi lavado em solução salina com pH = 7,2 e rapidamente secado em papel absorvente. Posteriormente, o fragmento foi dividido em três porções de aproximadamente 1 cm, cada um delas foi comprimida entre lâmina e lamínula e analisada em microscópio óptico através de ocular de 10x e objetiva de 10x. Em cada fragmento foram contados, em média, 100 ovos e classificados de acordo com o seu estágio evolutivo de maturação (ovos imaturos viáveis de 1º a 4º estágio, ovos maduros viáveis, e ovos inviáveis calcificados, com miracídio retraído, semi-transparentes).

6.8 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

6.8.1 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

O fragmento de fígado destinado a estudo histológico foi fixado em formol a 10%, com tempo máximo de fixação de 24 horas. Depois da fixação, a amostra foi colocada, individualmente, em cápsula histológica identificada e desidratada em cinco banhos de etanol de concentração crescente, na seguinte ordem: etanol 70%, 80%, 90% e dois banhos de 100% (CAAL, São Paulo, SP), em um processador automático de tecidos. Em seguida, o fragmento foi diafanizado em dois banhos de xilol (CAAL, São Paulo, SP) e mergulhado em dois de parafina histológica a 60°C, durante 1 hora cada um, sendo ao final, incluído em parafina, em forma de bloco para microtomia. O bloco foi cortado com espessura de 5µm, em micrótomo rotativo de parafina (LEICA, modelo RM 125RT, Nussloch, Germany) e os cortes obtidos foram, corados pela hematoxilina (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) e eosina (Kanto Chemical CO, Inc) para análise histopatológica; e pelo picrossirius vermelho (Aldrich Chemical Company, Inc), para quantificação do tecido colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLOS; BRENTANI, 1979) e mensuração dos granulomas esquistosomóticos.

6.9 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO HEPÁTICO

6.9.1 ESTUDO BIOQUÍMICO

Amostras de fígado, obtidas do lobo maior, pesando entre 100 e 200mg, fixadas em formol a 10%, foram usadas para determinação do colágeno como hidroxiprolina (BERGMAN; LOXLEY, 1963), de acordo com os procedimentos que se seguem: (1) Hidrólise: os fragmentos de fígado foram, individualmente, colocados em tubos de ensaio contendo 5mL de ácido clorídrico (ISOFAR, Rio de Janeiro-RJ) a 6N e incubados a uma temperatura de 110°C em estufa, por 18 horas. Após esse tempo, foram acrescentados 5mL de água destilada às amostras digeridas e, em seguida, foram filtradas; (2) Neutralização: Foram obtidos 2mL de cada amostra filtrada, adicionado-se a essa alíquota uma gota de fenolftaleína (3,3-bis (4-hydroxyphenyl)-1(3H)- isobenzofuranone) - (SIGMA, St. Louis, MO, USA) a 1%; (3). A cada 2mL do filtrado foram adicionados 600µL de solução de hidróxido de sódio

10N (VETEC, Rio de Janeiro, RJ); em seguida, foram acrescentados 400µL de ácido clorídrico 3N (ISO FAR, Rio de Janeiro, RJ), sendo ajustado o volume final de cada amostra para 4mL; (4) Coloração: foram preparadas quatro amostras de 50, 100, 150 e 200µL de hidroxiprolina (trans-4-HYDROXY-LPROLINE; SIGMA, St. Louis, MO, USA) a 0,1mM, respectivamente, denominadas de padrão, as quais, a partir desse instante, acompanharam todas as etapas da técnica; (5) de cada amostra neutralizada, foram obtidos 200µL, acrescentando-se a cada uma (inclusive ao padrão) 400µL de álcool isopropanol (CAAL, São Paulo, SP); posteriormente, as amostras foram oxidadas com 200µL de solução "A" [N-Chloro-ptoluene-sulfonamide sodium salt, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA] + tampão citrato acetato) por 4 minutos; (6) foram acrescentados, a cada amostra, 2,5mL da solução "B" (reagente de Erlich [p-Dimethylamino-Benzaldehyde, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA] + ácido perclórico a 60%) + álcool isopropanol (CAAL, São Paulo, SP). (7) As amostras foram deixadas em banho-maria a 60°C, por 25 minutos; (8) Ao final, foram esfriadas e lidas em espectrofotômetro automático (Pharmacia, modelo Ultrospec 3000), em densidade óptica com comprimento de onda de 558nm. Os resultados da leitura foram corrigidos para intensidade da infecção, dividindo-se a hidroxiprolina hepática total pelo número de ovos de *S. mansoni* no fígado (CHEEVER et al., 1987).

6.9.2 ESTUDO MORFOMÉTRICO

Foram analisados cortes histopatológicos de fígado de 10 animais de cada grupo infectado (EI e DI) corados pelo, picrossirius vermelho. Utilizando-se objetivas de 10x, foram verificados dez campos microscópicos aleatórios por animal para mensurar o percentual de tecido fibroso (%), o volume dos granulomas (V) encontrados e as densidades volumétrica (Vv) e numérica (Nn) dos mesmos. A morfometria foi realizada com o auxílio do Sistema de Processamento de Análise de Imagem LEICA QWIN, versão 2.6 MC (Leica Cambridge, Cambridge – England), composto de um microcomputador (contendo o programa de morfometria acima citado) e o auxílio de microscópio óptico binocular, acoplado a câmara de captura digital (LEICA JVC, modelo TK – C 1380, Pine Brook, NJ, USA). Para obtenção do percentual de tecido fibroso, o tecido colágeno, foi marcado e quantificado com o auxílio do programa Qwin 2.6. Foi medido o diâmetro dos granulomas que

continham ovo ou vestígio de sua casca. Atribuindo-se aos granulomas uma forma esférica, os raios obtidos a partir dos seus diâmetros foram aplicados à fórmula para o cálculo do volume da esfera, obtendo-se, assim, o volume dos granulomas.

$$V = R^3 \times \pi \times 4/3$$

V = Volume do granuloma

R = Raio da esfera

$\pi = 3,14$

4/3 = Constante

A densidade volumétrica foi calculada a partir da mensuração da área de todos os granulomas que continham casca ou vestígio de casca de ovo de *S. mansoni*, encontrados em campos microscópicos aleatórios. Essas áreas foram marcadas e mensuradas com o auxílio do programa. O resultado da soma dos valores correspondentes a essas áreas foi dividido pelo resultado da soma dos valores correspondentes as áreas totais dos campos aleatórios observados. O quociente dessa operação é a densidade de volume.

$$V_v = \frac{\text{Área total dos granulomas}}{\text{Área total dos compartimentos}}$$

Para se obter a densidade numérica, o número de granulomas encontrados nos campos microscópicos aleatórios foi somado, e o resultado, juntamente com o valor da densidade de volume, foram aplicados à fórmula de Weibel (1963).

$$N_n = 0,77 \times \sqrt{\frac{N^{1,5}}{V_v^{0,5}}}$$

V_v = densidade volumétrica do granuloma

N_n = densidade numérica dos granulomas

0,77 = constante

N = número de granulomas

V_v = densidade volumétrica dos granulomas

6.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA (ESTUDO DO COLÁGENO TIPO I E DAS CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS)

Secções de 5 µm de fígado, fixadas em formalina a 10% e embebidas em parafina, foram usadas para detecção de α-SMA e colágeno tipo I por imunofluorescência indireta. Os cortes foram desparafinizados e aquecidos em tampão citrato (pH = 6.0), para recuperação antigênica. Filamentos de alfa- SMA

foram marcados com o uso do anticorpo anti- α -SMA biotilado (Novotec, Lyon, France), 1:100, “overnight”, seguido por Alexa 647 conjugado a streptavidina 1:200, por 1 hora (Molecular Probes, Carlsbad, CA). Para a análise da presença de α -SMA, as secções foram montadas em meio VECTASHIELD Hardset com DAPI H-1500 (4,6-diamidino-2-phenylindole-Vector Laboratories): núcleos das células coradas em azul e citoplasma em vermelho.

Para marcação do colágeno I, as secções foram tratadas “overnight” com anticorpo anti-colágeno I policlonal de coelho, 1:100, (Santa Cruz, Biotechnology), seguido por IgG anti-coelho conjugada com Alexa flúor 488, 1:200, por 1 hora (Molecular Probes). Os cortes foram corados com TO-PRO-3 (Carbocyanine monomer nucleic acid): onde os núcleos celulares foram corados em vermelho, e colágeno I, em verde.

Dez campos randômicos de cada corte histológico foram estudados, utilizando-se microscópio confocal Fluoview 1000, com objetiva de 40x (Olympus, Tokyo-Japan). A análise morfométrica foi realizada com o “software” Image ProPlus versão 7.0.

6.11 RESPOSTA IMUNE CELULAR

6.11.1 OBTENÇÃO DE ANTÍGENO SOLÚVEL DE OVO (SEA)

O antígeno solúvel de ovo (SEA), foi obtido como descrito por Gazzinelli et al. (1983), foi preparado no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do CPqAM/ FIOCRUZ. Para sua obtenção, camundongos albinos Swiss foram infectados por via percutânea com aproximadamente 120 cercárias de *S.mansoni* e perfundidos para retirada dos vermes, após 60 dias de infecção. Os fígados foram retirados, fragmentados, embebidos em solução de salina a 1,7% por 24h a 4°C e, posteriormente, colocados em banho-maria por 2h, a 37°C. Terminado esse tempo, os fígados passaram por um processo de trituração (em liquidificador comum) por 5 min e a suspensão formada foi filtrada, uma vez em malha de 180 μ m e, uma segunda vez, em malha de 130 μ m. O material filtrado foi distribuído em cálices de sedimentação e decantado durante 2h. O sedimento resultante da decantação foi depositado em tubos Falcon de 50mL, submetido a cinco centrifugações 200 x g (Centrífuga Beckman Instruments, modelo TJ-6R) de 5min. Após a centrifugação, o

sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspensionado em 10mL de salina a 1,7%. O sedimento foi macerado manualmente com bastão de vidro, na presença de inibidor de protease (EDTA 1mM em metanol, PMSF 1Mm), resfriado e ultrassonicado (Processador Ultrasônico 500 watts- Cole Parmen, modelo 501) com três ciclos de 20 pulsos (sendo cada pulso de 60s, a uma potência de 25w). Após esta etapa, o material foi ultracentrifugado a $10^4 \times g$ por 10 min a 4°C e o sobrenadante submetido a nova ultracentrifugação a $10^5 \times g$ por 1h, a 4°C (Ultracentrífuga Beckman Coulter, modelo Optima LE-80K, Palo Alto, Califórnia). A técnica foi finalizada com a diálise do sobrenadante, utilizando-se membrana de celulose com capacidade de reter proteínas de peso molecular a partir de 12.000 kDa, para completa retirada dos sais presentes no antígeno.

6.11.2 CULTURA DE ESPLÊNOCITOS

Após 60 e 150 dias de infecção, três camundongos de cada grupo foram submetidos a eutanásia para remoção de seus baços em condições estéreis. Um “pool” de três baços de cada grupo de camundongos foi usado para obtenção de células destinadas ao estudo da resposta imune celular, durante as fases aguda e crônica da esquistossomose mansônica. As suspensões de células esplênicas foram obtidas por maceração dos baços em meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo - Brasil), acrescidas de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina a 1%) e aminoácido (1% de L-glutamina) e centrifugadas por 5 min a $300 \times g$ a 4°C (Centrífuga refrigerada: modelo TJ-6R, Beckman Instruments, Inc.). As hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado, durante 18 s. As células foram ressuspensionadas em meio RPMI suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal - WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro - Brasil) e sua viabilidade observada pelo emprego de Trypan Blue a 10%. As suspensões celulares foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços, em duplicata, na concentração de 5×10^6 células/mL submetidas a diferentes estímulos [SEA – 20 $\mu\text{g/mL}$ ou Concanavalina A (ConA) – 5 $\mu\text{g/mL}$ ou simplesmente meio de cultura (sem estímulo), e então, cultivadas por 24, 48, 72 e 120h a 37°C, em estufa de CO₂ a 5% (Forma Scientific Inc.), para obtenção de sobrenadante e posterior dosagem dos níveis de TGF- β 1, MMP-9, TIMP-1, IL-4, IL-13, IL-17 e IL-23. Esses quatro tempos de cultivo foram utilizados para determinar qual o melhor deles para produção de cada citocina. As culturas sem estímulo foram utilizadas como

controle interno negativo. Ao mesmo tempo, as culturas estimuladas com o mitógeno (ConA), foram usadas como controle positivo na avaliação da capacidade imunoproliferativa dos esplenócitos.

6.11.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17, IL-23 DA METALOPROTEINASE MMP-9 E DO SEU INIBIDOR TIMP -1

Os níveis de TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17, IL-23, MMP-9 e TIMP-1 foram determinados através da técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). Para a citocina TGF- β 1, foi utilizado o kit ELISA Ready- Set- Go Development System (e -Bioscience cat. 88-7344-88, San Diego - CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Para a IL-4 (nº catálogo DY 404), IL-13 (nº catálogo DY 413), IL-17 (nº catálogo DY 421), IL-23 (nº catálogo DY 1887), MMP-9 (nº catálogo DY909) e TIMP1 (nº catálogo DY980) foi utilizado o Kit DuoSet Mouse da R & D (DuoSet ELISA Development System, R & D System, Minneapolis, Minnesota- USA). As dosagens das citocinas foram realizadas obedecendo aos protocolos determinados pelos fabricantes.

A leitura foi feita em comprimento de onda de 450nm no Biorad Laboratories, modelo 3550. As concentrações das citocinas nas amostras foram calculadas pelo programa *Microplate manager* versão 4.0, a partir de curvas-padrão obtidas com seus respectivos recombinantes. Os resultados obtidos são representativos de três experimentos e expressam a mediana e o desvio médio de dosagens feitas em duplicata.

6.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

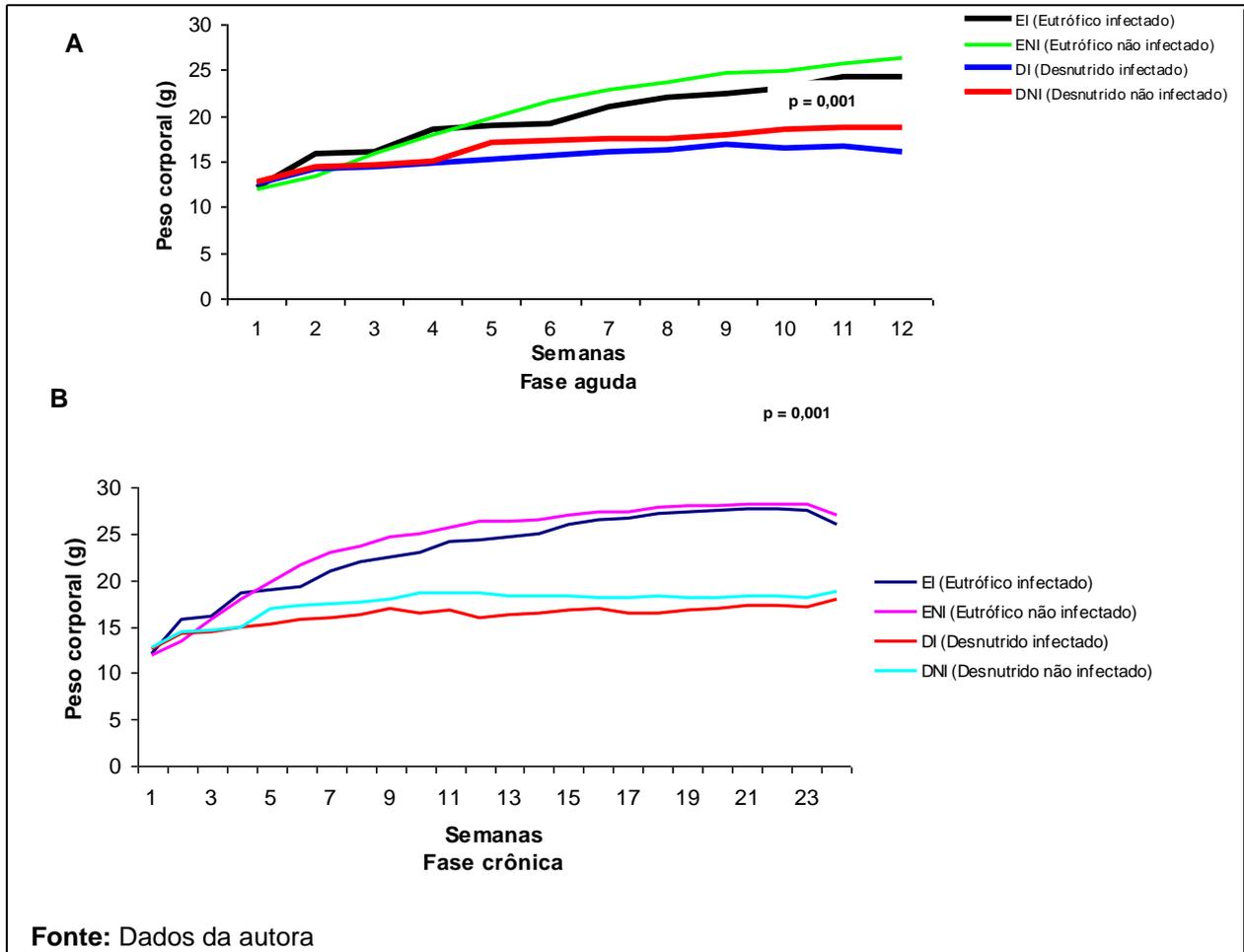
A significância dos dados obtidos foi calculada pelo teste “t” de Student, com o auxílio do “software” BIOESTAT versão 5.0 (Belém, Pará, Brasil-2007) e os resultados expressos como média aritmética e desvio-padrão ($\bar{X} \pm DP$). O teste não paramétrico de Mann-Whitney também foi usado, quando apropriado, sendo os resultados expressos em mediana e desvio médio ($Md \pm DM$). Em todos os casos, valores de p iguais ou inferiores a 0,05 foram considerados significativos.

7 RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO DO ESTADO NUTRICIONAL DOS ANIMAIS (FASES AGUDA E CRÔNICA)

Os animais dos grupos infectados, independentemente da dieta, começaram a perder massa corpórea depois da infecção pelo *S. mansoni*, realizada na 4ª semana após o início do experimento. A diferença mais expressiva na perda de massa corporal foi observada nos grupos desnutridos (infectados ou não), em comparação com os eutróficos. A diferença entre desnutridos e eutróficos infectados foi estatisticamente significativa, tanto na fase aguda ($p = 0,001$) quanto na fase crônica ($p = 0,001$). Todavia, não houve diferença estatística significativa, quando as curvas ponderais dos grupos infectados (eutróficos e desnutridos) foram comparadas com as dos seus respectivos controles (não infectados), nas duas fases da doença (Figura 1A e B).

Figura 1 – Curvas ponderais dos grupos eutróficos e desnutridos infectados pelo *Schistosoma mansoni* e seus respectivos controles (não infectados), nas fases aguda (A) e crônica (B) da parasitose.



Fonte: A autora

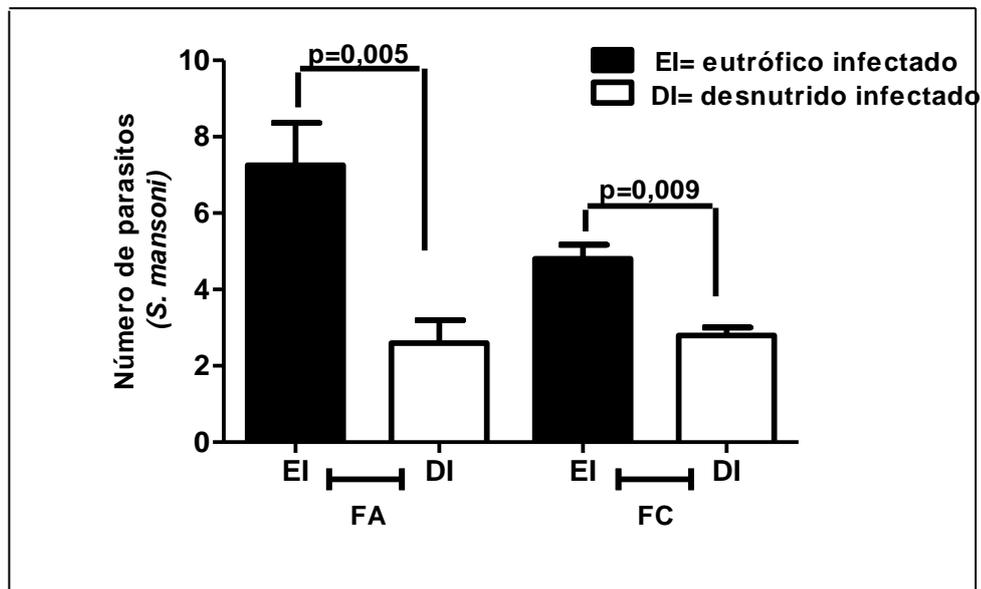
Nota: $p \leq 0,05$ foi considerado significativo

7.2 DETERMINAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA

7.2.1 QUANTIFICAÇÃO DO NÚMERO DE PARASITOS

A Figura 2 representa o número médio de vermes adultos recuperados do sistema porta - mesentérico dos grupos desnutrido infectado (DI) e eutrófico infectado (EI), nas fases aguda e crônica da infecção. Verificou-se que a carga parasitária dos desnutridos foi menor e estatisticamente significativa, em comparação com o grupo EI, nas duas fases da doença ($p = 0,005$ e $p = 0,009$, respectivamente).

Figura 2 - Parasitos recuperados por perfusão do sistema porta - mesentérico, em camundongos desnutridos e eutróficos, infectados pelo *S. mansoni*, nas fases aguda (FA) e crônica (FC).



