



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



FABIANA LETICIA DA SILVA

**Resposta imune celular e patologia hepática
de camundongos desnutridos, infectados
com *Schistosoma mansoni*.**

RECIFE
2008

FABIANA LETICIA DA SILVA

**Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos,
infectados com *Schistosoma mansoni*.**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Saúde Pública do Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Eridan de Medeiros Coutinho
Co-orientadora: Silvia Maria Lucena Montenegro

Recife
2008

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

C586r

Silva, Fabiana Leticia da.

Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com *Schistosoma mansoni* / Fabiana Leticia da Silva. — Recife: F. L. da Silva, 2008.

115 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado em saúde pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.

Orientadora: Eridan de Medeiros Coutinho.

Co-orientador: Silvia Maria Lucena Montenegro.

1. Esquistossomose mansoni. – imunologia. 2. Esquistossomose mansoni. – parasitologia. 3. Esquistossomose mansoni. – patologia. 4. Desnutrição. 5. Imunidade celular. 6. Citocinas. 7. Cirrose hepática. I. Coutinho, Eridan de Medeiro. II. Montenegro, Silvia Maria Lucena.

CDU 616.995.122

FABIANA LETICIA DA SILVA

**Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos,
infectados com *Schistosoma mansoni*.**

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Saúde Pública do Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Eridan de Medeiros Coutinho
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FundaçãO Oswaldo Cruz

Dr^a. Yara de Miranda Gomes
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ FudaçãO Oswaldo Cruz

Dr^a. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais Francisco e Lourdes e ao meu esposo Newton, que tanto me incentivaram e apoiaram, principalmente nos momentos de maior dificuldade.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e pela saúde;

Ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz;

Ao Departamento de Imunologia do CPqAM

Ao Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho, transmitindo conhecimentos e experiência, dando uma palavra de incentivo, torcendo para que meus experimentos dessem certo. Agradeço, principalmente, a todos os meus grandes amigos que estiveram ao meu lado quando tudo parecia impossível, sofreram com meus problemas e vibraram comigo a cada obstáculo superado.

Amigos, a todos vocês o meu muito obrigada!!

“Se juntássemos compaixão, amor, humor, empatia, ternura, fé, toque, criatividade e doação, e tivéssemos que usar uma palavra para definir o conjunto, essa palavra seria amizade.”

Patch Adams

Tudo posso naquele que me fortalece!

Filipenses, capítulo 4, versículo 13.

SILVA, Fabiana Leticia da. **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, 2008.

RESUMO

O estado nutricional do hospedeiro parece ser importante cofator no agravamento da esquistossomose mansônica. O presente trabalho avaliou as características da resposta imune celular e a patologia hepática em camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*, comparando-os com eutróficos infectados da mesma linhagem. A metodologia abordou produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-13 em sobrenadante de cultura de esplenócitos (fases aguda, intermediária e crônica da infecção), estado nutricional, carga parasitária, macroscopia do fígado e do baço, estudo histopatológico do fígado, morfometria dos granulomas hepáticos periovulares e mensuração bioquímica e morfométrica do colágeno hepático. Os animais desnutridos desenvolveram peso corporal inferior, comparados aos eutróficos. O estudo parasitológico revelou maior quantidade de parasitos no grupo eutrófico. Na relação percentual entre os pesos dos animais e dos órgãos (fígado e baço), os camundongos infectados apresentaram taxas superiores às dos animais sem infecção, caracterizando organomegalia típica dos estágios avançados da doença. A histopatologia revelou maior quantidade e tamanho dos granulomas nos animais eutróficos e intensa resposta inflamatória nos espaços-porta, com abundante infiltração eosinofílica nas fases aguda e intermediária, em ambos os grupos. Na fase crônica, 40% dos eutróficos desenvolveram fibrose periportal, não sendo observada essa lesão nos desnutridos. A morfometria dos granulomas e a quantificação do tecido fibroso não revelaram diferenças entre os grupos. A imunidade celular dos animais eutróficos mostrou níveis mais elevados de IL-13 do que IFN- γ , na fase aguda, indicando perfil Th2. Essa resposta Th2 permanece nas fases intermediária e crônica da infecção, embora em níveis mais baixos. A cinética da produção de citocinas nesses animais evoluiu conforme descrito na literatura. Os camundongos desnutridos, todavia, produziram, na fase aguda, níveis mais elevados de IFN- γ do que IL-13, caracterizando um perfil Th1. Na fase intermediária o componente Th1 diminuiu e foram observados altos níveis de IL-13 e IL-4 (perfil Th2), que se reduziram com a cronicidade da infecção. Pode-se especular que essa cinética diferente dificulte a atuação das citocinas fibrogênicas, sendo uma das razões pelas quais camundongos desnutridos não conseguem desenvolver fibrose periportal murina.