Fonte: Elaborada autora

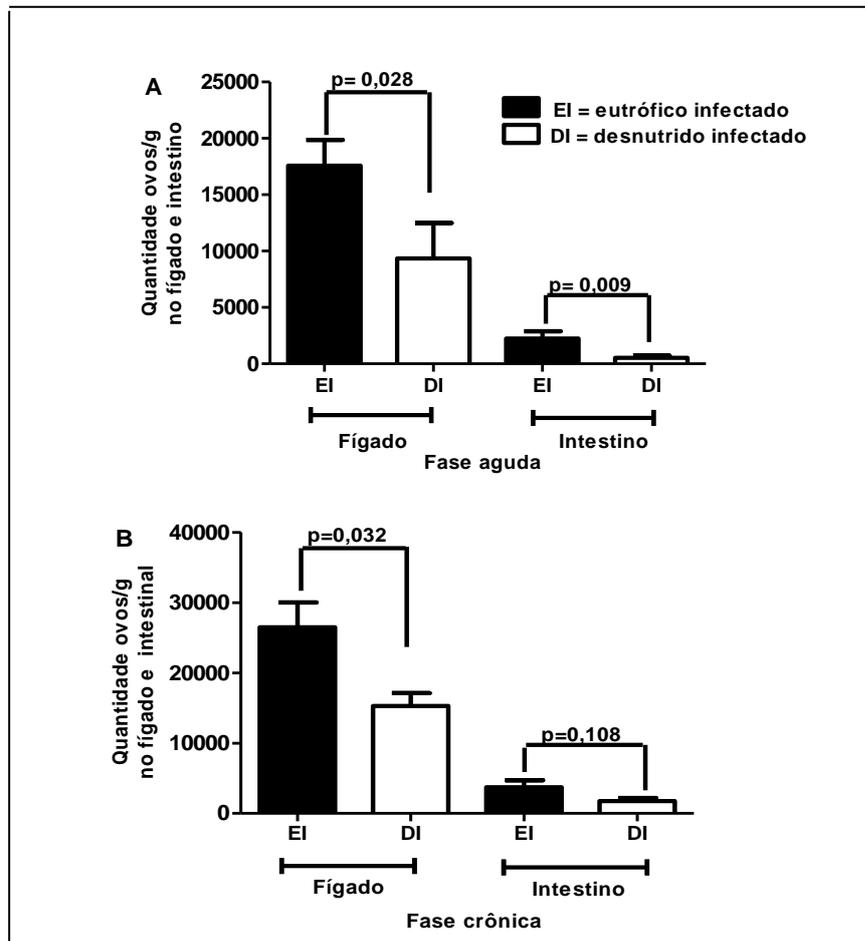
Nota: Os resultados foram calculados $\bar{X} \pm DP$ na (FA) e $Md \pm DM$ na (FC) de dez animais por grupo, em três experimentos. $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

7.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE OVOS DE *S. mansoni* NO FÍGADO E INTESTINO

A quantidade média de ovos de *S. mansoni*, calculada por grama de tecido hepático, foi inferior no grupo DI, quando comparado ao EI. Diferença estatisticamente significativa foi encontrada nas fases aguda (Figura 3A) e crônica (figura 3B), com valores de $p = 0,028$ e $p = 0,032$, respectivamente.

No intestino, a quantidade média de ovos também foi menor nos desnutridos (DI), em ambas as fases da infecção (Figura 3A e B).

Figura 3 – Quantidade de ovos encontrados no fígado e intestino de camundongos infectados com *S.mansoni*, nas fases aguda (A) e crônica (B).



Fonte: Dados do autor

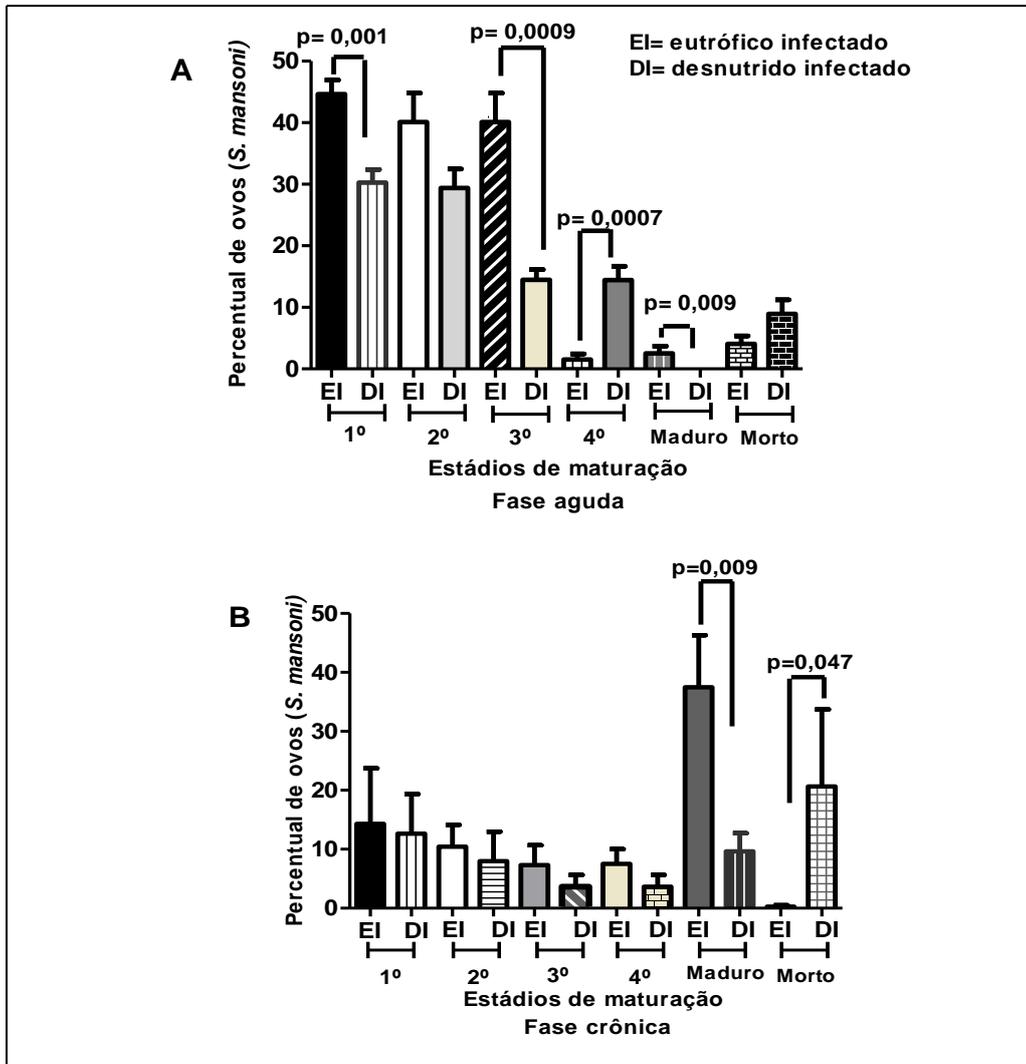
Nota: Os resultados foram calculados $\bar{X} \pm DP$ (intestino- A e B e fígado - B) e $Md \pm DM$ (fígado - A) de dez 10 animais por grupo, em três experimentos. $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

7.2.3 OOGRAMA

A avaliação percentual dos diferentes estádios de maturação de ovos de *S. mansoni* encontrados em fragmentos de intestino, na fase aguda da infecção pelo *S. mansoni*, (Figura 4A), mostrou que o grupo desnutrido (DI) apresentou, quando comparado com o grupo eutrófico, redução significativa do número de ovos nos estádios 1º ($p = 0,001$), 3º ($p = 0,0009$) e 4º ($p = 0,0007$), como também no estágio de ovos maduros ($p = 0,009$). Na fase crônica (Figura 4B) ocorreu, nos desnutridos, redução significativa no percentual de ovos maduros ($p = 0,009$) e aumento significativo de ovos mortos ($p = 0,047$). Todavia, não houve redução significativa do

número de ovos nos demais estádios avaliados (1^o, 2^o, 3^o e 4^o), quando esses grupos foram comparados entre si.

Figuras 4 – Percentual de ovos de *S.mansoni* no intestino de camundongos desnutridos (DI) e eutróficos (EI), em relação à sua viabilidade e estágio de maturação, nas fases aguda (A) e crônica (B) da parasitose.



Fonte: Dados do autor

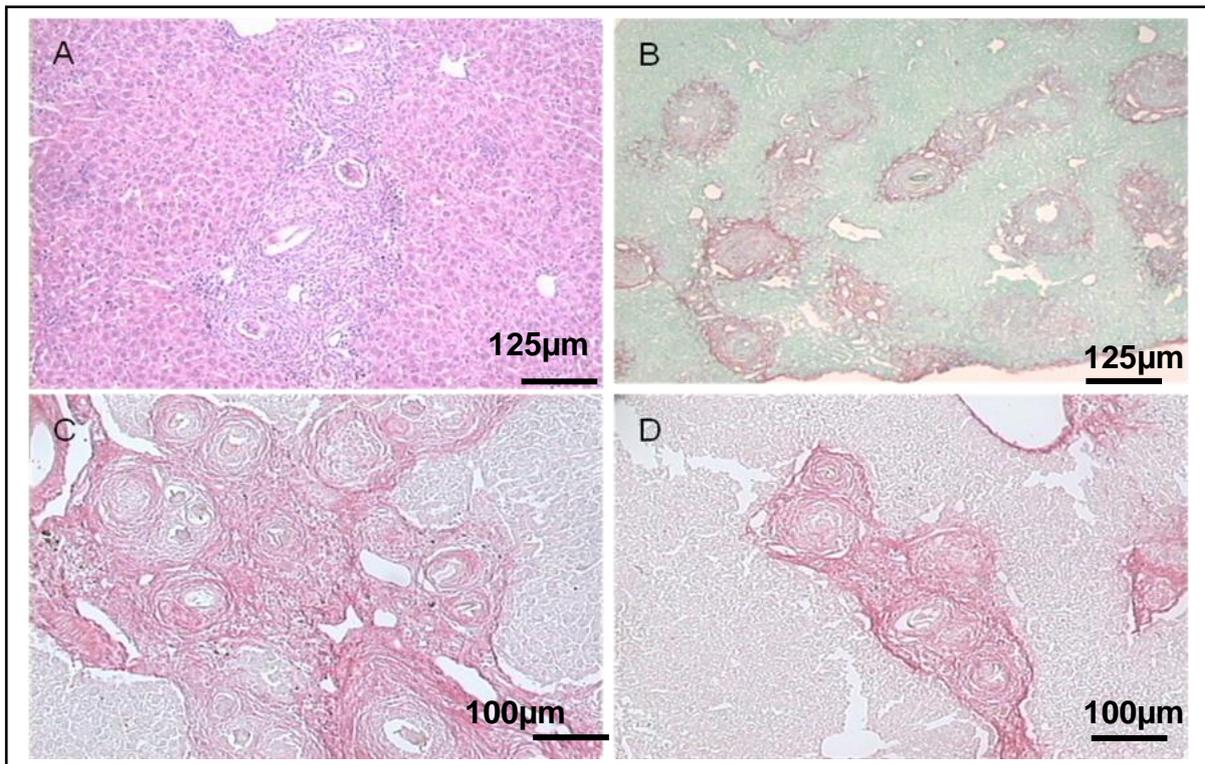
Nota: Foram calculados $\bar{X} \pm DP$ (1^o, 2^o, 3^o e 4^o- A e B) e $Md \pm DM$ (maduro e inviáveis- A e B) de dez animais por grupo, em três experimentos. $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

7.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

O quadro histológico no grupo de camundongos eutróficos e infectados (EI), na fase aguda, apresentou numerosos granulomas, ocupando os espaços-porta, ora isolados, ora em conglomerados, constituídos por polimorfonucleares, às vezes com intensa proliferação eosinofílica ou com produção de tecido colágeno sob a forma de fibras delgadas de aspecto frouxo (Figura 5A). Na fase crônica, o estudo

histopatológico, no grupo EI, revelou ausência de alterações degenerativas nas células do parênquima hepático. As lesões encontradas eram ora de caráter moderado, ora intenso, sendo representadas por infiltração de células mononucleares e alguns linfócitos, nos espaços-porta e em torno de veias centrolobulares, além de numerosos granulomas formados em torno de ovos de *S. mansoni* degenerados ou de restos de cascas. A maioria dos granulomas era de predominância colágena, às vezes exibindo componente exsudativo, particularmente polimorfonucleares eosinófilos. Esses granulomas eram isolados e distribuídos de modo não sistematizado, no parênquima hepático. Nos casos de infecção mais intensa, apresentavam-se em coalescência, formando extensos conglomerados. Em quatro dos dez camundongos do grupo eutrófico infectado (40%) foram detectados espaços-porta com intensa deposição de ovos, vascularização aumentada, acentuada hiperplasia de ductos bilíferos e infiltração inflamatória crônica, caracterizando o desenvolvimento da fibrose hepática periportal murina (Figura 5C)

O grupo de camundongos desnutridos e infectados (DI), na fase aguda, exibiu um perfil histopatológico com granulomas pequenos, isolados e predominantemente exsudativos, com alguns focos de necrose e uma discreta deposição de fibrilas colágenas (Figura 5B). No grupo DI em fase crônica, a infecção era de intensidade variável. Os granulomas eram menores, distribuídos esparsamente no parênquima, às vezes formando conglomerados, mas em nenhum dos animais foram detectadas imagens sugestivas de fibrose periportal. Nesse grupo, muitos granulomas encontravam-se, ainda, em fase exsudativa, com presença de numerosos polimorfonucleares eosinófilos e neutrófilos (Figura 5D).

Figura 5 - Histopatologia hepática.

Fonte: Dados da autora

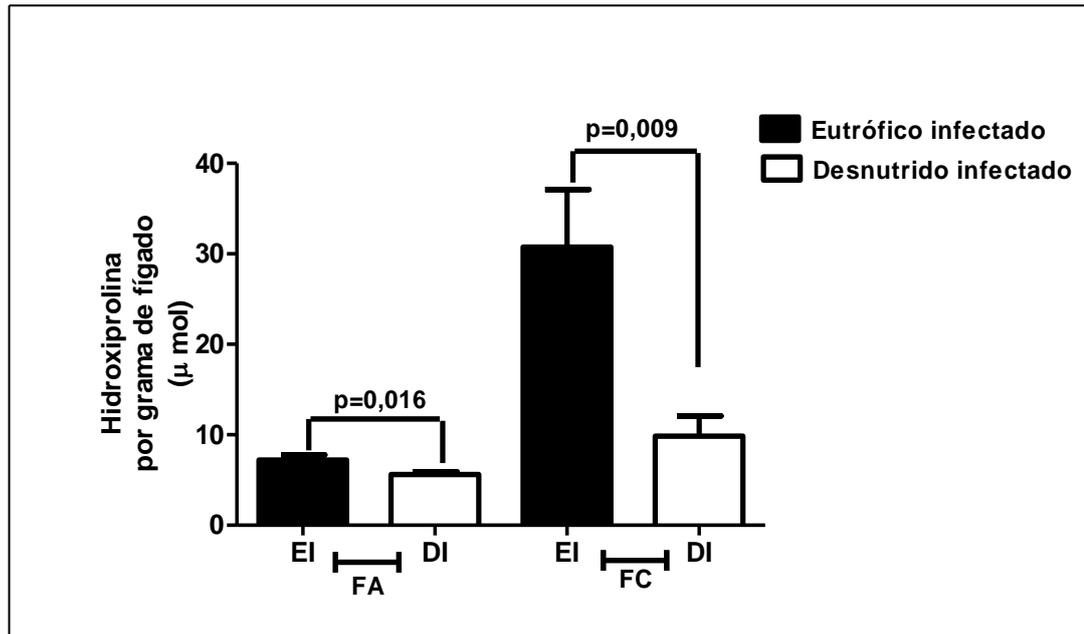
Legenda: (A) Grupo EI (fase aguda): Conglomerado de granulomas periovulares em torno dos ovos maduros, com infiltração celular inflamatória aguda e deposição de colágeno escasso (60 dias após a infecção). H.E. (B)-Histopatologia hepática do grupo DI (fase aguda) - Granulomas periovulares pequenos e dispersos, com discreto infiltrado de polimorfonucleares em torno de ovos degenerados (60 dias após a infecção). Picrosirius-red. Figura C - Histopatologia do grupo EI (fase crônica): fibrose hepática periportal (*pipestem – like fibrosis*), mostrando concentração de granulomas periovulares, alargamento fibroso, aumento da vascularização e infiltração inflamatória crônica do espaço portal (150 dias de infecção). H.E. Figura D -: Grupo DI (fase crônica): granulomas periovulares pequenos, em torno de cascas de ovos vazias, ausência da fibrose hepática periportal (*pipestem – like fibrosis* - 150 dias de infecção). Picrosirius - red.

7.4 AVALIAÇÃO DO COLÁGENO HEPÁTICO

7.4.1 QUANTIFICAÇÃO BIOQUÍMICA

Os níveis de tecido fibroso hepático, mensurados como hidroxiprolina, estavam reduzidos, no grupo DI, sendo estatisticamente significativa a diferença, em comparação com o grupo EI, com valores de $p = 0,016$ e $p = 0,009$, nas fases aguda e crônica, respectivamente (Figura 6). Quando foram comparados os níveis de hidroxiprolina do grupo EI da fase aguda com os do grupo EI da fase crônica, a quantidade mais significativamente ($p = 0,009$) elevada foi vista na fase crônica. O mesmo ocorreu quando os níveis de hidroxiprolina foram comparados entre o grupo DI de fase aguda e o da fase crônica, sendo que este último apresentou valores mais elevados e significativos ($p = 0,009$).

Figura 6 – Quantificação bioquímica do colágeno hepático nas fases aguda (FA) e crônica (FC) da esquistossomíase mansônica.



Fonte: Dados do autor

Nota: Foram calculados $\bar{X} \pm DP$ de dez animais por grupo, em três experimentos. $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

7.4.2 QUANTIFICAÇÃO MORFOMÉTRICA

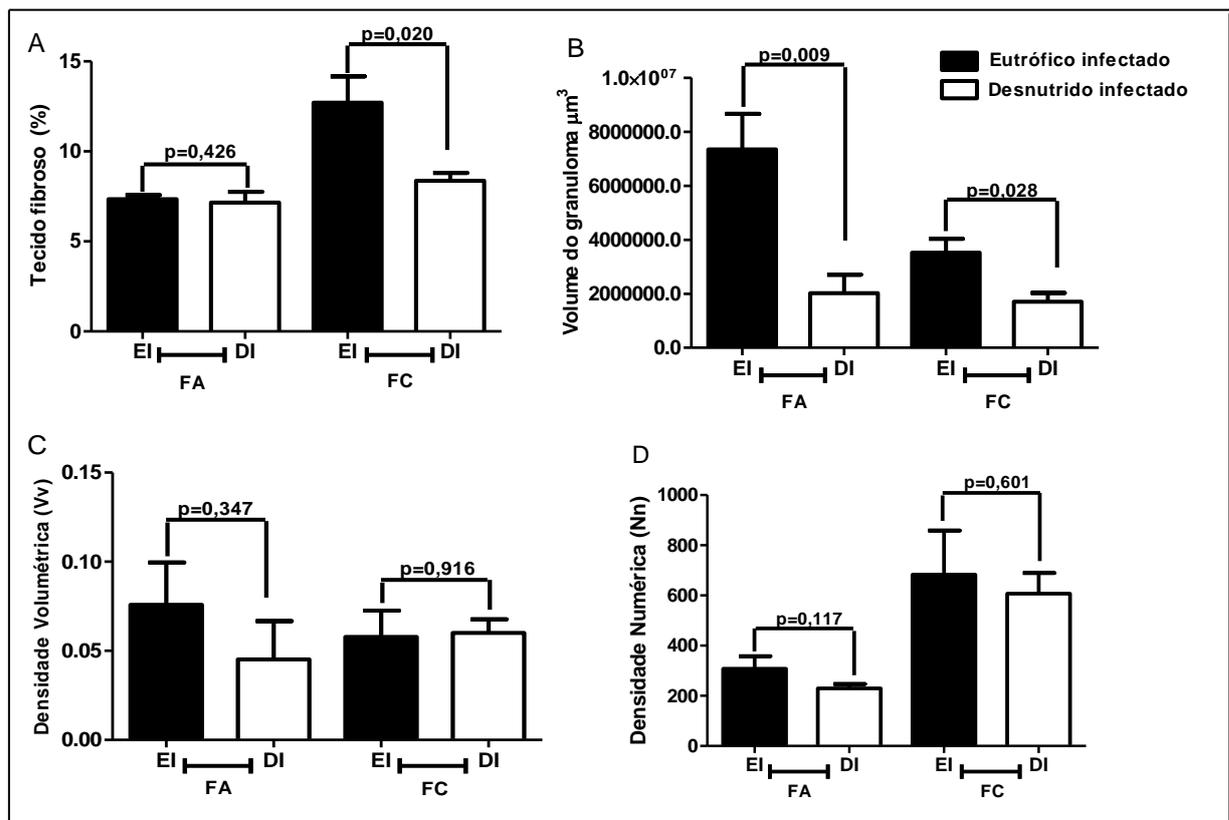
A comparação dos percentuais de tecido fibroso hepático (figura 7A), após análise morfométrica, entre os grupos DI e EI, na fase aguda da infecção, não revelou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,426$). Na fase crônica, no entanto, o grupo DI apresentou percentual de tecido fibroso significativamente menor que o do grupo EI ($p = 0,020$) – dados não mostrados. Na comparação entre os grupos eutróficos, (infectado e seu controle não-infectado), esses camundongos apresentaram quantidade de tecido fibroso mais elevada e estatisticamente significativa ($p = 0,011$) na fase crônica, quando comparados aos grupos EI na fase aguda, o que, todavia, não ocorreu entre os grupos desnutridos ($p = 0,106$).

A morfometria também revelou que os granulomas do grupo DI eram menos volumosos (figura 7B), em comparação com os granulomas dos grupos EI, havendo diferença significativa na fase aguda ($p = 0,009$) e na fase crônica ($p=0,028$). Houve redução significativa dos granulomas no grupo eutrófico na fase crônica (modulação imunológica) quando comparado ao grupo EI na fase aguda. Na comparação entre os animais do grupo DI na fase aguda e na fase crônica, notou-se também redução de volume na fase crônica, porém sem diferença significativa ($p = 0,918$).

A medida da densidade volumétrica (Figura 7C) não mostrou diferença significativa entre os grupos EI e DI, tanto na fase aguda ($p = 0,347$) como na fase crônica ($p = 0,916$) da infecção. Quando a comparação foi realizada entre os grupos EI de fase aguda e fase crônica, também não houve diferença estatística ($p = 0,464$), o mesmo ocorrendo quando os grupos DI (ambas as fases) foram comparados entre si ($p = 0,615$).

Quanto ao parâmetro densidade numérica (Figura 7D), não houve diferença significativa quando o grupo EI e o grupo DI foram comparados entre si, tanto na fase aguda como crônica da infecção, com valores de $p = 0,117$ e $p = 0,601$, respectivamente. Contudo, quando o grupo EI de fase aguda foi comparado com o de fase crônica, houve diferença significativa ($p = 0,047$), o mesmo ocorrendo ($p = 0,009$) quando o grupo DI, fases aguda e crônica, foram confrontados.

Figura 7- Quantificação morfométrica do colágeno hepático e outros parâmetros, em camundongos desnutridos (DI) e eutróficos (EI), nas fases aguda (FA) e crônica (FC) da esquistossomíase mansônica.



Fonte: Dados do autora

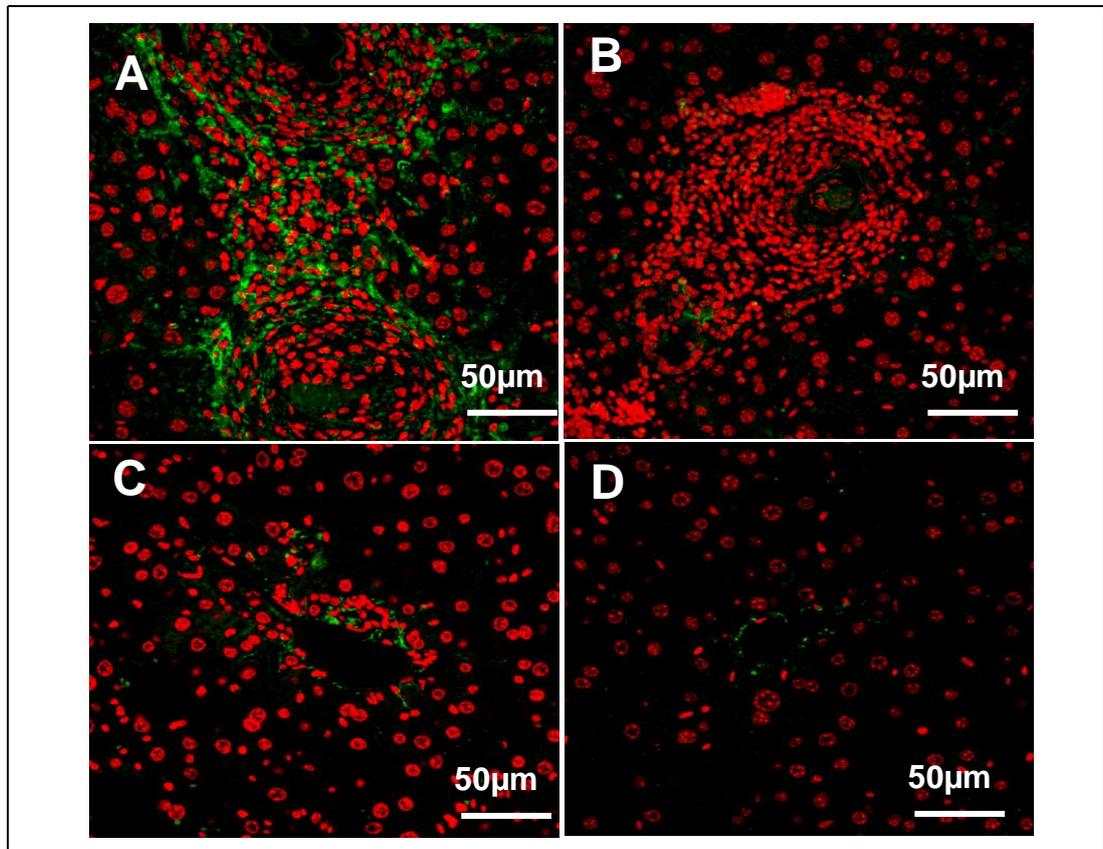
Nota: A = % tecido fibroso; B = Volume dos granulomas; C = Densidade Volumétrica e D = Densidade Numérica. Foram calculados $\bar{X} \pm DP$ (A) e $Md \pm DM$ (B, C e D) de dez animais por grupo, em três experimentos. $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

7.4.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA COLÁGENO TIPO I

A avaliação da quantidade de colágeno I no tecido hepático dos animais, na fase crônica, após imunomarcagem (Figura 8), revelou expressão mais elevada dessa proteína, em áreas de tecido fibroso granulomatoso, no grupo EI (marcação em verde), ao contrário do que foi verificado no grupo DI (Figura 8A e B). As diferenças observadas entre os grupos infectados EI e DI, quanto à deposição de colágeno I (Figura 9), foram estatisticamente significativas ($p = 0,0001$). Nos grupos sem infecção, só foi possível visualizar marcações nas paredes dos vasos hepáticos (Figura 8C e D).

O percentual de área com imunomarcagem para a expressão de colágeno I no fígado no grupo EI, foi elevada e significativa ($p = 0,0001$), em comparação com seu controle não infectado ENI. Não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,689$) entre os grupos desnutridos DI e DNI, diferença significativa foi encontrada quando o grupo DI foi comparado com o EI ($p = 0,0001$) - Figura 9.

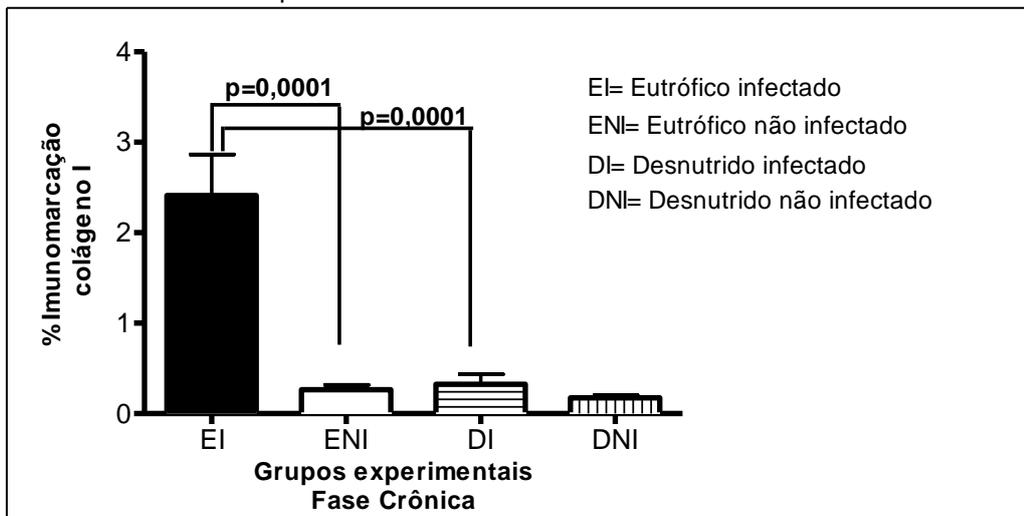
Figura 8 - Imunomarcção por Alexa fluor 488 para colágeno I (verde), no fígado de camundongos cronicamente infectados por *S. mansoni*, pela técnica da imunofluorescência indireta. Núcleos celulares corados com TO- PRO 3 (vermelho).



Fonte: Dados da autora.

Legenda: A = Camundongo eutrófico, infectado; B = Camundongo desnutrido, infectado; C = Camundongo eutrófico, não infectado e D = Camundongo desnutrido, não infectado.

Figura 9 - Percentual de área com imunomarcção positiva para colágeno tipo I, na fase crônica da infecção por *S. mansoni*, em fígado de camundongos eutróficos ou desnutridos e seus respectivos controles.



Fonte: Dados da autora

Nota: Foram calculados $\text{Md} \pm \text{DM}$ de dez animais por grupo, em três experimentos. $p \leq 0,05$ foi considerado significativo

7.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA CÉLULAS ESTRELADAS HEPÁTICAS (HSCs)

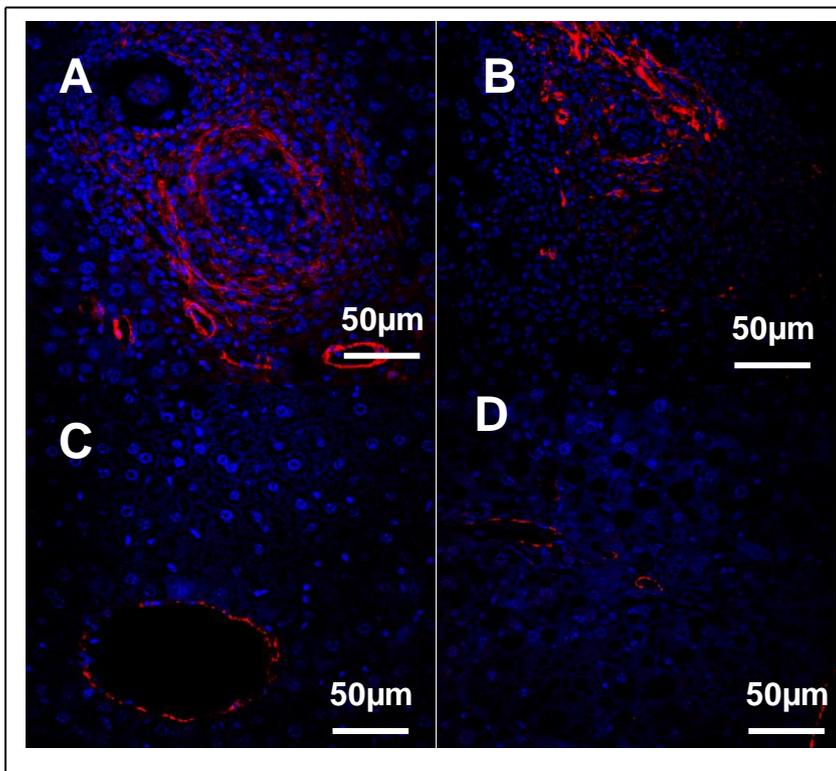
Marcações positivas (cor vermelha) para alfa actina de músculo liso (α -SMA), foram obtidas em granulomas que se formaram em torno de ovos ou cascas de ovos de *S. mansoni* no fígado, bem como nas paredes de vasos sanguíneos, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção (Figura 10A e B). Nos animais eutróficos e nos desnutridos controles (sem infecção), a marcação só ocorreu em vasos hepáticos (Figura 10C e D).

Não houve diferença significativa ($p = 0,268$) na comparação do resultado do percentual de imunomarcação para α -SMA entre os grupos EI e DI na fase aguda. Diferença estatística ($p = 0,0001$), porém, foi vista quando o grupo EI foi comparado com o seu controle ENI, o mesmo ocorrendo na comparação do DI com seu controle DNI ($p = 0,0001$). (Figura 11A).

Na fase crônica da infecção, a quantidade de células expressando α -SMA foi bastante similar ao que foi visto na fase aguda. O grupo EI, ao ser comparado com o DI, não apresentou diferença significativa ($p = 0,10$). Diferença significativa ($p = 0,0001$) foi encontrada quando o EI foi comparado com o seu controle ENI, ocorrendo diferença significativa, também, ($p = 0,0001$) na comparação entre o grupo DI e o seu controle DNI (Figura 11B).

Comparando-se os resultados da imunomarcação para α -SMA nos grupos infectados EI e DI, confrontando-se as fases da doença (isto é, EI fase aguda x EI fase crônica e DI fase aguda x DI fase crônica), observou-se que EI ($p = 0,0002$) e DI ($p = 0,0001$) apresentaram percentual mais elevado e estatisticamente significativo na fase aguda da infecção, em comparação com a fase crônica, denotando maior proliferação e ativação de células estreladas hepáticas (HSCs) nessa fase. Todavia, essa multiplicação celular foi praticamente equivalente em camundongos desnutridos e/ou eutróficos de ambas as fases infectados com *S. mansoni*. (Figura 11 A e B).

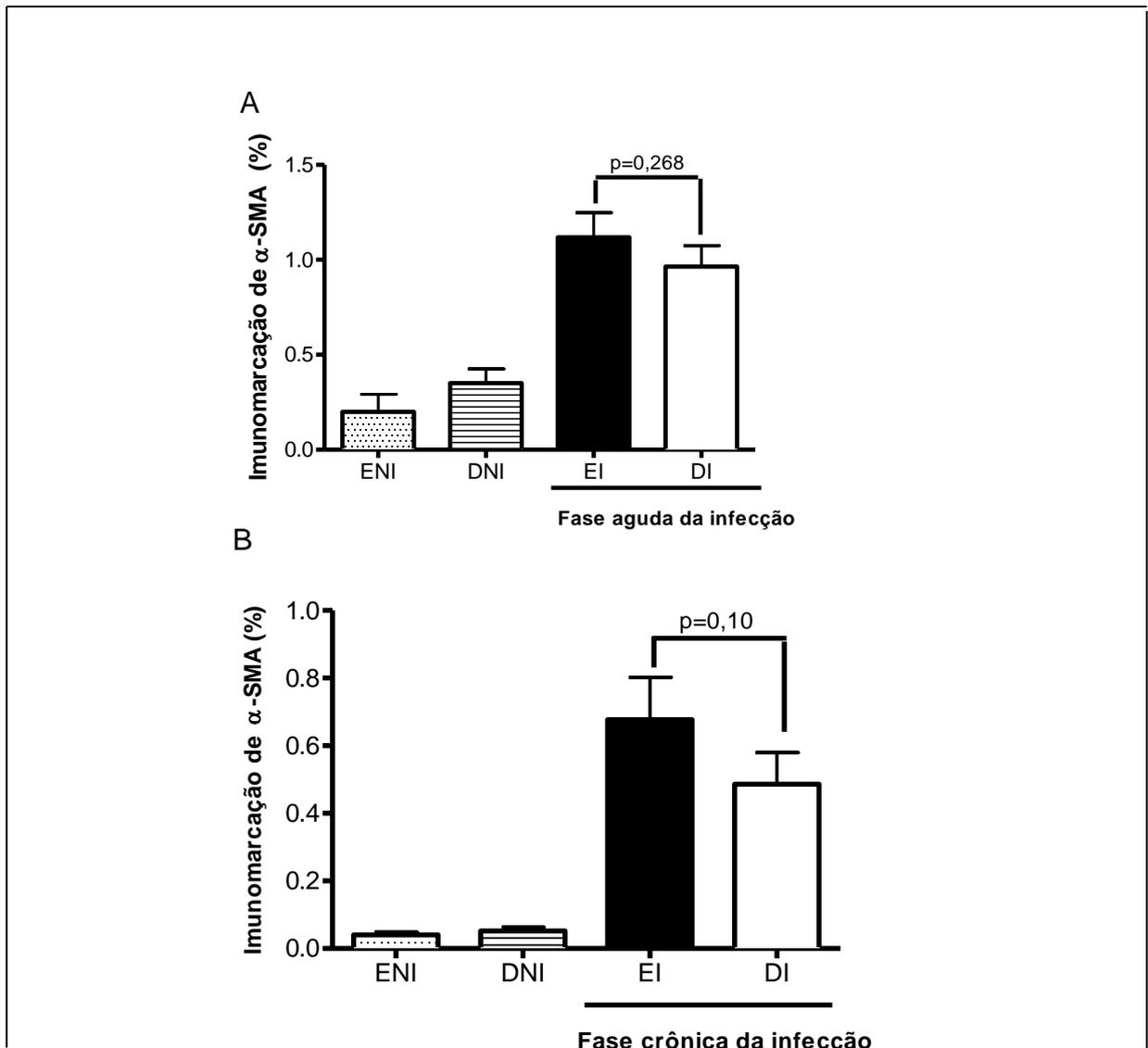
Figura 10 - Imunomarcção por Alexa-fluor 647 para alfa-actina de músculo liso (α -SMA), em miofibroblastos (vermelho) e paredes vasculares, no fígado de camundongos cronicamente infectados pelo *S.mansoni*.



Fonte: Dados da autora

Legenda: A = eutrófico, infectado com *S.mansoni*; B = desnutrido, infectado com *S. mansoni*; C = eutróficos, não infectados e D = desnutridos, não infectados.

Figura 11 - Percentual de imunomarcção positiva para α -SMA em células estreladas ativadas (miofibroblastos), nas fases aguda e crônica da infecção por *S. mansoni*, em camundongos eutróficos ou desnutridos e seus respectivos controles.



Fonte: Dados da autora.

Legenda: ENI= eutrófico não infectado; DNI= desnutrido não infectado; EI= eutrófico infectado; DI= desnutrido infectado.

Nota: Foram calculados $\bar{M}d \pm DM$ de dez animais por grupo, em três experimentos.

$p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

7.6 RESPOSTA IMUNE CELULAR

7.6.1 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE MMP-9, TIMP-1, TGFB1, IL-4, IL-13, IL-17 E IL-23

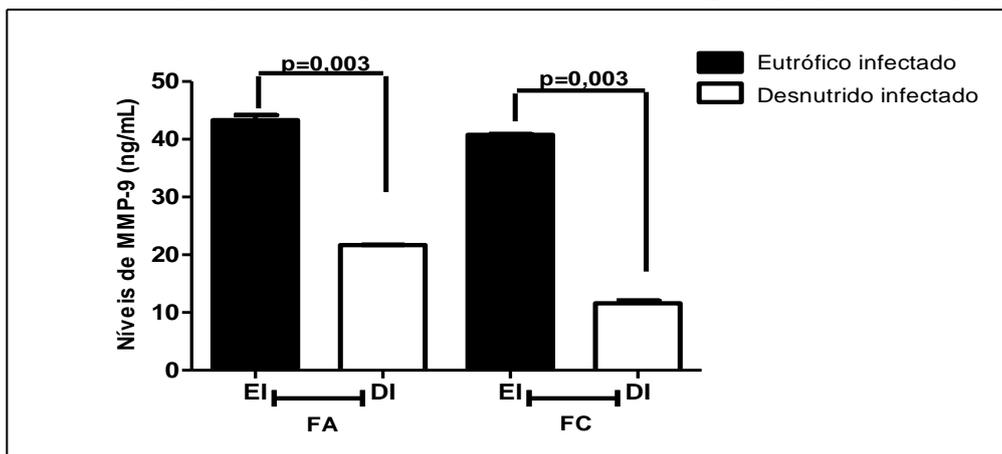
A cinética de produção foi estudada após 24, 48, 72 e 120h de cultura após estímulo com ConA, para detectar qual o melhor tempo de produção de MMP-9,

TIMP-1, TGF β 1 e das interleucinas 4, 13, 17 e 23, em cultura de células esplênicas, nas fases aguda e crônica da infecção. O critério de escolha do melhor tempo de produção - foi tomando como referência o grupo “eutrófico infectado – EI”. Portanto, verificou-se que o melhor tempo de produção da MMP-9, TIMP-1 e das citocinas IL-4, IL-13, IL-17 e IL-23 foi de 72h e para a citocina TGF- β 1, foi de 24h.

7.6.2 PRODUÇÃO DA ENZIMA DA MATRIZ EXTRACELULAR METALOPROTEINASE 9 (MMP-9)

Foi realizada a comparação dos níveis de metaloproteinase 9 (MMP - 9) entre os grupos DI e EI (fase aguda), e entre DI e EI (fase crônica). Níveis menos elevados e estatisticamente significativos ($p = 0,003$) foram vistos nos grupos DI, em ambas as fases. Ao comparar-se a produção dessa enzima entre os grupos EI, o nível mais elevado e estatisticamente significativo ($p = 0,003$) foi encontrado no EI da fase aguda. Na mesma análise realizada entre os grupos DI, a produção da MMP - 9 encontrava-se mais elevada e estatisticamente significativa ($p = 0,003$) também na fase aguda (Figura 12).

Figura 12 - Níveis de metaloproteinase 9 (MMP-9), após 72h, no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) ou eutróficos (EI), infectados pelo *S. mansoni*, nas fases aguda (FA) e crônica (FC).



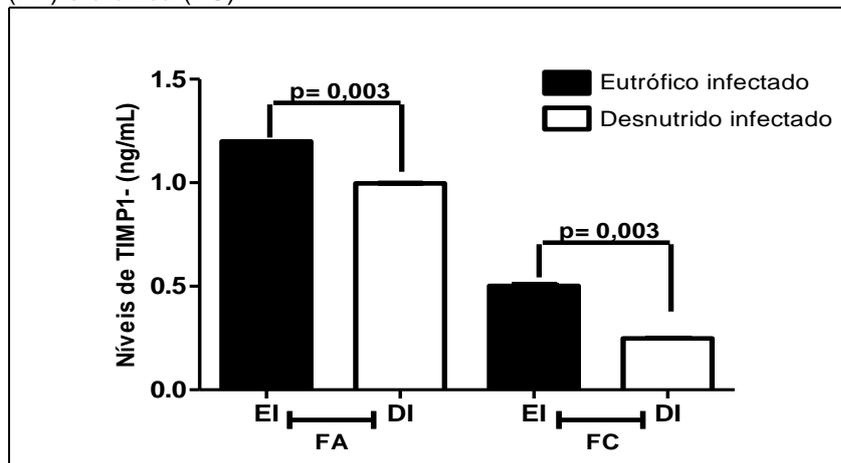
Fonte: Dados da autora.

Nota: Os níveis produzidos em cada grupo foram mensurados por ELISA de captura, em duplicata. Os esplenócitos foram obtidos a partir de um experimentos “pool” de três baços por grupo de animais, sendo cultivados na concentração de 5×10^6 células/ mL, e estimulados com SEA (20 μ g/mL). Os resultados expressam Md \pm DM da duplicata e são representativos de três experimentos. $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

7.6.3 PRODUÇÃO DO INIBIDOR TECIDUAL DE METALOPROTEINASE -TIMP-1

A comparação entre os grupos DI e EI na fase aguda e na fase crônica, mostrou níveis de TIMP-1 menores e significativos ($p = 0,003$) nos grupos DI de ambas as fases. Quando a produção do inibidor foi comparada entre os grupos DI, o nível de TIMP-1 se revelou mais elevado e significativo no grupo da fase aguda ($p = 0,003$). O mesmo resultado ocorreu na comparação efetuada entre os grupos EI, cuja maior produção de TIMP-1 ocorreu, também, na fase aguda, com valor significativo de $p = 0,003$ (figura 13).

Figura 13 - Níveis de produção, após 72h, do inibidor de metaloproteinase TIMP-1, detectados no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos isogênicos C57BL/6, desnutridos (DI) ou eutróficos (EI) infectados pelo *S. mansoni*, nas fases aguda (FA) e crônica (FC).



Fonte: Dados da autora.

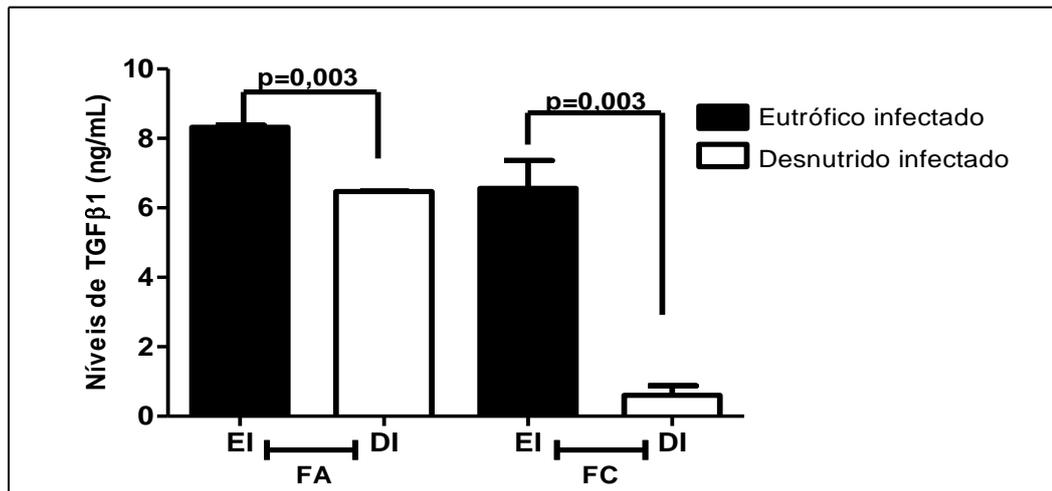
Nota: Os esplênocitos foram obtidos a partir de um "pool" de três baços por grupo de animais, utilizados numa concentração de 5×10^6 células/mL, e estimulados com SEA ($20 \mu\text{g/mL}$). Os níveis produzidos em cada grupo foram mensurados por ELISA de captura, em duplicata. Os resultados expressam a $Md \pm DM$ da duplicata são representativos de três experimentos. $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

7.6.4 PRODUÇÃO DA CITOCINA TGF- β 1 (FATOR DE TRANSFORMAÇÃO DO CRESCIMENTO β 1)

Os grupos DI e EI na fase aguda, foram comparados entre si, assim como foi feito com os grupos DI e EI, na fase crônica. Os camundongos desnutridos mostraram níveis de TGF- β 1 significativamente mais baixos, sobretudo na fase crônica ($p = 0,003$). Na comparação entre os grupos DI, os níveis de TGF- β 1 foram mais elevados na fase aguda, embora menores do que os do grupo eutrófico,

reduzindo-se, drasticamente, na fase crônica. Nos animais eutróficos, a produção dessa citocina foi sempre mais elevada (Figura 14).

Figura 14 - Níveis de produção, após 24h, do fator de transformação do crescimento (TGF- β 1) detectados no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) ou eutróficos (EI), infectados pelo *S. mansoni*, nas fases aguda (FA) e crônica (FC).



Fonte: Dados da autora

Nota: Os esplenócitos foram obtidos a partir de um "pool" de três baços por grupo de animais, e utilizados numa concentração de 5×10^6 células/mL, estimuladas com SEA (20 μ g/mL). Os níveis da citocina produzidos em cada grupo foram mensurados por ELISA de captura, em duplicata. Os resultados expressam a Md \pm DM da duplicata e são representativos de três experimentos. $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

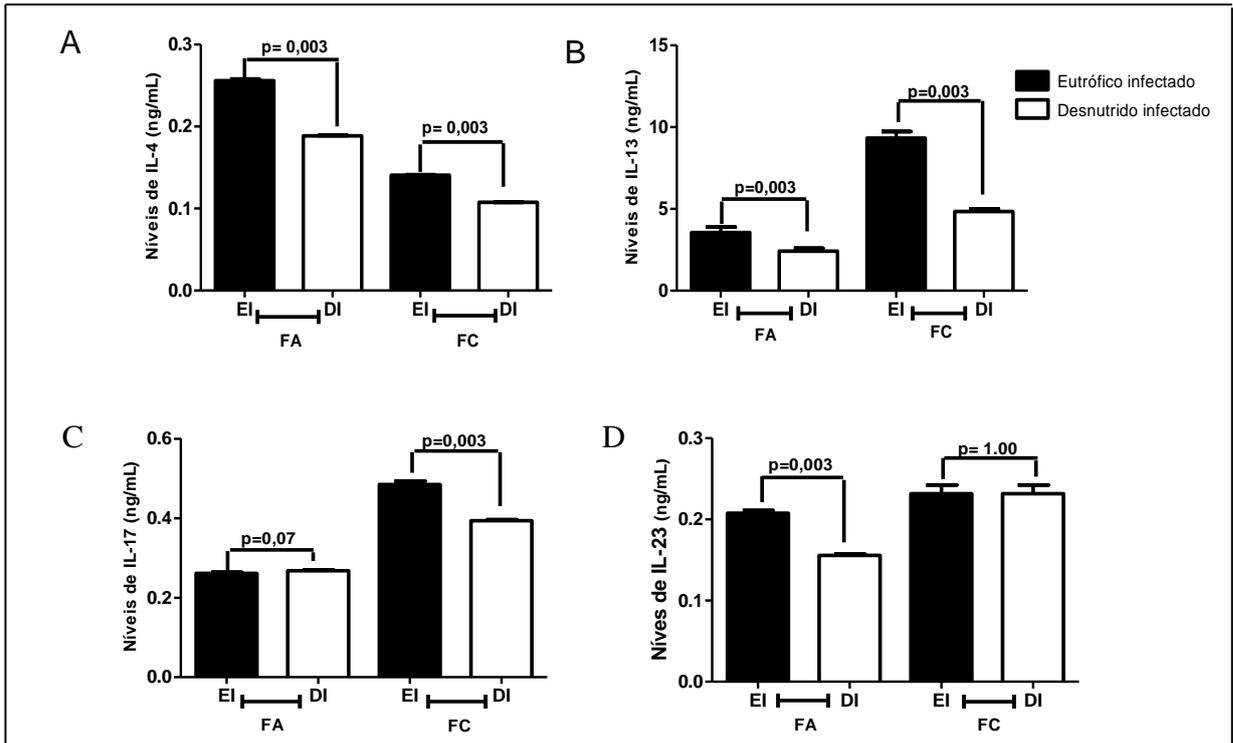
7.6.5 PRODUÇÃO DAS INTERLEUCINAS: IL-4, IL-13, IL-17 e IL-23

A produção de IL-4 foi significativamente menor nos grupos desnutridos (DI) em comparação com os eutróficos (EI), nas fases aguda e crônica ($p = 0,003$). Tanto em camundongos desnutridos como em eutróficos, os níveis dessa citocina mostraram redução significativa com a progressão da infecção para a fase crônica ($p = 0,003$) – (Figura 15A). A produção de IL-13, em ambos os grupos (desnutridos e eutróficos) foi menor na fase aguda e substancialmente maior na fase crônica. Camundongos eutróficos mostraram valores sempre mais elevados do que camundongos desnutridos, em ambas as fases da infecção ($p = 0,003$)- Figura 15B.

A produção de IL-17 foi maior na fase crônica da infecção, com valores sempre mais elevados no grupo dos eutróficos ($p = 0,003$). Não houve diferença entre os grupos EI e DI, na fase aguda da infecção com $p = 0,009$ (Figura 15C). A produção de IL-23 mostrou-se igualmente elevada na fase crônica, em camundongos desnutridos (DI) e eutróficos (EI) com $p = 1,00$. Nos animais eutróficos,

a síntese dessa citocina praticamente não sofreu alteração entre as fases aguda e crônica, ocorrendo elevação significativa entre as fases no grupo desnutrido ($p = 0,003$) - Figura 15D.

Figura 15 - Níveis de produção, após 72h, da interleucina 4, 13, 17 e 23 detectados no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) ou eutróficos (EI), infectados pelo *S. mansoni*, nas fases aguda (FA) e crônica (FC).



Fonte: Dados da autora.

Legenda: A= Níveis de IL-4; B= Níveis de IL-13; C= Níveis de IL-17; Níveis de IL-23.).

Nota: Os esplenócitos foram obtidos a partir de um "pool" de três baços por grupo de animais e utilizados numa concentração de 5×10^6 células/ mL, estimuladas com SEA ($20 \mu\text{g/mL}$). Os níveis da citocina produzidos em cada grupo foram mensurados por ELISA de captura, em duplicata. Os resultados expressam a $Md \pm DM$ da duplicata e são representativos de três experimentos.

$p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

8 DISCUSSÃO

Dentre as patologias crônicas do fígado, as hepatopatias fibrosantes se destacam por sua importância e gravidade, representando problema de saúde pública em diferentes regiões do mundo (ANTHONY et al., 2010). Podem resultar de etiologias diversas, inclusive parasitárias, como é o caso da esquistossomíase mansônica, de elevada prevalência em Pernambuco e no nordeste do Brasil (COUTINHO et al., 1997b; GOMES et al., 2012). Nessa parasitose, o fígado é o órgão onde se desenvolve, na fase crônica, a lesão mais grave, representada por excessiva deposição de tecido fibroso nos granulomas formados em torno dos ovos do parasito, os quais, por coalescência, conduzem à formação de extensas placas de tecido conjuntivo em torno de ramos da veia porta, nos espaços portais do fígado (BOGLIOLO, 1957), caracterizando a denominada fibrose periportal, fibrose de Symmers ou *pipestem fibrosis* (fibrose em forma de “cachimbo de barro”).

Nas últimas décadas, numerosos estudos têm contribuído para um maior entendimento acerca dos mecanismos patogênicos e repercussões fisiopatológicas da fibrogênese nas hepatopatias fibrosantes, passando a fibrogênese a ser considerada como um processo muito mais dinâmico, complexo e multifatorial, inclusive no caso da fibrose encontrada na esquistossomíase mansônica crônica (ANDRADE, 2009). A comprovação da reversibilidade do processo, tanto no caso da fibrose periportal da esquistossomíase (ANDRADE, 2005, 2009), como em hepatopatias fibrosantes de outras etiologias, abriu novas perspectivas em relação a estratégias de tratamento e monitoramento da evolução do processo.

O quadro da associação mórbida desnutrição / esquistossomíase em modelo experimental (camundongo), mimetizando o que ocorre, em condições naturais, em áreas endêmicas, permitiu o estudo de vários fatores envolvidos no mecanismo da fibrogênese hepática e das relações do estado nutricional do hospedeiro com esses fatores e com a biologia do próprio parasito (COUTINHO et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2003).

O desenvolvimento de um modelo experimental murino, baseado em infecções de pequena intensidade e longa duração, que reproduz, morfológicamente, a fibrose *pipestem* do homem no camundongo eutrófico (ANDRADE; WARREN, 1964; ANDRADE; CHEEVER, 1993), foi de fundamental

importância para o aprofundamento dos conhecimentos sobre a fibrose humana de Symmers.

Além dos já conhecidos efeitos negativos sobre o crescimento e morfologia dos parasitos (NEVES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003), relatados na literatura, a deficiência dietética de proteína e outros nutrientes provocou alterações na quantidade, maturação e viabilidade dos ovos de *S. mansoni*, reveladas através da técnica do oograma, além de redução da quantidade de parasitos. Admite-se que alguns parasitos sejam capazes de desenvolver uma forma de adaptação fisiológica que lhes permite a sobrevivência, apesar da pequena disponibilidade de nutrientes essenciais no microambiente do hospedeiro (ING et al., 2000).

Alterações morfométricas no oviducto e glândulas vitelínicas foram relatadas em esquistossomos obtidos de camundongos desnutridos (ERASMUS, 1973; OLIVEIRA et al., 2003), o que explica, no presente trabalho, a eliminação de ovos com defeito de maturação, ou mesmo, de ovos inviáveis/mortos em camundongos desnutridos. Como foi mencionado na introdução desta tese, camundongos desnutridos não conseguem desenvolver o equivalente murino da fibrose de Symmers (COUTINHO et al., 1997a), apesar das diferentes abordagens utilizadas para aparecimento dessa lesão (COUTINHO, 2004; COUTINHO et al., 2003, 2007).

Os dados obtidos na presente investigação demonstram, mais uma vez, que a desnutrição do hospedeiro teve repercussão sobre o crescimento dos animais, sobre a carga parasitária, sobre a viabilidade e maturação dos ovos de *S. mansoni*, reduzindo a produção de tecido fibroso (colágeno I) no fígado e a síntese de TGF- β 1, IL-4 e IL-13, interferindo na fibrogênese hepática granulomatosa e portal, na esquistossomíase mansônica.

Dentre os fatores envolvidos na fibrogênese do fígado as HSCs parecem desempenhar importante papel, devido à sua capacidade proliferativa, transformando-se em miofibroblastos e induzindo a síntese do colágeno da matriz extracelular (FRIEDMAN, 1993, 2003, 2008a, 2008b; GEA; FRIEDMAN, 2011; GRESSNER; WEISKIRCHEM, 2006; ENG; FRIEDMAN, 2000). Na esquistossomíase experimental em camundongos desnutridos, porém, essas células sofreram ativação e transdiferenciação em miofibroblastos em proporção equivalente à dos animais eutróficos, não parecendo exercerem papel relevante para explicar o não desenvolvimento da fibrose *pipestem* no grupo desnutrido, no qual se esperaria encontrar menor proporção de miofibroblastos após marcação pela α -SMA. Assim

sendo, o estado nutricional do hospedeiro, deficiente ou não, não guardou relação com a proliferação e/ou diferenciação dessas células.

As relações do estado nutricional com os elementos envolvidos na modulação do colágeno hepático (síntese x degradação) também foram apreciadas na presente investigação. Dados da literatura informam que a regulação dos processos de fibrogênese x fibrólise é efetuada pelas metaloproteinases (MMPs), sobretudo a MMP-9 e seus inibidores, particularmente o TIMP-1 e que essa produção é antagonista (FRIEDMAN, 2008a, 2008b; FRIEDMAN, 2013).

Comparando-se os níveis de MMP-9 e TIMP-1 entre os grupos EI e DI de mesma fase e/ou de fases da infecção diferentes, observaram-se níveis significativamente mais baixos dessa enzima e do seu inibidor nos grupos de camundongos desnutridos, o que poderia representar mais um efeito negativo ligado à condição de desnutrição dos animais. Observou-se, também, que a produção de MMP-9 foi diretamente proporcional à produção de TIMP-1, em contraposição aos trabalhos de Friedman (2013), porém confirmando resultados obtidos por outros autores (YUE et al., 2011).

No modelo murino eutrófico, a literatura registra a ocorrência de níveis elevados de MMP-9 na fase aguda da infecção esquistossomótica, paralelamente à síntese de colágeno depositado nos granulomas periovulares maduros (LEUNG et al., 2011). Camundongos desnutridos infectados apresentaram níveis mais baixos de MMP-9 e TIMP-1 em relação aos animais eutróficos, nas fases aguda e crônica da parasitose, com reduzida deposição de tecido fibroso no fígado desses animais. A relação entre TIMP-1 e colágeno I foi positiva em ambas as fases, nos camundongos eutróficos; e negativa nos desnutridos, podendo ter sofrido os efeitos da deficiência proteica dietética.

O “fator de transformação de crescimento” (TGF- β 1), uma das citocinas estudadas, é importante na ativação e transdiferenciação das células estreladas hepáticas em miofibroblastos (KISSELEVA; BRENNER, 2012), na expressão de α -SMA nessas células, sendo, ainda, fator indutor da síntese de colágeno I (BATALLER; BRENNER, 2005; FRIEDMAN, 2008b; KISSELEVA; BRENNER, 2012). Todavia, a IL-13 é a citocina efetora dominante no processo da fibrogênese associada à esquistossomíase e também induz a produção de TGF- β 1 pelas células estreladas (KAVIRATNE, 2004).

Nos camundongos desnutridos, os baixos níveis de TGF- β 1 também podem ter influenciado a fibrogênese hepática, apesar de Kaviratne et al. (2004) terem demonstrado que a fibrogênese na esquistossomíase pode não guardar relação com TGF- β 1, dependendo exclusivamente da IL-13. No presente estudo, a reduzida produção das citocinas TGF- β 1, IL-4 e IL-13 estaria associada à deficiência proteica dietética e teria influenciado a significativa redução da síntese de colágeno I nos camundongos desnutridos. E, provavelmente, apesar de sua produção diminuída, mecanismos de sinalização dependentes da IL-13 foram responsáveis pela indução da síntese de TGF- β 1 e outros fatores fibrogênicos, pelas células estreladas (KAVIRATNE et al., 2004).

A produção de ovos pelos vermes adultos estimula uma forte resposta Th2, representada por níveis elevados de IL-4 e IL-13 (PEARCE et al., 1991; STADECKER et al., 2004). No presente estudo, observou-se que os níveis de IL-13 foram mais elevados na fase aguda, em relação à IL-4, ocorrendo comportamento semelhante na fase crônica da infecção. Este fenômeno deve ter ocorrido devido às funções efetoras de cada citocina serem semelhantes, inclusive no que se refere à produção de tecido fibroso, sendo a IL-13 considerada um mediador primário da fibrogênese hepática (CHIARAMONTE et al., 2001; HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002). No entanto, a contribuição da IL-4 para o desenvolvimento da fibrose na esquistossomíase é controversa (CHEEVER et al., 1994; PEARCE et al., 1996). Chiaramonte et al. (2001) demonstraram que a expressão de IL-4 é mantida em camundongos deficientes em IL-13, porém ela é incapaz de repor a atividade fibrogênica da IL-13 durante a infecção esquistossomótica.

A escassez de publicações sobre as citocinas IL-17 e IL-23, sobretudo em modelos experimentais esquistossomóticos desnutridos, dificultaram o entendimento do seu papel em relação à parasitose e à desnutrição do hospedeiro. A produção de IL-17 foi significativamente inferior no grupo desnutrido, na fase crônica da parasitose. Sabe-se que o TGF- β 1 e a IL-6 são citocinas importantes para a diferenciação das células produtoras de IL-17 (WEAVER et al., 2006). No entanto, na ausência de TGF- β 1, uma combinação de IL-1, IL-6 e IL-23 pode induzir a produção de IL-17 (GHORESCHI et al., 2010). Por outro lado, essa citocina, em camundongos eutróficos, pode estimular diretamente a produção de TGF- β 1 e colágeno tipo I pelas células estreladas hepáticas (MENG et al., 2012), o que parece

ter ocorrido em nossa investigação, onde os camundongos desnutrido DI, apesar da significativa redução na produção de TGF- β 1, foram capazes de sintetizar IL-17 em níveis semelhantes (fase aguda) ou significativamente inferiores aos dos animais eutróficos (fase crônica).

Quanto à IL-23 ela parece atuar, principalmente, nas células CD4⁺ (Th 17) efetoras, induzindo a secreção de IL-17 (AGGARWAL et al., 2003; OPPMANN et al., 2000). Com efeito, em ambas as fases da infecção, a síntese de IL-17 esteve atrelada à produção de IL-23, confirmando o que se acha registrado na literatura (OPPMANN, 2000).

De acordo com Rutitzky et al. (2008), a IL-23 seria um fator crítico que contribui para exacerbação da esquistossomíase, favorecendo a produção de IL-17 e restringindo efeitos regulatórios da IL-10, provocando a liberação de citocinas pró-inflamatórias e recrutamento de neutrófilos.

Em nossos experimentos, a IL-23 não teve papel relevante na imunopatologia da associação mórbida desnutrição/esquistossomíase. Mais recentemente, outros fatores vêm sendo descritos como também sendo capazes de alterar os mecanismos envolvidos na fibrogênese hepática. O Fator de Crescimento de Tecido Conjuntivo (CTGF) tem sido considerado como mais um importante modulador do processo de fibrogênese (GRESNER; GRESNER, 2008, GRESNER et al., 2009). O TGF- β 1 estimula a produção de CTGF, primariamente nos hepatócitos (GRESNER et al., 2007). Alguns autores afirmam que a expressão de CTGF pelas células estreladas pode ser induzida por mecanismo independente, como IL-13 (GRESNER et al., 2007; LIU et al., 2011; WENG et al., 2009), a qual agiria ativando as células estreladas por sinalização via Erk-MAPK (*mitogen-activated protein kinase*).

Com base nos resultados obtidos na presente investigação, podemos deduzir, considerando os aspectos morfológicos, bioquímicos, parasitológicos, imunológicos e imunopatológicos aqui apresentados, que a desnutrição repercutiu sobre o crescimento do hospedeiro, a carga parasitária, a maturação e viabilidade dos ovos de *S. mansoni*, restringindo, também, a síntese do colágeno tipo I e a produção das citocinas TGF- β 1, IL-4, IL-13, IL-17 e IL-23, interferindo, portanto, nos mecanismos e processos relacionados com a fibrogênese hepática no camundongo esquistossomótico desnutrido.

9 CONCLUSÕES

Com base nos dados muriométricos, parasitológicos, morfológicos, morfométricos, bioquímicos, imunológicos e imunopatológicos aqui apresentados, pode-se concluir que:

- a) A desnutrição associada à infecção pelo *Schistosoma mansoni* repercutiu sobre o crescimento do hospedeiro, no modelo murino utilizado, bem como sobre a carga parasitária, a viabilidade e maturação dos ovos do parasito;
- b) A associação mórbida esquistossomíase/desnutrição influenciou, negativamente, a fibrogênese hepática, com acentuada redução da síntese de colágeno I, principal componente do tecido fibroso;
- c) A ativação das células hepáticas estreladas (HSCs) e sua transdiferenciação em miofibroblastos ocorreu independentemente do estado nutricional do hospedeiro, porém em proporção equivalente entre camundongos desnutridos ou eutróficos, não parecendo desempenhar papel relevante nessa associação mórbida;
- d) A deficiência protéica dietética provocou redução da síntese de citocinas pró-fibrogênicas, particularmente TGF- β 1, IL-4 e IL-13, nos camundongos infectados desnutridos;
- e) Camundongos infectados desnutridos também mostraram níveis mais baixos de IL-17 e IL-23, cujas alterações sugeriram uma interrelação comportamental entre elas, embora o seu papel, na esquistossomíase, ainda não esteja completamente esclarecido;
- f) A ausência de fibrose periportal em camundongos esquistossomóticos desnutridos, também evidenciada na presente investigação, pode ser explicada por alterações da fibrogênese hepática, que guardaram relação com a reduzida síntese de colágeno e a deficiente produção de importantes citocinas pró-fibrogênicas (sobretudo TGF- β 1 e IL-13), alterações estas dependentes do estado de má – nutrição do hospedeiro.

REFERÊNCIAS

- 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, 2006.
- AGGARWAL, S. et al. Interleukin-23 Promotes a Distinct CD4 T Cell Activation State Characterized by the Production of Interleukin-17. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 3, p. 1910 – 1914, 2003.
- ANDRADE Z. A; OLIVEIRA-FILHO, J.; FERNANDES, A. L. Interrelationship between adipocytes and fibroblasts during acute damage to the subcutaneous adipose tissue of rats: an Ultrastructural study. **Revista Brasileira de Pesquisas Medicas**, São Paulo, v. 31, n. 5, p. 659 - 664, 1998
- ANDRADE, Z. A. Extracellular matrix and schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 61 – 73, 1991.
- ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of “pipestem” fibrosis of the liver experimental observation on murine schistosomiasis). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n.3, p. 325 – 334, 1987.
- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 514 – 520, 2005.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and liver fibrosis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, p. 656 – 663, 2009.
- ANDRADE, Z. A.; CHEEVER, A. W. Characterization of the murine model of schistosomal hepatic periportal fibrosis (“pipestem” fibrosis). **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 74, n. 2, p.195 - 202, 1993.
- ANDRADE, Z. A.; WARREN, K. S. Mild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Transaction Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, Londres, v. 58, p. 53 - 57, 1964.
- ANTHONY, B. et al. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. **Parasites & Vectors**, Londres, v. 3, n. 60, p. 1 - 7, 2010.
- ARAÚJO, K.C.G.M. et al. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 409 – 418, 2007.
- ARTHUR, M. J. P. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 279, p. 245 – 249, 2000.

ATINMO, T. et al. Breaking the poverty/malnutrition cycle in Africa and the Middle East. **Nutrition Reviews**, New York, v. 67, Suppl. 1, p. 40 – 46, 2009.

BAKER, A. H.; EDWARDS, D. R.; MURPHY, G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. **Journal of Cell Science**, London, v. 1, n. 19, p. 115 - 119, 2002.

BARANOVA, A. et al. Non-Invasive markers for hepatic fibrosis. **BMC Gastroenterology**, London, v.11, n. 91, p.1 - 15, 2011.

BARBOSA JR., A. A.; PFEIFER, U.; ANDRADE, Z. A. Role of fat- storing cells in schistosomal hepatic fibrosis of mice. **Virchows Archive B - Cell Pathology**, Berlim, v. 64, p. 91 - 96, 1993.

BARBOSA, C. S. et al. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, supl. 1, p. 55 – 62, 2006.

BARBOSA, C. S. et al. Urban schistosomiasis in Itamaracá island, Brazil: epidemiological factors involved in the recent endemic process. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, n.1, p. 265 – 266, 1998.

BARBOSA, C. S. **Esquistossomose em Pernambuco**: determinantes bio-ecológicos e sócio-culturais em comunidade de pequenos agricultores da Zona da Mata. 1996. Tese (Doutorado) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1996.

BARBOSA, C. S. ; SILVA, C. B.; BARBOSA, F. S. Schistosomiasis: reproduction and expansion of the endemia to the state of Pernambuco in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 609 - 616, 1996.

BARBOSA, C.S. et al. Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, v. 4, p.549 – 554, 2010.

BARBOSA, C.S.; PIERI, O. BARBOSA, F.S. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 337 – 341, 2000.

BARROS, A. F. **Resposta imune humoral e patologia hepática de camundongos desnutridos infectados com *Schistosoma mansoni***. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

BARTLEY, P. B. et al. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 36, p. 993 - 1001, 2006.

- BASTOS, A. L.; BRITO, I. L. A. Acute pulmonary schistosomiasis: HRCT findings and clinical presentation. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 37, n. 6, p. 823-825, 2011.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 115, p. 209 - 218, 2005.
- BERGMAN, I.; LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 35, p. 1961 – 1965, 1963.
- BLOMHOFF, R.; BLOMHOFF, H. K. Overview of Retinoid Metabolism and Function. **Journal of Neurobiology**, New York, v. 66, n. 7, p. 606 - 630, 2006.
- BOGLIOLO, L. The anatomical picture of the liver in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 51, p. 1 - 14, 1957.
- BOROS, D. L.; WARREN, K. S. Delayed hypersensitivity-type granuloma formation and dermal reaction induced and elicited by a soluble factor isolated from *Schistosoma mansoni* eggs. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, v.132, n. 3, p. 488 – 507,1970.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília, 2010.
- BRENNER, D. A. Molecular pathogenesis of liver fibrosis. **Transactions of the American Clinical and Climatological Association**, Richmond, v. 120, p. 361- 368, 2009.
- BRUMANN, M. et al. Concentration Kinetics of Serum MMP-9 and TIMP-1 after Blunt Multiple Injuries in the Early Posttraumatic Period. **Mediators of Inflammation**, New York, p. 1 - 8, 2012.
- BURKE, M. L. Temporal expression of chemokines dictates the hepatic inflammatory infiltrate in a murine model of schistosomiasis. **PLoS Neglected Tropical Disease**, San Francisco, v. 4, n. 2, p. 598, 2010.
- BURKE, M. L. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, p. 163 – 176, 2009.
- CAPRON, A. et al. Effector mechanisms of immunity to Schistosomes and their regulation. **Immunology Reviews**, Copenhagen, v. 61, p. 41 - 66, 1982.
- CAROD, A. F. J. Cerebral and spinal schistosomiasis. **Current Neurology and Neuroscience Report**, Philadelphia, v. 12, n. 6, p. 666 - 674, 2012.
- CARVALHO, E. M. F. et al. Evolução da esquistossomose na Zona da Mata Sul de Pernambuco. Epidemiologia e situação atual: controle ou descontrole? **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.14, p. 787 – 795, 1998.

CARVALHO, S. L. **Fibrose e outras lesões hepáticas em camundongos isogênicos (“inbred”) desnutridos e eutróficos, infectados com *Schistosoma mansoni***. 2004. Dissertação (Mestrado em Anatomia Patológica) - Departamento de Anatomia Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

CHEN, Y.; BOROS, D. L. Polarization of the immune response to single immunodominant epitope of p38, a major *Schistosoma mansoni* egg antigen, generates Th1 or Th2- type cytokines and granulomas. **Infection and Immunity**, Washington, v. 67, p. 4570 - 4577, 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. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 153, p. 753 - 759, 1994.

CHEEVER, A. W. et al. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, Baltimore, v. 37, p. 85 - 97, 1987.

CHEEVER, A. W. Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 43, p. 601 - 603, 1970.

CHIARAMONTE, M. G. et al. Studies of murine schistosomiasis reveal Interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**, Baltimore, p. 273 - 282, 2001.

COUTINHO, E. M. Patologia da esquistossomose na má –nutrição: uma visão abrangente. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni e Esquistossomose uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2008. cap. 20, p. 655 - 685.

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. 98, p. 919 - 925, 2003.

COUTINHO, E. M. et al. Pathogenesis of schistosomal “pipestem” fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of “pipestem” fibrosis in mice. **International Journal of Experimental Pathology**, Oxford, v. 78, p. 337 - 342, 1997a.

COUTINHO, E. M. Factors involved in *Schistosoma mansoni* infection in rural areas of northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 707 - 715, 1997b.

COUTINHO, E. M. et al. Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. **Acta Tropica**, Basel, v.101, p.15 - 24, 2007.

COUTINHO, E. M. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, Suppl.1, p. 85 - 92, 2004.

COUTINHO, E. M.; FREITAS, L. 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, v. 25, p.13 – 20, 1992.

COUTINHO, E.M et al. Manson's schistosomiasis in the undernourished mouse: some recent findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 359 - 366, 2010.

COUTO, J. L. A. et al. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 4, p. 390 – 393, 2008.

CUTRIM, R. N.; CHIEFFI, P. P.; DE MORAES, J.C. Schistosomiasis mansoni in the "Baixada Ocidental Maranhense", state of Maranhão, Brazil: cross-sectional studies performed in 1987 and 1993. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 40, n. 3, p.165 - 171, 1998.

DOUGLAS, J. Eating problems in young children. **Hospital Medicine**, Londres, v. 63, n. 3, p.140 - 143, 2002.

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

ELIA, M.; STRATTON, R. J. How much Undernutrition is There in hospitals?. **The British Journal of Nutrition**, Londres, v. 84, n. 3, p. 257 - 259, 2000.

ENG, F. J.; FRIEDMAN, S. L. Fibrogenesis I. New insights into hepatic stellate cell activation: the simple becomes complex. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 279, p. 7 – 11, 2000.

ERASMUS, D. A. A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, Londres, v. 67, n. 2, p.165 - 183, 1973.

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. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, p. 2585 - 2591, 2000.

FALLOWFIELD, J. A. et al. Scar-associated macrophages are a major source of hepatic matrix metalloproteinase-13 and facilitate the resolution of murine hepatic fibrosis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 178, n. 8, p. 5288 - 5295, 2007.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 36, n. 1, p. 67 – 74, 2007.

FORBES, S. J.; PAROLA, M. Liver fibrogenic cells. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, Londres, v. 25, p. 207 - 217, 2011.

- FRIEDMAN, S. L. Hepatic stellate cells- protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 88, p. 125 – 172, 2008a.
- FRIEDMAN, S. L. Hepatic fibrosis-overview. **Toxicology**, Amsterdã, v. 254, p.120 – 129, 2008b.
- FRIEDMAN, S. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston: The cellular basis of hepatic fibrosis - mechanisms and treatment strategies. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 328, n. 25, p. 1828 - 1835, 1993.
- FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Disease: mechanisms of hepatic fibrosis and therapeutic implications. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, Londres, v. 1, p. 98 - 105, 2004.
- FRIEDMAN, S. L. Evolving challenges in hepatic fibrosis. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, Londres, v. 7, p. 425 – 436, 2010.
- FRIEDMAN, S. L. Immunopathogenesis of fibrosis and relevance to therapeutic targets. **Hepatitis Annual Update**, Reston, p. 13 - 39, 2003.
- FRIEDMAN, S. L. Preface to BBA issue devoted to fibrosis. **Biochimica et Biophysica Acta** , Amsterdã, 2013. No prelo.
- GABELE, E.; BRENNER, D. A.; RIPPE, R. A. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. **Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library**, Tampa, v. 8, p. 69 - 77, 2003.
- GAZZINELLI, M. F. et al. Interdição da doença: uma construção cultural da esquistossomose em área endêmica, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n.6, p.1629 - 1638, 2002.
- GAZZINELLI, G. et al. Immune response during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. **Journal Immunology**, Baltimore, v. 130, p. 2891 - 2895, 1983.
- GHORESCHI, K. et al. Generation of pathogenic Th17 cells in the absence of TGF- β signalling. **Nature**, Londres, v. 467, p. 967 – 971. 2010.
- GOMES, E. C. et al. Schistosomiasis transmission and environmental change: a spatio-temporal analysis in Porto de Galinhas, Pernambuco - Brazil. **International Journal of Health Geographics**, Londres, v. 11, p. 51 - 56, 2012.
- GORDON, K. J.; BLOBE, G. C. Role of transforming growth factor- β superfamily signaling pathways in human disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdã, v. 1782, p. 197 – 228, 2008.
- GRESSNER, A. M. et al. Roles of TGF- β in hepatic fibrosis. **Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library**, Tampa, v. 17, p. 793 - 807, 2002.

GRESSNER, A. M.; WEISKIRCHEN, R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, Bucharest, v. 10, p.76 - 79, 2006.

GRESSNER, O. A. et al. Connective tissue growth factor is a Smad2 regulated amplifier of transforming growth factor beta actions in hepatocytes—but without modulating bone morphogenetic protein 7 signaling. **Hepatology**, Baltimore, v. 49, p. 2021 – 2030, 2009.

GRESSNER, O. A. et al. Differential effects of TGF-beta on connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in hepatic stellate cells and hepatocytes. **Journal of Hepatology**, Amsterdã, v. 47, p. 699 – 710, 2007.

GRESSNER, O. A.; GRESSNER, A. M. Connective tissue growth factor: a fibrogenic master switch in fibrotic liver diseases. **Liver International: official Journal of the International Association for the Study of the Liver**, Oxford, v. 28, p. 1065 – 1079, 2008.

GUYOT, C. et al. Hepatic fibrosis and cirrhosis: the fibroblastic cell Subpopulations involved. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 38, p. 135 - 151, 2006.

HELLERBRAND, C. Hepatic stellate cells- the pericytes in the liver. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, Berlin, v. 465, n. 6, p. 775-778, 2013.

HEMMANN, S. et al. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis – a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. **Journal of Hepatology**, Amsterdã, v. 46, p. 955 – 975, 2007.

HERNADEZ- GEA, V.; FRIEDMAN, S. L. Pathogenesis of liver fibrosis. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, Palo Alto, v. 6, p. 425 -456, 2011.

HERNANDEZ–GEA, V. et al. Role of the Microenvironment in the Pathogenesis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 144, p. 512 – 527, 2013.

HERNANDEZ, H. J.; SHARPE, A. H.; STADECKER, M. J. Experimental murine schistosomiasis in the absence of B7 costimulatory molecules: reversal of elicited T cell cytokine profile and partial inhibition of egg granuloma formation. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 162, p. 2884 - 2889, 1999.

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

HESSE, M. et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 172, n. 5, p. 3157 – 3166, 2004.

HESSE, M. et al. NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and anti-fibrotic

effects of the Th1-inducing adjuvant, Il-12, in a Th2 model of granulomatous disease. **American Journal of Pathology**, New York, v. 157, p. 945 - 955, 2000.

HILKENS, C. M. et al. Human Dendritic Cells Require Exogenous Interleukin-12-Inducing Factors to Direct the Development of Naive T-Helper Cells Toward the Th1 Phenotype. **Blood**, Berlin, v. 90, n. 5, p.1920 - 1926, 1997.

HOFFMAN, K. F.; CHEEVER, A. W.; WYNN, T. A. IL-10 and danger of immune polarization: excessive type 1 and type 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 164, p. 6406 – 6416, 2000.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, S. L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **Journal of Tropical Medicine and Public Health**, Bangkok, v. 9, p. 283 - 291, 1934.

HSÜ, S.Y.L. et al. Comparative studies on the lesions caused by eggs of *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in livers of albino mice and rhesus monkeys. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 66, p. 89 - 97, 1972.

HURST, M. H.; WILLINGHAM, A. L.; LINDBERG, R. Tissue responses in experimental schistosomiasis japonica in the pig: a histopathologic study of different stages of single low- or high-dose infections. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 62, n. 1, p. 45 - 56, 2000.

INAGAKI, Y.; OKAZAKI, I. Emerging insights into Transforming growth factor beta Smad signal in hepatic fibrogenesis. **Gut**, Londres, v. 56, p. 284 – 292, 2007.

ING, R. et al. Suppressed T helper 2 immunity and prolonged survival of a nematode parasite in protein-malnourished mice. **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America**, Washington, v. 97, n. 13, p. 7078-7083, 2000.

IREDALE, J. P.; THOMPSON, A. C.; HENDERSON, N. C. Extracellular matrix degradation in liver fibrosis: Biochemistry and regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdã, v. 1832, n. 7, p. 876-883, 2013.

IREDALE, J. P. Models of liver fibrosis: exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 117, n. 3, p. 539 - 548, 2007.

JANKOVIC, D. et al. Schistosome-infected IL-4 receptor knockout (KO) mice, in contrast to IL-4 KO mice, fail to develop granulomatous pathology while maintaining the same lymphokine expression profile. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 163, p. 337 – 342, 1999.

JESUS, R. A. et al. Clinical and Immunologic Evaluation of 31 Patients with Acute Schistosomiasis mansoni. **The Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 185, p. 98 - 105, 2002.

JIAO, J.; FRIEDMAN, S. L.; ALOMAN, C. Hepatic fibrosis. **Current Opinion in Gastroenterology**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 223 - 229, 2009.

JUNQUEIRA, L. C. U.; BIGNOLOS, G.; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. **The Histochemical Journal**, Londres, v. 11, p. 447 – 455, 1979.

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

KAVIRATNE, M. et al. IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF β 1 independent. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 173, p. 4020 – 4029, 2004.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. Fibrogenesis of Parenchymal Organs. **Proceedings of the American Thoracic Society**, New York, v. 5, n. 3, p. 338 –342, 2008.

KISSELEVA, T.; BRENNER, D. A. The phenotypic fate and functional role for bone marrow-derived stem cells in liver fibrosis. **Journal of Hepatology**, Amsterdã, v. 56, n. 4, p. 965 - 972, 2012.

KLOOS, H. et. Rural electrification in Brazil and implications for schistosomiasis transmission: a preliminary study in a rural community in Minas Gerais State, Brazil. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v.17, n. 4, p. 526 – 530, 2012.

KOLLS, J. K.; LINDÉN, A. Interleukin-17 Family Members and Inflammation. **Immunity**, Cambridge, v. 21, p. 467- 476, 2004.

KURODA, H. et al. Establishment of a cell line from a malignant rhabdoid tumor of the liver lacking the function of two tumor suppressor genes, hSNF5/INI1 and p16. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, New York, v. 158, p. 172 - 179, 2005.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 422 – 435, 2010.

LEAL -NETO, O. B et al. Biological and environmental factors associated with risk of schistosomiasis mansoni transmission in Porto de Galinhas, Pernambuco State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 2, p. 357 - 367, 2013.

LEASK, A.; ABRAHAM, D. J. TGF- β signaling and the fibrotic response. **FASEB Journal**, Bethesda v. 18, p. 816 - 827, 2004.

LENZI, J. A. et al. *Calomys callosus*: na Alternative Model to Study Fibrosis in *Schistosomiasis mansoni*. The Pathology of the Acute Phase. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n. 2, p. 311 - 318, 1995.

LEROY, V. et al. Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic

hepatitis C: comparison with PIIINP and hyaluronic acid. **The American Journal of Gastroenterology**, New York, v. 99, n. 2, p. 271 - 279, 2004.

LEUNG, T. M. et al. Role of nitric oxide in the regulation of fibrogenic factors in experimental liver fibrosis in mice. **Histology and Histopathology**, Murcia, v. 26, n. 2, p. 201 - 211, 2011.

LI, Y. et al. Transforming growth factor-beta1 induces the differentiation of myogenic cells into fibrotic cells in injured skeletal muscle: a key event in muscle fibrogenesis. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v.164, n.3, p.1007 - 1019, 2004.

LICHTINGHAGEN, R. et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-7, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are closely related to the fibroproliferative process in the liver during chronic hepatitis C. **Journal of Hepatology**, Amsterdã, v. 34, n. 2, p. 239 - 247, 2001.

LIU, Y. et al. IL-13 induces connective tissue growth factor in rat hepatic stellate cells via TGF- β -independent Smad signaling. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.187, n. 5, p. 2814 - 2823, 2011.

MACKENZIE; B. S.; KASTELEIN, R. A.; CUA, D. J. Understanding the IL-23–IL-17 immune pathway. **Trends in Immunology**, Oxford, v. 27, p. 17 – 23, 2006.

MAHER, J. J. et al., Collagen measured in primary cultures of normal rat hepatocytes derives from lipocytes within the monolayer. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 82, p. 450 - 459, 1988.

MALAFAIA, G. Importance of encouragement of studies about neglected tropical diseases. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 42, n. 5, p. 609 - 610, 2009.

MANN, D. A.; MARRA, F. Fibrogenic signalling in hepatic stellate cells. **Journal of Hepatology**, Amsterdã, v. 52, p. 949 – 950, 2010.

MARTÍNEZ, H. Aspectos clínicos e tratamento. **Anais Nestlé: má nutrição protéicoenergético**, São Paulo; v. 61, p. 123-130, 2001.

MASCARINI, L. M. Uma abordagem histórica da trajetória da parasitologia. **Ciências & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 8, n. 3, p. 809 – 814, 2003.

MENG, F. et al. Interleukin-17 Signaling in Inflammatory, Kupffer Cells, and Hepatic Stellate Cells Exacerbates Liver Fibrosis in Mice. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 143, p. 765 – 776, 2012.

MORAIS, C. N. L. et al. Studies on the production and regulation of interleukin, IL-13, IL-4 and Interferon- γ in human schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 113 - 114, 2002.

MORAIS, C. N. L. et al. Cytokine profile associated with chronic and acute human schistosomiasis mansoni. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.103, n.6, p. 561 - 568, 2008.

MOREIRA, R. K. Hepatic Stellate Cells and Liver Fibrosis. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, Chicago, v. 131, n. 11, p. 1728 - 1734, 2007.

MOORE, D. V.; YOLLES, T. K.; MELENEY, H. E. A comparison of common laboratory animals as experimental hosts for *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 35, p.156 - 170, 1979.

MORIYA, T. et al. Simultaneous changes in high-fat and high-cholesterol diet-induced steatohepatitis and severe fibrosis and those underlying molecular mechanisms in novel SHRSP5/Dmcr rat. **Environmental Health and Preventive Medicine**, Sapporo, v. 17, n. 6, p. 444 - 456, 2012.

MURPHY, F. R. et al. Inhibition of apoptosis of activated hepatic stellate cells by tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is mediated via effects on matrix metalloproteinase inhibition: implications for reversibility of liver fibrosis. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 277, n. 13, p. 11069 - 11076, 2002.

NEVES, R. H. et al. Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from nourished and undernourished mice: a comparative analysis by confocal laser scanning microscopy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 1013 - 1016, 2001.

NEVES, R. H. et al. Phenotypic characterization of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished mice: a morphometric study focusing on the reproductive system. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 35, p. 405 - 407, 2002.

NEUBAUER, K.; SAILE, B.; RAMADORI, G. Liver fibrosis and altered matrix synthesis. **Canadian Journal of Gastroenterology**, Oakville, v. 15, n. 3, p. 187 - 193, 2001.

NEUMAN, M. et al. Markers of Inflammation and Fibrosis in Alcoholic Hepatitis and Viral Hepatitis C. **International Journal of Hepatology**, Basel, v.12, p.1 - 10, 2012.

OKUYAMA, H.; SHIMAHARA, Y.; KAWADA, N. The hepatic stellate cell in the post-genomic. **Histology and Histopathology**, v. 17, p. 487 - 495, 2002.

OLIVEIRA, S. A. et al. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, Berlim, v. 93, p. 30 - 35, 2004.

OLIVEIRA, S. A. et al. Morphometric Study of *Schistosoma mansoni* Adult Worms Recovered from Undernourished Infected Mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 5, p. 623 - 627, 2003.

OLIVEIRA, S. A. et al. Therapy with bone marrow cells reduces liver alterations in mice chronically infected by *Schistosoma mansoni*. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 14, n. 38, p. 5842 - 5850, 2008.

OLSEN, A. L. et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. **American Journal of Physiology: Gastrointestinal and Liver Physiology**, Bethesda, v. 301, n. 1, p. 110 - 118, 2011.

OPPMANN, B. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. **Immunity**, Cambridge, v. 13, n. 5, p. 715 - 725, 2000.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Report of the Scientific Working Group Meeting on Schistosomiasis**. Geneva, 2005. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>>. Acesso em: 9 fev. 2013.

PASSOS, A. D. C.; AMARAL, R. S. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 31, supl. 2, p. 61 - 74, 1998.

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

PEARCE, E. J. et al. *Schistosoma mansoni* in IL-4-deficient mice. **International Immunology**, Oxford, v. 8, p. 435 - 444, 1996.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The Immunobiology of Schistosomiasis. **Nature Reviews: Immunology**, Londres, v. 2, p. 499 – 511, 2002.

PELEGRINO, J.; FARIA, J. The oogram method for the screening of drugs in *Schistosomiasis mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 14, p. 363 - 369, 1965.

PORDEUS, L. C. et al. A ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997 a 2006: uma revisão de literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 17, n. 3, p. 163 - 175, 2008.

RAMOS, R. P. **Infecção Esquistossomótica aguda**: produção de citocinas em camundongos desnutridos e deficientes em iNOS. 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2007.

RASO, P. et al. Forma tumoral da esquistossomose mansoni cerebelar: relato de caso e medida dos granulomas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 3, p. 283 - 286, 2006.

RASO, P. et al. *Schistosoma mansoni* granuloma in late evolutive phase, in a case of tumoral form in man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n. 5, p. 627 - 632, 2012.

RESENDES, A. P. C.; SOUZA, S. R.; BARBOSA, C. S. 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, 2005.

REY, L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomíase: O Parasito. In: _____. **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, cap. 32, p. 413 - 424.

ROSS, A. G. et al. Schistosomiasis. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 346, p. 1212 - 1220, 2002.

RUTITZKY, L. I. et al. Enhanced egg-induced immunopathology correlates with high IFN-gamma in murine schistosomiasis: identification of two epistatic genetic intervals. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 174, p. 435 - 440, 2005.

RUTITZKY, L. I. et al. IL-23 is required for the development of severe egg-induced immunopathology in schistosomiasis and for lesional expression of IL-17. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 15, n. 4, p. 2486 - 2495, 2008.

RUTITZKY, L. I.; STADECKER, M. J. CD4 T cells producing pro-inflammatory interleukin-17 mediate high pathology in schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 1, p. 327 - 330, 2006.

SENOO, H. et al. Hepatic stellate cell (vitamin A-storing cell) and its relative-past, present and future. **Cell Biology International**, Londres, v. 34, p. 1247 – 1272, 2010.

SHAINHEIT, M. G. et al. The Pathogenic Th17 Cell Response to Major Schistosome Egg Antigen Is Sequentially Dependent on IL-23 and IL-1 β . **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 187, p. 5328 – 5335, 2011.

SHERLOCK, S.; DOOLEY, J. **Diseases of the liver and biliary system**. 10th ed. London: Blackwell Science, 1997.

SHI, Y.; MASSAGUE, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus, **Cell**, Cambridge, v. 113, p. 685 – 700, 2003.

SILVA, F. L. **Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos infectados com *Schistosoma mansoni***. 2008. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Recife, 2008.

SILVA, L. M. et al. Comparison of immune responses of *Schistosoma mansoni* infected mice with distinct chronic forms of the disease. **Acta Tropica**, Basel, v. 91, p. 189 - 196, 2004.

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, 2000.

SILVA, P. V.; DOMINGUES, A. L. C. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 327 - 336, 2011.

SOARES, S. A. Jr. et al. Acute pulmonary schistosomiasis: correlation between the high-resolution CT and pathological findings. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, Lisboa, v. 13, n. 5, p. 741 - 744, 2007.

SORSA, L. et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation," **Annals of Medicine**, Helsinki, v. 38, n. 5, p. 306 – 321, 2006.

SPELLBERG, B.; EDWARDS Jr., J. E. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases, Chicago, v. 32, n.1, p. 76 - 102, 2001.

STADECKER, M. J. et al. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunological Reviews**, Copenhagen, v. 201, p. 499 - 511, 2004.

STEINMAN, L. A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. **Nature Medicine**, New York, v. 13, n. 2, p.139 - 145, 2007.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.17, p. 463 – 516, 2001.

STIREWALT, T.; KUNTZ, R E.; EVANS, A. S. The relative susceptibilities of the commonly used laboratory mammals to infection by *Schistosoma mansoni*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v.31, p. 57 – 82, 1997.

STRATTON, R. J.; ALVARENGA, A. **Combate à desnutrição relacionada à doença**: como a intervenção nutricional pode contribuir com benefícios nos resultados clínicos e funcionais, e uma boa relação custo-benefício nos sistemas de assistência à saúde. São Paulo: Support Produtos Nutricionais, 2002.

SUBEQ, Y. M. Valsartan decreases TGF- β 1 production and protects against chlorhexidine digluconate-induced liver peritoneal fibrosis in rats. **Cytokine**, San Diego, v. 53, p. 223 – 230, 2011.

TAHASHI, Y. Differential regulation of TGF-beta signal in hepatic stellate cells between acute and chronic rat liver injury. **Hepatology**, Baltimore, v. 35, n.1, p. 49 - 61, 2002.

TALLANT, C.; MARRERO, A.; GOMIS – RÜTH, F. X. Matrix metalloproteinases: Fold and function of their catalytic domains. **Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Cell Research**, Amsterdã, v. 1803, n. 1, p. 20 – 28, 2010.

TAYLOR, J. J.; MOHRS, M.; PEARCE, E. J. Regulatory T Cell Responses Develop in Parallel to Th Responses and Control the Magnitude and Phenotype of the Th Effector Population¹. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 176, p. 5839 – 5847, 2006.

TENCY, I. et al. Imbalances between matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMPs) in maternal serum during preterm labor. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 11, p. 490- 542, 2012.

TEODÓSIO, N. R. et al. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Archivos Latinoamericanos de Nutri n**, Caracas, v. 40, p. 533 - 547, 1990.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 288, n.2, p.345 - 353, 2005.

TOMASEK, J. J. et al. Myofibroblasts and mechanoregulation of connective tissue remodeling. **Nature Reviews**, Londres, v. 3, p. 349 - 363, 2002.

VIDAL et al. Considera es sobre esquistossomose mans nica no munic pio de Jequi , Bahia, **Revista de Patologia Tropical**, Goi nia, v. 40, n.4, 367 - 382, 2011.

VISSE, R.; NAGASSE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function and biochemistry. **Circulation Research**, Dallas, v. 92, p. 827 – 839, 2003.

WARREN, K. S. The pathogenesis of “clay-pipestem cirrhosis” in mice with chronic schistosomiasis mansoni, with a note on the longevity of the schistosomes. **The American Journal of Pathology**, New York, v. 49, p. 477 - 489, 1966.

WARREN, K. S, De Witt WB. Production of portal hypertension and esophageal varices in the mouse. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v. 101, v. 98 – 99, 1958.

WEAVER, C.T. et al. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. **Immunity**, Cambridge, v. 24, n. 6, p. 677 - 688, 2006.

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

WEINSTOCK, J. V.; BOROS, D. L. Organ-dependent differences in composition and function observed in hepatic and intestinal granulomas isolated from mice with schistosomiasis mansoni. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 130, p. 418 - 422, 1983.

WENG, H. L. et al. The etiology of liver damage imparts cytokines transforming growth factor beta1 or interleukin-13 as driving forces in fibrogenesis. **Hepatology**, Baltimore, v. 50, p. 230 – 243, 2009.

WINAU, F. et al. Starring stellate cells in liver immunology. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 20, n. 1, p. 68 - 74, 2008.

WYNN, T. A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 117, n. 3, p. 524 – 529, 2007.

WYNN, T. et al. P-selectin suppresses hepatic inflammation and fibrosis in mice by regulating interferon and the il-13 decoy receptor. **Hepatology**, Baltimore, v. 39, n. 3, 2004.

WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 7, p. 505 - 511, 1995.

WYNN, T. A. et al. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Shistosoma mansoni*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 151, p.1430 - 1440, 1993.

YUE, P. et al. Des- γ -carboxyl prothrombin induces matrix metalloproteinase activity in hepatocellular carcinoma cells by involving the ERK1/2 MAPK signalling pathway. **European Journal of Cancer**, Oxford, v.47, n. 7, p. 1115 – 1124, 2011.

ZOU, Y. et al. Targeting matrix metalloproteinases and endothelial cells with a fusion peptide against tumor. **Cancer Research**, Baltimore, v. 67, n. 15, p. 7295 – 7300, 2007.

Low transformation growth factor- β 1 production and collagen synthesis correlate with the lack of hepatic periportal fibrosis development in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*

Andreia Ferreira Barros¹, Sheilla Andrade Oliveira^{1/+}, Camila Lima Carvalho¹, Fabiana Leticia Silva², Veruska Cintia Alexandrino de Souza¹, Anekecia Lauro da Silva¹, Roni Evencio de Araujo¹, Bruno Solano F Souza^{3,4}, Milena Botelho Pereira Soares^{3,4}, Vladia MA Costa², Eridan de Medeiros Coutinho¹

¹Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife, PE, Brasil

²Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil

³Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-Fiocruz, Salvador, BA, Brasil

⁴Centro de Biotecnologia e Terapia Celular, Hospital São Rafael, Salvador, BA, Brasil

Undernourished mice infected (UI) submitted to low and long-lasting infections by Schistosoma mansoni are unable to develop the hepatic periportal fibrosis that is equivalent to Symmers' fibrosis in humans. In this report, the effects of the host's nutritional status on parasite (worm load, egg viability and maturation) and host (growth curves, biology, collagen synthesis and characteristics of the immunological response) were studied and these are considered as interdependent factors influencing the amount and distribution of fibrous tissue in hepatic periportal granulomas and portal spaces. The nutritional status of the host influenced the low body weight and low parasite burden detected in UI mice as well as the number, viability and maturation of released eggs. The reduced oviposition and increased number of degenerated or dead eggs were associated with low protein synthesis detected in deficient hosts, which likely induced the observed decrease in transformation growth factor (TGF)- β 1 and liver collagen. Despite the reduced number of mature eggs in UI mice, the activation of TGF- β 1 and hepatic stellate cells occurred regardless of the unviability of most miracidia, due to stimulation by fibrogenic proteins and eggshell glycoproteins. However, changes in the repair mechanisms influenced by the nutritional status in deficient animals may account for the decreased liver collagen detected in the present study.

Key words: *Schistosomiasis mansoni* - undernutrition - liver fibrosis - cytokines

Mice that were experimentally infected by *Schistosoma mansoni* can develop two distinct and sometimes mixed histopathological patterns during the chronic stage of schistosomiasis: scattered small periportal granulomas with mild nonspecific reactive hepatitis and/or a concentration of circumoval granulomas causing fibrotic expansion and the development of thin fibrous tracts connecting portal spaces (murine periportal fibrosis). This fibrosis mimics the human disease known as Symmers' fibrosis or "clay pipestem" fibrosis (Andrade & Warren 1964, Warren 1966, Andrade & Cheever 1993).

Henderson (1993), working with inbred male CBA/J mice chronically infected with *S. mansoni*, reported the development of two syndromes that pathologically and immunologically imitate the intestinal and hepatosplenic clinical forms of the human disease. Later, Silva (2004) found that these two histological patterns (scattered granulomas and periportal fibrosis) had similar immunological profiles in well-fed BALB/c mice.

The periportal fibrosis is due to massive egg laying by *S. mansoni* females and the development of periportal granulomas around intrahepatic portal veins, leading to the obstruction and destruction of the vessel walls (Andrade 1987). Due to fibrogenic stimuli from antigens derived from miracidia bodies (Hang et al. 1974) and, to a lesser extent, from the eggshells themselves (de Walick et al. 2012), inflammatory cells and macrophages are activated and secrete fibrogenic cytokines such as transformation growth factor (TGF)- β 1, interleukin (IL)-13 and other mediators, which contribute to the regulation of the inflammatory response as well as stimulate the activation of hepatic stellate cells (HSCs) also known as pericytes, fat-storing cells or Ito's cells (Geerts 2001, Gressner et al. 2002).

The HSCs are located in the perisinusoidal space (Friedman 2008). They are actin-containing cells with high plasticity and the capacity to become transformed into myofibroblasts, an important matrix synthesising cell also involved in vascular remodelling of the fibrous tissue (Baptista & Andrade 2005). In response to chronic hepatic injury, HSCs differentiate into myofibroblasts, expressing intermediary filaments of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and collagen and secrete components of the extracellular matrix (Friedman 2008), whose stability is regulated by metalloproteinases and their tissue inhibitors, according to Hemmann et al. (2007).

doi: 10.1590/0074-0276140266

Financial support: CPqAM/FIOCRUZ, CAPES

+ Corresponding author: sheilla@cpqam.fiocruz.br

Received 16 May 2013

Accepted 17 December 2013

Investigations of the interrelationships between schistosomiasis and host nutritional status have demonstrated that mice infected by *S. mansoni* and fed a low-protein diet develop, in the acute stage of the disease, small periportal granulomas with fewer inflammatory cells, reduced amounts of fibrous tissue in the liver and an inability to develop the murine “pipestem”-like fibrosis or periportal fibrosis (Coutinho et al. 1997, 2003, 2007) as was seen in 30-50% of well-fed animals submitted to low and long-lasting infections (Warren 1966, Andrade & Cheever 1993). Experiments on shifting from a deficient to a balanced diet and *vice-versa*, repeated infections or the use of different strains of inbred mice have been all unsuccessful (Coutinho 2004).

Previous studies on the development of the hepatic periportal fibrosis in well-nourished mice infected (WI) have demonstrated the importance of immunological mechanisms, emphasising the role of the T-helper (Th)2 response (Pearce & MacDonald 2002) and of IL-4, IL-10 and IL-13 as key cytokines for fibrogenesis (Hilkens et al. 1997). Undernourished-infected mice (UI) produce low levels of IL-4 (Oliveira et al. 2004) and IL-13 (Coutinho et al. 2010).

The host's nutritional status interferes with the course of *S. mansoni* infection in undernourished mice (UI), with negative effects on the growth and development of the parasites (Neves et al. 2001, 2002, Oliveira et al. 2004) and on egg release.

In this paper, the effects of the nutritional status on the biology of UI mice (growth curves) and parasites (worm load, egg viability and maturation), as well as on the collagen synthesis and the characteristics of the immunopathological response, were studied.

All these variables (nutritional status, egg unviability, low fibrogenic cytokine response, low collagen synthesis) are likely interdependent factors that influence the amount and distribution of fibrous (collagen) tissue in the liver periportal granulomas and portal spaces, explaining the absence of development of the murine type of periportal schistosomal fibrosis in UI mice.

MATERIALS AND METHODS

Animals and experimental infection - Sixty C57BL/6 mice and 100 Swiss Webster mice [for soluble egg antigen (SEA) preparation] at 21 days of age, weighing 11-15 g, were kept in individual wire-bottomed cages. They were raised and maintained at the animal facilities of Aggeu Magalhães Research Centre [Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Recife, state of Pernambuco, Brazil]. Water and food were provided *ad libitum*. Mice were maintained in a temperature (23°C) and light-controlled environment.

Ethics statement - Animal experiments were performed in accordance with the Animal Care and Use Committee of Fiocruz (state of Rio de Janeiro), under license L 0028/07.

Experimental design and infection - Mice were infected percutaneously with 40 recently shed *S. mansoni* cercariae obtained from laboratory-raised *Biomphalaria glabrata* snails (Belo Horizonte strain). The animals

were distributed into the following groups: group 1 [undernourished non-infected (UNI)], group 2 [undernourished-infected (UI)], group 3 [well-nourished non-infected (WNI)] and group 4 [well-nourished infected (WI)]. Infection was confirmed in each mouse by the detection of *S. mansoni* eggs in the faeces 50 days after cercarial exposure. Animals were fed their respective diet from 30 days before infection to the end of the experiment and were euthanised 60 and 150 days after infection.

Diets - Undernutrition was induced in mice by feeding them with a multi-deficient and essentially low-protein diet (7-8% protein), planned to simulate a diet usually ingested by low-income individuals living in endemic areas of Manson's schistosomiasis in Northeast Brazil (Coutinho et al. 1997) and is thus referred to as the regional basic diet. The control diet (NUVILAB) was a pelleted commercial balanced chow for mice produced by Nuvital Nutrientes Ltda (Colombo, PR, Brazil), with 22% protein content.

Evaluation of nutritional status - Body weight was weekly recorded and food consumption was measured every day. As this experimental model of mouse undernutrition has been extensively studied in previous investigations (Coutinho 1980, Teodósio et al. 1990, Coutinho et al. 1992, 1997, 2003), it was considered unnecessary to evaluate other parameters.

Parasitological studies - Parasites recovery and counting mice were killed by intraperitoneal injection of ketamine 115 mg/kg and xylazine 10 mg/kg. They were perfused after 60 (acute) and 150 (chronic) days of infection, according to the Duvall and DeWitt technique (1967). Worms recovered after perfusion of the portal system were counted and separated according to sex. Eggs in the liver and intestine were quantified after digestion with 4% potassium hydroxide (Cheever 1970).

Oogram procedures - Fragments of the small intestine (terminal ileum), of 1 cm length, were removed from all animals. They were later transferred to Petri dishes containing isotonic saline, opened lengthwise with scissors to remove excess mucus, partially dried on absorbent paper, weighed and placed between a glass slide and a plastic cover. The preparation was pressed on a rubber surface padded with absorbent paper (Pellegrino et al. 1963, Pellegrino & Faria 1965). The terminal ileum was used because this segment is the most frequent intestinal site for oviposition of several strains of *S. mansoni* in mice (Valadares et al. 1981). Using a light microscope at a magnification 100X or 400X in questionable cases, all eggs on each slide were counted and classified according to their developmental or maturation stage, following specific features of each stage. A qualitative and quantitative oogram evaluation was performed and in each fragment an average of 100 eggs were counted and classified as viable (mature, immature in 4 different development stages) or dead (calcified, with retracted miracidium, semi-transparent) according to the following features: mature eggs (containing an already developed miracidium); immature first stage (embryo at one-third of the diameter of the egg); immature second stage (embryo at one-half of the length of the egg); immature third

stage (embryo at two-thirds of the length of the egg); immature fourth stage (embryo almost entirely occupying the eggshell) (Pellegrino et al. 1963).

Morphological studies - The livers were removed, rinsed with phosphate buffered saline, weighed and divided into several portions. One section of the liver was fixed in 10% formaldehyde for histologic examination. Tissues were embedded in paraffin and the 5 µm-thick sections obtained were stained with haematoxylin-eosin and picosirius-red method for collagen (Junqueira et al. 1979). Another portion of the liver was placed in 4% potassium hydroxide for egg counting (Cheever 1970). A liver portion weighing 100-200 mg was used for hydroxyproline determination, according to Bergman and Loxley (1963).

Morphometry - Randomly sampled 5 µm-thick liver histological sections, stained with picosirius-red for collagen, were examined by semiautomatic morphometry using the LEICA Q500 MC Image Processing and Analysis System (Leica Cambridge, Cambridge, England). For morphometric measurements, a total sectional area of 6.6 mm² per animal was evaluated. All peri-vascular granulomas were included. A spherical shape and normal size distribution were assumed. The following granuloma parameters were calculated: size, volume density and numerical density. The granuloma volume density was calculated as the quotient of the total granuloma profile area to the total sectional area studied per animal. The number of granulomas per unit volume of liver was assessed by applying Weibel's formula. The sectional area of red-stained fibrous tissue was directly measured and calculated as a percentage of the total area examined, as previously described (Coutinho et al. 1997, Barbosa-Júnior 2001).

Biochemical study - From each animal, a fresh liver sample was used for the determination of collagen, measured as hydroxyproline by the Bergman and Loxley (1963) spectrophotometric method B. Values for hepatic collagen were expressed in micromoles of hydroxyproline per gram of liver and corrected for intensity of infection by dividing the hydroxyproline content in the whole liver by the number of eggs per liver, results being expressed for 10,000 eggs. Calculations for this correction were made using a simplified electronic spreadsheet developed by Cheever (1987) and used in subsequent papers.

Immunofluorescence - Formalin-fixed paraffin-embedded 5 µm-thick sections were used for detection of α-SMA and type-I collagen by indirect immunofluorescence. Sections were deparaffinised and heat-induced antigen retrieval in citrate buffer (pH 6.0) was performed. α-SMA filaments were labelled using a biotinylated anti-α-SMA antibody, 1:100, overnight (Novotec, Lyon, France), followed by Streptavidin Alexa-Fluor 647, 1:200, for 1 h (Molecular Probes, Carlsbad, CA). For type-I collagen labelling, sections were treated with rabbit polyclonal anti-type-I collagen, 1:100, overnight (Santa Cruz, Biotechnology), followed by anti-rabbit IgG conjugated with Alexa-Fluor 488, 1:200, for 1 h (Molecular Probes). For the detection of α-SMA, sec-

tions were mounted in VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium with DAPI H-1500 (4, 6-diamidino-2-phenylindole, Vector Laboratories): cell nuclei stained blue and cytoplasm, red. For type-I collagen, sections were stained with TO-PRO®-3 (carbocyanine monomer nucleic acid): nuclei stained red and type-I collagen, green. Ten random fields per mouse were studied with a Fluoview 1000 confocal microscope using a 40X objective (Olympus, Tokyo, Japan). Morphometric analysis was performed with Image ProPlus v.7.0 software (Media Cybernetics, Inc, Rockville, MD, USA).

Cell culture - After 60 and 150 days of infection, mice from all experimental groups were killed and their spleens removed under sterile conditions. For each group of mice, splenocytes were extracted from a pool of three spleens. The splenocytes were resuspended in RPMI-1640 medium (Cultilab, São Paulo, Brazil), to which 10 mL of 1% penicillin and streptomycin solution, 1% L-glutamine and 10% foetal bovine serum (Gilson) were added. Cell viability was observed after staining with 10% Trypan Blue. Splenocytes were cultured in 24-well plates at a final concentration of 5 x 10⁶ cells/mL in a 5% CO₂ oven (Forma Scientific, Inc) and later stimulated with 20 µg/mL of SEA (Gazzinelli et al. 1983) or 5 µg/mL of concanavalin A. The levels of supernatant TGF-β1 were determined after cultures of 24 h, 48 h, 72 h and 120 h, in both acute and chronic phases of schistosomal infection.

TGF-β1 cytokine detection - The levels of TGF-β1 were determined as ng/mL, through ELISA, using the ELISA Ready-Set-Go Development System kit (e-Bioscience, San Diego, CA, USA) and according to the manufacturer's instructions. Each result is representative of three experiments in duplicate. The kinetics of this cytokine (24 h, 48 h, 72 h and 120 h) showed that the peak of secretion was detected in the supernatant of 24 h cultures, the peak of secretion observed in the WI group used as a reference. Readings were performed in the Bio-Rad Laboratories model 3550 microplate reader at a wavelength of 450 nm. The levels of TGF-β1 in the samples were calculated utilising the Microplate Manager software v.4.0, using standard curves of their respective recombinants. The results are shown as arithmetic mean and standard error of the mean.

Statistical analysis - The data are presented as the means ± standard error of the means. The statistical analyses performed using BioEstat software, v.5.0 (Belém, Pará, Brazil, 2007), included the Student's *t* test or the non-parametric Mann-Whitney *U* test, when appropriate. For all experiments, *p*-values < 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

Host nutritional status is related to low body weight and low parasite burden - UI mice had lower body weight curves than WI animals, in both acute and chronic phases of schistosomal infection. However, schistosomiasis did not significantly affect the growth and development of the mice (data not shown).

These mice showed a low worm recovery during the course of the experiment (Fig. 1A, B) with significant differences than the well-fed group (acute phase: $p = 0.0275$; chronic phase: $p = 0.0090$).

Host undernutrition interferes on the amount of egg release, egg viability and evolution or maturation - Egg counts in the liver and intestine were also lower in UI animals, at both the acute and chronic phases (Fig. 1C-F). A greater number of dead eggs or remnants of eggshells were found in fragments of intestine from UI mice during both phases of the disease, with significant differences between the UI and the WI groups at the chronic phase ($p = 0.0472$). During the acute phase, the oogram of UI mice showed a significant reduction in the

number of immature eggs in the first ($p = 0.0018$), third ($p = 0.0009$) and fourth ($p = 0.0007$) stages of maturation. During the chronic stage, the percentage of mature viable eggs of *S. mansoni* was significantly lower in UI animals ($p = 0.009$) when compared to WI controls and a marked increase in the number of dead eggs was detected in these deficient mice.

UI C57BL/6 mice develop an immunopathology characterised by small hepatic periovular granulomas, show the reduced ability to produce hepatic collagen and do not develop periportal fibrosis.

Histopathology - In the acute phase of infection, the livers of WI mice showed many exudative periovular granulomas within medium-sized and large portal spaces

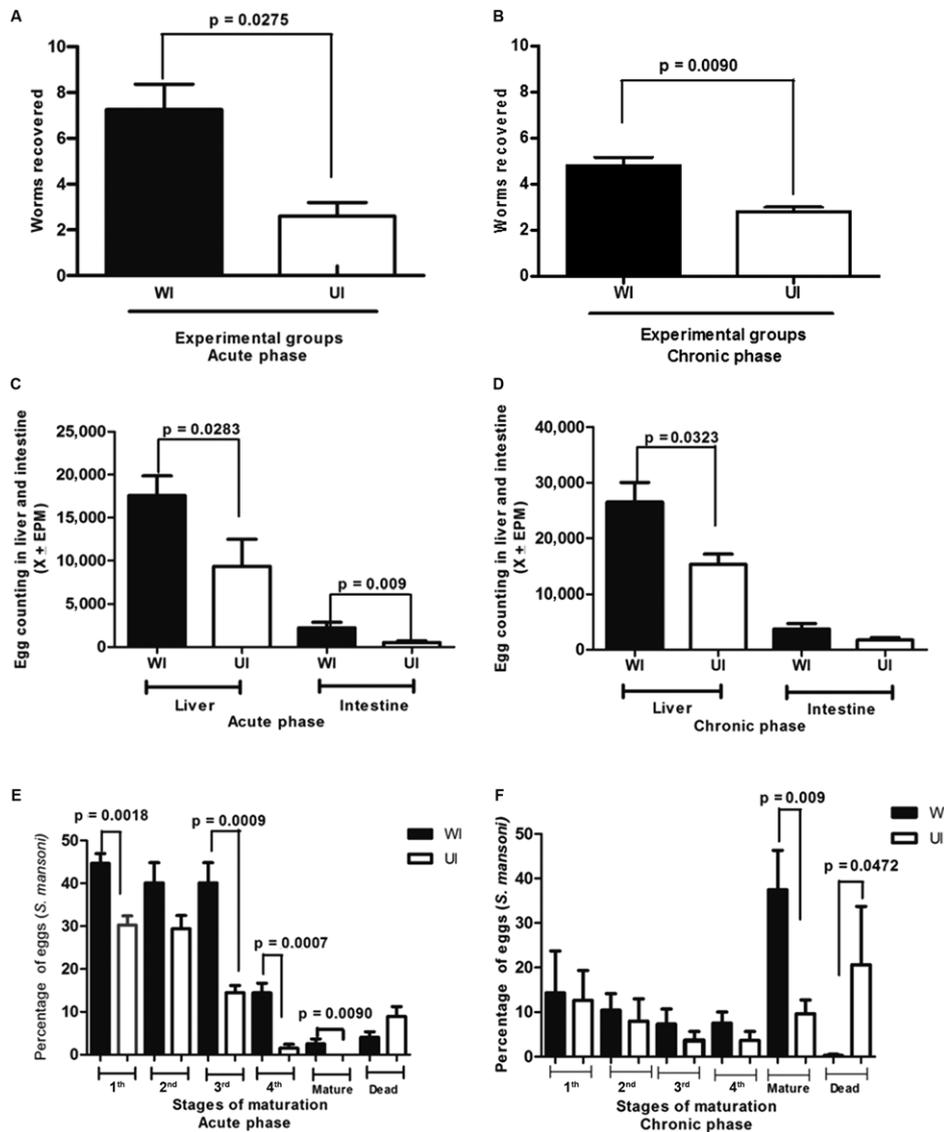


Fig. 1: worms recovered in well-nourished (WI) and undernourished-infected mice (UI) in both acute (A) and chronic (B) phases of *Schistosoma mansoni* infection. Egg counting in the liver and intestine of WI and UI with *S. mansoni* in the acute (C) and chronic (D) phases of the infection. Percentage of *S. mansoni* eggs in different stages of maturation in the intestinal wall of WI and UI in the acute (E) and chronic (F) phases of schistosomiasis. EPM: eggs per minute.

or scattered in the hepatic parenchyma. They appeared isolated or in aggregates (Fig. 2A) and predominantly composed of polymorphonuclear cells, sometimes intensely infiltrated by eosinophils. A loose connective neoformation could be observed around *S. mansoni* eggs, housing inflammatory cells of the acute phase in addition to low numbers of lymphocytes and eventually macrophages. A few foci of acute coagulative necrosis were detected. UI mice showed isolated small-sized granulomas in the proximity of dead eggs or the remains of eggshells throughout the liver parenchyma (Fig. 2B). The fibrous tissue was less conspicuous and almost always absent and low numbers of scattered acute inflammatory cells were observed around some immature or dead eggs.

During the chronic phase, the livers of WI mice displayed isolated granulomas or aggregates of these structures around mature eggs and an annular or lamellar fibrous tissue with low numbers of cells (lymphocytes, plasmocytes and epithelioid cells). Only two animals out of a group of five showed a portal concentration of circumoval granulomas causing fibrotic expansion and neovascularisation of medium-sized to large portal spaces (Fig. 2C), in addition to thin fibrous tracts connecting portal spaces (murine “pipestem”-like fibrosis).

UI mice, however, showed only very small granulomas with low numbers of inflammatory cells and reduced collagen synthesis (Fig. 2D). None were able to develop the “pipestem”-like fibrosis as described in the group of WI mice.

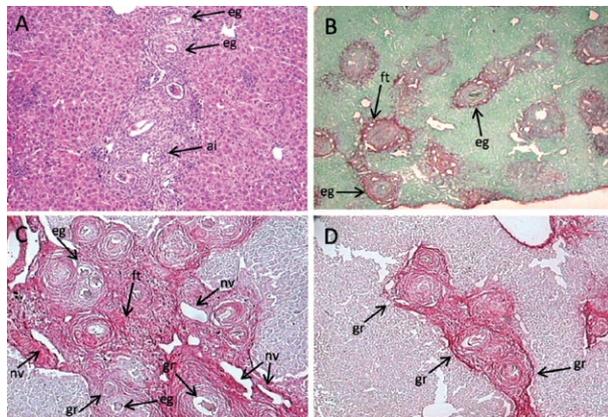


Fig. 2: liver histopathology. A: well-nourished infected mouse with *Schistosoma mansoni*. Conglomerates of well-developed periportal granulomas around mature eggs, acute inflammatory cellular infiltration and scarce collagen deposition (60 days of infection) (haematoxylin-eosin 50X); B: undernourished-infected mouse with *S. mansoni*. Small scattered periportal granulomas with a poor infiltrate of polymorphonuclear cells around remnants of eggs (60 days of infection x 100, Picosirius-red); C: well-nourished mouse. Periportal liver fibrosis (“pipestem”-like fibrosis) showing concentration of periportal granulomas, fibrous enlargement, increased vascularisation and chronic inflammatory infiltration of the portal space (150 days of infection, x 100, Picosirius-red); D: undernourished mice. Groups of small periportal granulomas around empty eggshells, but absence of “pipestem”-like fibrosis (150 days of infection, x 100, Picosirius-red); ai: acute inflammatory infiltrate; eg: eggshells (remnants); ft: fibrous tissue; gr: circumoval granulomas; nv: neovascularisation.

Morphometric analysis (picrosirius-red staining) revealed that during the acute phase, the percentage of fibrous tissue in the liver of UI mice was similar to that observed in WI animals (Fig. 3A). At the chronic phase, however, the synthesis of collagen in the UI mice was less than in the WI group ($p = 0.0204$) (Fig. 3B).

The liver collagen measured biochemically as hydroxyproline also showed significant differences between UI and WI mice at both the acute ($p = 0.0163$) and chronic ($p = 0.009$) phases of the infection (Fig. 3C, D). Infected mice had higher levels of hydroxyproline when compared with control non-infected groups, regardless of their nutritional status.

Morphometric analysis also revealed that the mean volume of the periportal granulomas was significantly lower in the UI group, in both acute ($p = 0.009$) and chronic ($p = 0.0283$) phases of the schistosomal infection (Fig. 4A).

Differences were not detected between UI and WI mice with regard to periportal granuloma volume density or numerical density at either phase of schistosome infection (Fig. 4B, C).

Host undernutrition had no influence on the activation of HSC, but interfered with the production of TGF β -1 and hepatic type-I collagen - During the chronic phase, HSCs were activated to similar levels, in both UI and WI mice, as demonstrated by the presence of Alexa-Fluor 647-labelled cells (Fig. 5A-E). α -SMA-positive cells (red) were detected in periportal granulomas and in blood vessel walls. Although significant differences were found between the WI and WNI groups ($p = 0.0001$) and between the UI and UNI groups ($p = 0.0001$), no differences were detected between the WI and UI groups, at either phase of infection ($p = 0.286$ and $p = 0.1029$, respectively).

Striking differences in type-I collagen were detected between UI and WI mice ($p = 0.0001$) at the chronic phase (Fig. 6A-E) with the increased deposition of collagen in periportal granulomas, vessel walls and portal spaces observed in the infected WI animals. In UI mice, the green fluorescence of collagen fibres was less evident and was restricted to a few granulomas, with portal spaces showing no evidence of increased fibrous deposition.

The mean levels of TGF- β 1 were significantly lower in the UI mice at the acute phase of infection ($p = 0.0039$), which decreased drastically as the disease progressed to the chronic phase, when titres were detected at approximately five times lower ($p = 0.0039$) than those of the WI mice (Fig. 7A, B).

DISCUSSION

Previous investigations on the interactions between the host nutritional status and infection by *S. mansoni* have called attention to the role of undernutrition on the biology and differentiation of the parasites, inducing phenotypic changes in adult worms of both genders (Ferreira & Coutinho 1999, Neves et al. 2002, Oliveira et al. 2003), most likely owing to the lack of essential nutrients for their adequate growth and development. Nutritional deficiency also influences the immune response

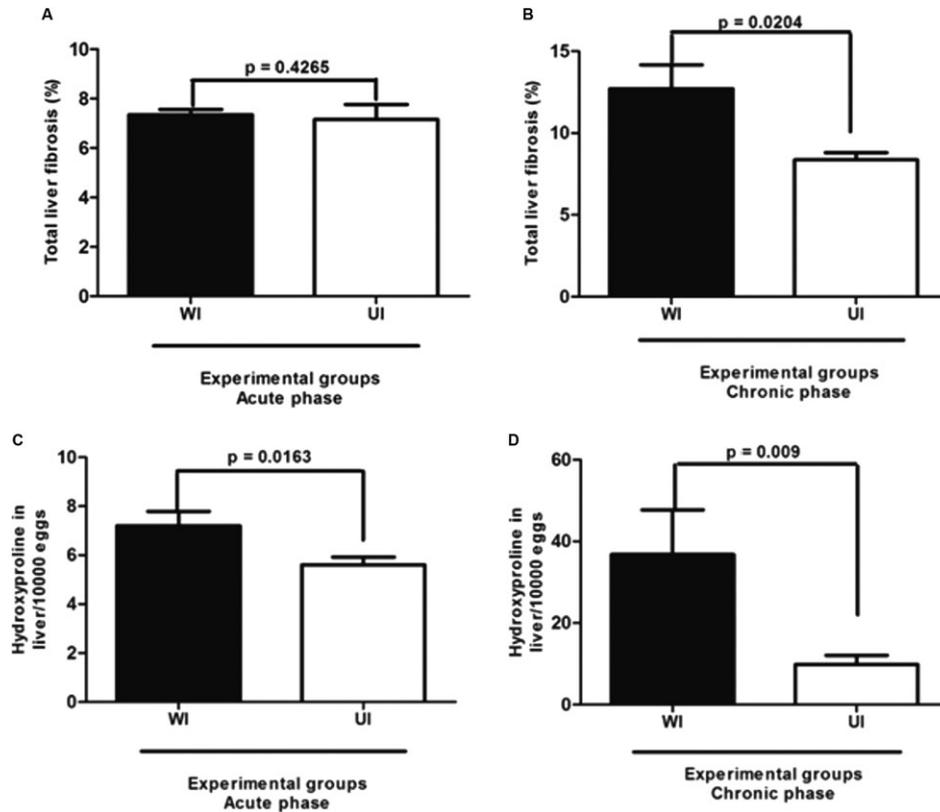


Fig. 3: morphometric (A, B) and biochemical (C, D) measurements of liver fibrous tissue in the acute and chronic phases of *Schistosoma mansoni* infection in undernourished-infected (UI) and well-nourished (WI) C57BL/6 mice.

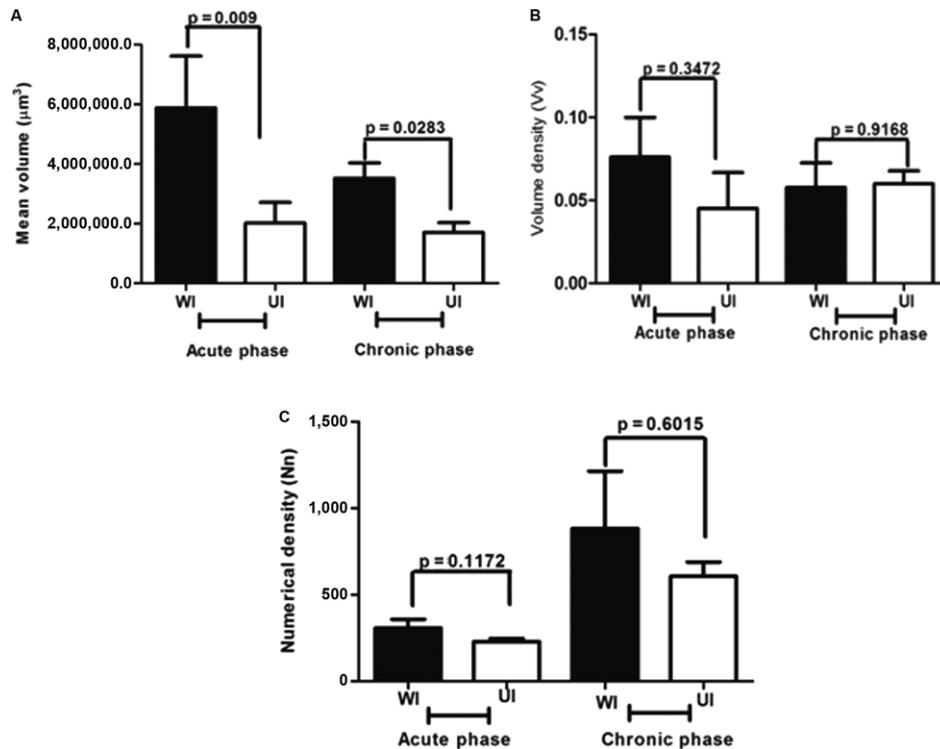


Fig. 4: morphometric measurements of the mean volume (A), volume density (B) and numerical density (C) of egg granulomas in undernourished-infected (UI) and well-nourished (WI) mice in the acute and chronic phases of *Schistosoma mansoni* infection.

and immunopathology of schistosomiasis in the murine experimental host (Coutinho 2004, Oliveira et al. 2004, Coutinho et al. 2007, 2010).

Schistosomal hepatic fibrosis (Symmers' fibrosis) is a chronic lesion involving essentially portal spaces, whose etiopathogenesis is still incompletely understood. In humans, both periportal granulomas and a diffuse progressive periportal fibrosis contributing to the increased amount of fibrous tissue develop within the liver.

The experimental "pipestem"-like liver fibrosis (Symmers' fibrosis of humans) that develops in 30-50% of mice infected by *S. mansoni* (Andrade 1987, Andrade & Cheever 1993) cannot be reproduced in UI outbred and/or inbred mouse models (Coutinho 2008). Different experimental approaches that have tried to reproduce the lesion in UI mice have been unsuccessful thus far (Coutinho 2004). However, further studies on the immunological profile of these animals provided promising results regarding the role of some cytokines secreted at

both the acute (60 days) and chronic stages (150 days) of murine schistosomiasis (Coutinho et al. 2010).

It has been previously reported that schistosome-undernourished infected mice are able to develop a humoral immune response, but antibody titres are much lower than in control well-fed animals (Oliveira et al. 2004, Coutinho et al. 2010). The production of the cytokines interferon (IFN)- γ , IL-4 and IL-10 is lower in the UI mice, but in INOS-knockout mice, as infection progresses to the chronic phase, the kinetics of IFN- γ runs an antagonistic course when compared to that of WI animals (Ramos et al. 2006). On the other hand, the secretion of IL-13, a pro-fibrogenic cytokine, at the chronic phase, has been found to be at alternatively low and high levels of concentrations in splenocyte culture supernatants (Coutinho et al. 2010). The Th2 cytokines and, in particular, IL-13 and the IL-13 receptor (IL-13R α 2) appear to be crucial for the hepatic fibrogenesis associated with schistosomal infection (Wynn et al. 2004).

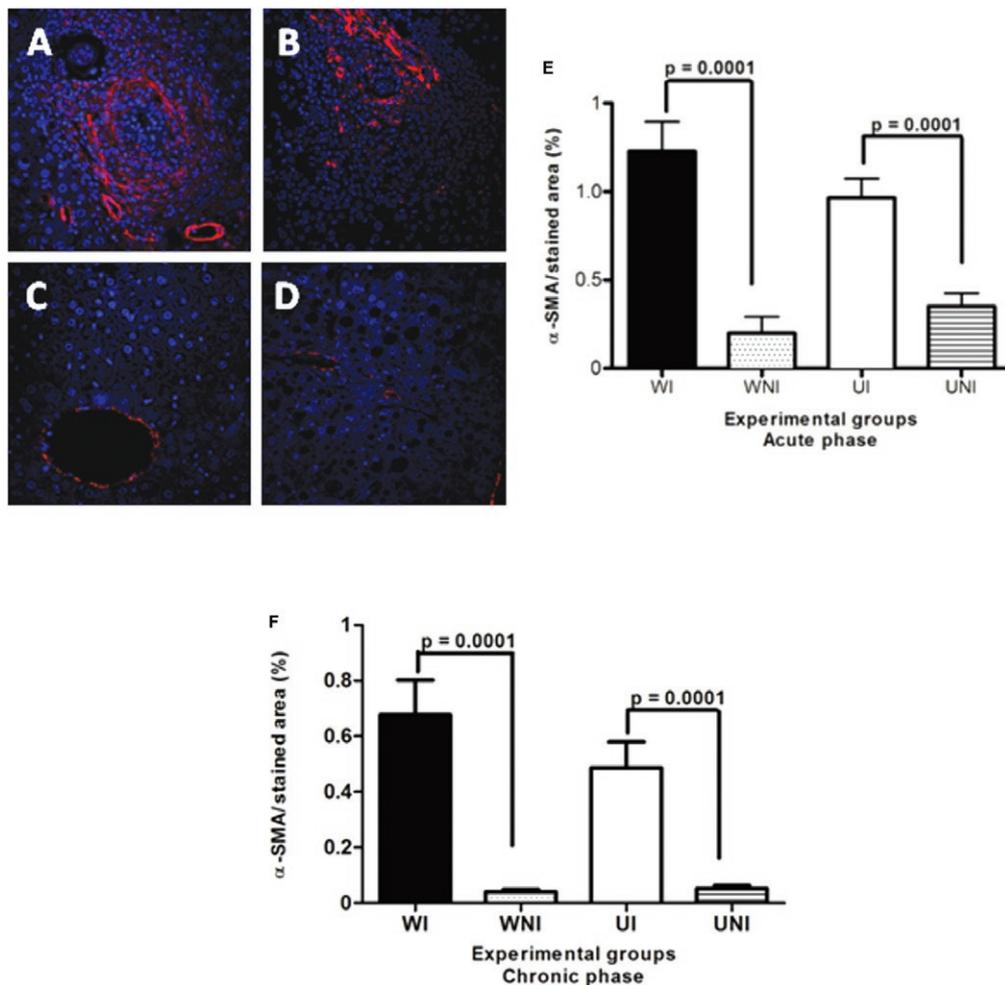


Fig. 5: immunolabelling by Alexa-Fluor 647 for alpha-smooth muscle actin (α -SMA) on myofibroblasts (red) and vascular walls in the liver of mice chronically infected by *Schistosoma mansoni* using the indirect fluorescence technique. Hepatic cells nuclei were stained with DAPI (blue). Data represent the mean and standard error of 10 sections per mouse in groups of five animals. Differences regarding the amount of hepatic stellate cells between UI and WI mice were not statistically significant in both phases. A: well-nourished infected (WI); B: undernourished-infected (UI); C: well-nourished non-infected (WNI); D: undernourished non-infected (UNI) (400X).

In this study, the host nutritional status was related to low body weight curves, low parasite burdens and low egg loads detected in UI mice. It was found that host protein undernutrition negatively interfered with tissue

egg release, as well as on egg viability and the degree of maturation (oogram), as a high metabolism appears to be necessary for a perfect oogenesis by *S. mansoni* adult females (Tempone et al. 2002).

UI C57BL/6 mice infected with *S. mansoni* developed a CD4⁺ T-cell mediated immunopathology characterised by small hepatic granulomas surrounding parasite eggs. This pathological finding is in line with previous reports (Cheever 1987, Rutitzky et al. 2009). The high expression of type-I collagen was detected in the periocular granulomas of WI mice at the early and/or final collagenous stages (productive granulomas), as well as on blood vessel walls. In UI animals, however, type-I collagen deposition was less evident and restricted to a few granulomas with statistically significant differences between the UI and WI groups. In the chronic stage of schistosomiasis, the amount of collagen (hydroxyproline) was approximately four times less in the UI group when compared to well-fed animals.

The data gathered thus far suggest that nutritional deficiency interferes directly with connective tissue changes occurring in murine hepatic schistosomiasis (Coutinho et al. 2003).

Recently, HSCs have gained increasing attention, not only as contractile cells, but also as obligatory regulators of vascular development (Lee et al. 2007), stabilisation, maturation and remodelling of the connective matrix. This is strongly indicative of the role played by these capillary-associated actin-containing cells in the remodelling of the extracellular matrix and associated vascular lesions (Andrade 2009). The consistent morphological association between HSCs and extracellular matrix reinforces their important role in hepatic fibrogenesis. α -SMA, a cytoskeletal protein, is one of the six actin isoforms expressed in mammalian tissue and is the single most reliable marker of stellate cells activation and differentiation into myofibroblasts (Friedman 2008). UI and WI mice were able to activate HSCs to similar levels, as shown by Alexa-Fluor 647 positively labelled cells expressing α -SMA in their cytoplasm. These positive cells (red) could be observed in periocular granulomas and blood vessel walls at both the acute and chronic phases of schistosomal infection. Despite this, the production

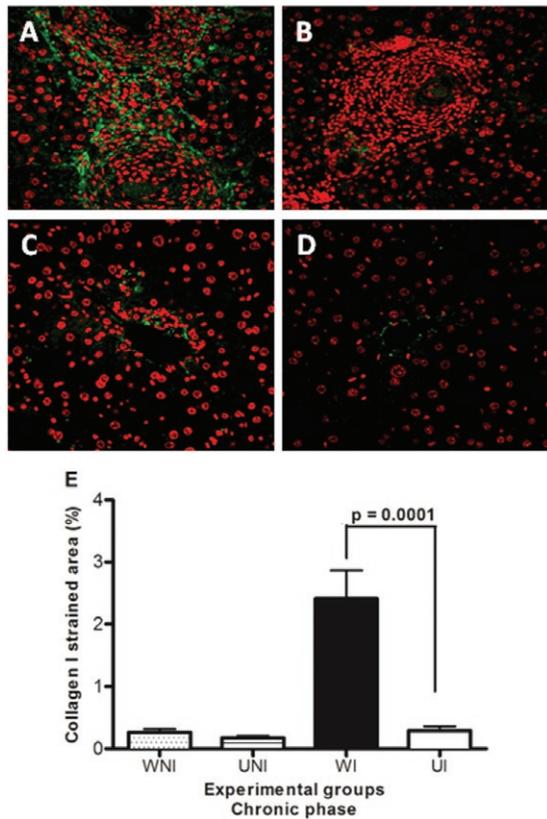


Fig. 6: immunolabelling by Alexa-Fluor 488 for collagen I (green) in the liver of mice chronically infected by *Schistosoma mansoni* using the indirect fluorescence technique. Hepatic cells nuclei were stained with TO-PRO 3 (red). Data represent the mean and standard error of 10 sections per mouse in groups of five animals. Significant results were detected between UI and WI mice ($p = 0.0001$). A: well-nourished infected (WI); B: undernourished-infected (UI); C: well-nourished non-infected (WNI); D: undernourished non-infected (UNI) (400X).

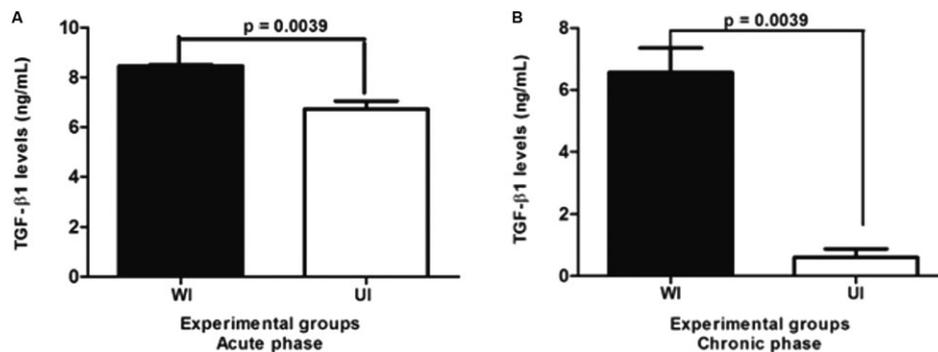


Fig. 7: levels of transformation growth factor (TGF)- β 1 in the supernatant of splenic cells (24 h culture) in undernourished-infected (UI) and well-nourished infected (WI) mice with *Schistosoma mansoni* in the acute (A) and chronic (B) phases of the infection.

of type-I collagen in the chronic phase was significantly lower in UI mice, but this difference appeared to be related to the interference by dietary protein deficiency on the synthesis of collagen and likely other elements of the extracellular matrix (Coutinho et al. 2003).

Studies on the cellular kinetics of hepatic fibrosis have demonstrated the involvement of different cell types, in addition to HSCs, including eosinophils and macrophages and their relationships to the development of the granulomatous response and the production of profibrotic cytokines. The deposition of eggs by *S. mansoni* followed by the release of SEA incites a granulomatous response in which CD4⁺ T cells (Mathew & Boros 1986) and eosinophils (Rumbley et al. 1999) play an important role. Additionally, CD8⁺ T cells, B cells and M2 macrophages (alternatively activated macrophages) play a role in the formation and regulation of hepatic granulomas (Herbert et al. 2004, Hams et al. 2013). It has been found that M2 macrophages induced by Th2 responses promote collagen synthesis and fibrogenesis via the metabolism of L-arginine to proline and polyamine by arginase-1 (Song et al. 2000).

In this study, the levels of TGF- β 1 in UI were significantly lower at the beginning of the infection (acute phase), falling drastically to levels approximately five-times lower than those detected from WI animals at the chronic phase.

The reduced egg laying in tissues and the increase in the amount of degenerated and dead eggs detected in UI mice did not entirely impair the activation of HSCs because fibrogenic stimuli from the remaining miracidia bodies and even from immunogenic cellular proteins and glycoprotein molecules derived from the eggshells (de Walick et al. 2012) were sufficient to induce the differentiation of HSCs (Ito's cells, perisinusoidal cells, pericytes) into myofibroblasts. Thus, TGF- β 1 was produced, although at lower concentrations.

The results obtained in this experiment suggest that host malnutrition is directly responsible for the reduced egg laying and low maturation of *S. mansoni* eggs, leading to a decreased release of immunogens and thus affecting the expression of fibrogenic cytokines such as TGF- β 1, in addition to IL-4, IL-10 and IL-13, as previously reported (Coutinho et al. 2010). The low expression of fibrogenic cytokines, however, is sufficient to activate HSCs, but these cells in UI mice are unable to adequately synthesise type-I collagen. Dietetic protein deficiency, together with the low immunogenic stimulus generated by the reduced oviposition and egg unviability, may account for the low liver collagen production and the inability of UI mice to develop the murine type of liver periportal fibrosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Prof Tetsuo Tashiro, for suggestions on statistical techniques, to Roberto Werkaüser, for useful comments, and to Maria do Carmo Alves de Lima, for supply of the Brij L23 solution.

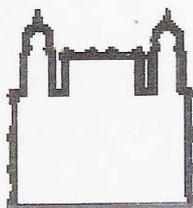
REFERENCES

- Andrade ZA 1987. Pathogenesis of pipe-stem fibrosis of the liver (experimental observation on murine schistosomiasis). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 82: 325-334.

- Andrade ZA 2009. Schistosomiasis and liver fibrosis. *Parasite Immunol* 31: 656-663.
- Andrade ZA, Cheever AW 1993. The characterization of the murine model of schistosomal periportal fibrosis ("pipestem" fibrosis). *Int J Exp Pathol* 74: 195-202.
- Andrade ZA, Warren KS 1964. Mild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 58: 53-57.
- Baptista AP, Andrade ZA 2005. Angiogenesis and schistosomal granuloma formation. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 183-185.
- Barbosa-Júnior AA 2001. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. *J Bras Patol* 37: 197-200.
- Bergman I, Loxley R 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal Chem* 35: 1961-1965.
- Cheever AW 1970. Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. *Bull World Health Organ* 43: 601-603.
- Cheever AW 1987. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 37: 85-97.
- Coutinho EM 1980. Estado nutricional e esquistossomose. *Rev Soc Bras Med Trop* 13: 91-96.
- Coutinho EM 2004. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99 (Suppl. 1): 85-92.
- Coutinho EM 2008. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar In OS Carvalho, PMZ Coelho, HL Lenzi, *Patologia da esquistossomose na má-nutrição: uma visão abrangente*, 1st ed., Fiocruz, Rio de Janeiro, p. 655-685.
- Coutinho EM, Abath FGC, Barbosa CS, Domingues ALC, Melo MC, Montenegro SML, Lucena MAF, Romani SAM, Souza WV, Coutinho AD 1997. Factors involved in *Schistosoma mansoni* infection in rural areas of Northeast Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 707-715.
- Coutinho EM, Barros AF, Barbosa Jr A, Oliveira SA, Silva LM, Araújo RE, Andrade ZA 2003. Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 919-925.
- Coutinho EM, de Oliveira SA, de Barros AF, Silva FL, Ramos RP 2010. Manson's schistosomiasis in the undernourished mouse: some recent findings. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 105: 359-366.
- Coutinho EM, Ferreira HS, de Freitas LPCG, Silva MR, Cavalcanti CL, Samico MJA 1992. Nutrition and acute schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87 (Suppl. IV): 297-301.
- Coutinho EM, Silva FL, Barros AF, Araújo RE, Oliveira SA, Luna CF, Barbosa Jr AA, Andrade ZA 2007. Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. *Acta Trop* 101: 15-24.
- de Walick S, Tielens AG, van Hellemond JJ 2012. *Schistosoma mansoni*: the egg, biosynthesis of the shell and interaction with the host. *Exp Parasitol* 132: 7-13.
- Duvall RH, DeWitt WB 1967. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am J Trop Med Hyg* 16: 483-486.
- Ferreira HS, Coutinho EM 1999. Should nutrition be considered as a supplementary measure in schistosomiasis control? *Ann Trop Med Parasitol* 93: 437-447.

- Friedman SL 2008. Hepatic stellate cells - protean, multifunctional and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* 88: 125-172.
- Gazzinelli G, Katz N, Rocha RS, Colley DG 1983. Immune response during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated but not active cases of schistosomiasis. *J Immunol* 130: 2891-2895.
- Geerts A 2001. History, heterogeneity, developmental biology and functions of quiescent hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 21: 311-335.
- Gressner AM, Weiskirchen R, Breitkopf K, Dooley S 2002. Roles of TGF-beta in hepatic fibrosis. *Front Biosci* 7: 793-807.
- Hams E, Aviello G, Fallon PG 2013. The *Schistosoma* granuloma: friend or foe? *Front Immunol* 4: 1-8.
- Hang LM, Warren KS, Boros DL 1974. *Schistosoma mansoni*: antigenic secretions and the etiology of egg granulomas in mice. *Exp Parasitol* 35: 288-298.
- Hemann S, Graf J, Roderfeld M, Roeb E 2007. Expression of MMPs and TIMPs in liver fibrosis - a systematic review with special emphasis on anti-fibrotic strategies. *J Hepatol* 46: 955-975.
- Henderson GS 1993. Two distinct pathologic syndromes in male CBA/J inbred mice with chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Am J Pathol* 142: 703-714.
- Herbert DR, Hölscher C, Mohrs M, Arendse B, Schwegmann A, Radwanska M, Leeto M, Kirsch R, Hall P, Mossman H, Claussen B, Förster I, Brombacher F 2004. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T-helper 1 responses and immunopathology. *Immunity* 20: 623-635.
- Hilkens CM, Kalinski P, de Boer M, Kapsenberg ML 1997. Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naïve T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* 90: 1920-1926.
- Junqueira LCU, Bignolos G, Brentani RR 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. *Histochem J* 11: 447-455.
- Lee JS, Semela D, Iredale J, Shah VH 2007. Sinusoidal remodeling and angiogenesis: a new function for the liver-specific pericyte? *J Hepatol* 45: 817-823.
- Mathew RC, Boros DL 1986. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. *Infect Immun* 54: 820-826.
- Neves RH, Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Oliveira SA, Coutinho EM, Lenzi HL, Gomes DC 2001. Morphological aspects of *Schistosoma mansoni* adult worms isolated from nourished and undernourished mice: a comparative analysis by confocal laser scanning microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 96: 1013-1016.
- Neves RH, Oliveira SA, Machado-Silva JR, Coutinho EM, Gomes DC 2002. Phenotypic characterization of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished mice: a morphometric study focusing on the reproductive system. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 405-407.
- Oliveira SA, Barbosa Jr AA, Gomes DC, Machado-Silva JR, Barros AF, Neves RH, Coutinho EM 2003. Morphometric study of *Schistosoma mansoni* adult worms recovered from undernourished infected mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 623-627.
- Oliveira SA, Silva LM, Barbosa-Júnior AA, Ribeiro-dos-Santos R, Coutinho EM, Andrade ZA, Soares MB 2004. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 93: 30-35.
- Pearce EJ, MacDonald AS 2002. The immunobiology of schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 2: 499-511.
- Pellegrino J, Faria J 1965. The oogram method for the screening of drugs in schistosomiasis mansoni. *Am J Trop Med Hyg* 14: 363-369.
- Pellegrino J, Oliveira CA, Faria J 1963. The oogram in the study of relapse in experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *J Parasitol* 49: 365-370.
- Ramos RP, Costa VMA, Melo CF, Souza VMO, Malagueño E, Coutinho EM, Abath FGC, Montenegro SML 2006. Preliminary results on interleukin-4 and interleukin-10 cytokine production in malnourished, inducible nitric oxide synthase-deficient mice with schistosomiasis mansoni infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (Suppl. I): 331-332.
- Rumbley CA, Sugaya H, Zekavat AS, El Rafei M, Perrin PJ, Philips SM 1999. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. *J Immunol* 162: 1003-1009.
- Rutitzky LI, Smith PM, Stadecker JM 2009. T-bet protects against exacerbation of schistosome egg-induced immunopathology by regulating Th17-mediated inflammation. *Eur J Immunol* 39: 2470-2481.
- Silva ML 2004. Comparison of immune responses of *Schistosoma mansoni*-infected mice with distinct chronic forms of the disease. *Acta Trop* 91: 189-196.
- Song E, Ouyang N, Horbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS 2000. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol* 204: 19-28.
- Tempone AJ, Furtado DR, Gimba ERT, Oliveira FMB, Rumjanek FD 2002. Dolichol phosphate mannose synthase is differentially expressed in male and female worms of *Schistosoma mansoni*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 131: 465-474.
- Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, Guedes RC 1990. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* 40: 533-547.
- Valadares TE, Coelho PM, Pellegrino J, Sampaio IB 1981. *Schistosoma mansoni*: aspects of the oviposition of the LE' strain in mice infected with a couple of worms. *Rev Inst Med Trop* 23: 6-11.
- Warren KS 1966. The pathogenesis of "clay-pipestem cirrhosis" in mice with chronic schistosomiasis mansoni with a note on the longevity of the schistosomes. *Am J Pathol* 49: 477-489.
- Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW, Mentink-Kane MM 2004. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev* 201: 156-167.

Anexo A - Certificado de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



MINISTÉRIO DA SAÚDE / FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA-FIOCRUZ

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo intitulado “Resposta imune humoral e celular na esquistossomose mansônica crônica do camundongo desnutrido e suas relações com a fibrogênese hepática” sob a responsabilidade de Dra. Eridan de Medeiros Coutinho, foi licenciado pelo nº L-0028/07 e 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). Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 30 de agosto de 2011.

Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2007.

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA
FIOCRUZ