Palavras-chaves: Esquistossomose *mansoni*, Desnutrição, Imunidade celular, Lesões hepáticas.

SILVA, Fabiana Leticia da. **Cellular immune response and hepatic pathology in undernourished mice, infected with *Schistosoma mansoni***. 2008. Dissertation (Master of Public Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2008.

ABSTRACT

Nutritional status seems to be an important co-factor in aggravating schistosome infection. So, the characteristics of the cellular immune response in inbred C57BL/6 undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni* were investigated and compared to those seen in well-nourished infected animals of the same lineage. This investigation aimed at determining the production of cytokines IFN- γ , IL-4 and IL-13 in supernatant of cultured spleen cells at 60, 90 and 150 days post-infection; host nutritional status; parasite burden; liver and spleen morphology; morphometric measurement of hepatic circumoval granulomas; biochemical and morphometric determinations of hepatic collagens. The percentage relationship of the liver and spleen weights as related to body weight were higher for infected well-nourished mice, when compared to non-infected ones. Liver histopathology showed a greater number of enlarged granulomas in well-nourished mice. In both undernourished and well-nourished animals, a marked inflammatory response was detected in portal spaces, with intensive infiltration of polymorphonuclear eosinophils at 60 and 90 time-points. Forty percent of chronically infected (150 days post-infection) well-nourished mice developed the histologic pattern of murine periportal fibrosis. However, infected undernourished animals were unable to develop this lesion. Morphometric measurements of hepatic circumoval granulomas and of liver collagen gave similar results for undernourished and well-nourished groups of mice, under the conditions of the present trial. In well-nourished mice, cellular immune response in the acute phase of schistosomiasis was characterized by higher levels of IL-13 than of IFN- γ (Th2 profile), these levels declining to the end of the experiment (intermediary and chronic phases of infection). So, the kinetics of the above cytokines in well-nourished mice is according to previous reports. In undernourished infected mice, however, higher levels of IFN- γ than of IL-13 were detected in the acute phase of murine schistosomiasis (Th1 profile). In the intermediary phase, the Th1 component was reduced and high levels of IL-13 and IL-4 (Th2 profile) were detected, declining progressively. One could speculate that undernutrition could induce some changes in the production of fibrogenic cytokines, by altering the synthesis and deposition of extracellular matrix. This could at least partly explain why undernourished mice do not develop murine periportal fibrosis even 150 days post-infection as well-nourished animals do.

Key words: Schistosomiasis *mansoni*, Undernutrition, Cellular immune response, Hepatic lesions.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i>	22
Figura 2	Eletroforese em gel de poliacrilamida com coloração pelo Coomassie blue, das proteínas do antígeno solúvel de ovo (SEA).....	49
Figura 3	Produção de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos e eutróficos, infectados com <i>S. mansoni</i>	50
Figura 4	Produção de IL-4 nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos e eutróficos, infectados com <i>S. mansoni</i>	51
Figura 5	Produção de IL-13 nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos e eutróficos, infectados com <i>S. mansoni</i>	52
Quadro 1	Sinopse dos resultados da resposta imune celular durante a infecção esquistossomótica, em camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI).....	53
Figura 6	Relação percentual entre o peso corporal e o peso dos órgãos (fígado e baço) de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com <i>S. mansoni</i> , em comparação com seus respectivos controles não infectados (DNI e ENI).....	54
Figura 7	Camundongo desnutrido, com 60 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Granuloma do tipo exsudativo, observando-se intensa proliferação de eosinófilos em torno de ovo em degeneração (HE – 200x).....	56
Figura 8	Camundongo eutrófico, com 60 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Presença de eosinofilia intensa em torno do ovo com miracídio em desintegração e alguns mononucleares permeando o infiltrado eosinofílico. Observa-se, ainda, área de necrose isquêmica (coagulativa), indicada pela seta (HE – 200x).....	56
Figura 9	Camundongo desnutrido, com 90 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Granulomas isolados, pequenos, esparsos pelo parênquima e com pequena deposição de tecido colágeno (PS– 100x).....	57
Figura 10	Camundongo desnutrido, com 90 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Ovos do parasito em degeneração, envolvidos por intensa reação eosinofílica. Presença de mononucleares na	

	estrutura do granuloma e de gigantócito invadindo a casca do ovo - HE- 400x.....	57
Figura 11	Camundongo desnutrido, com 90 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Conglomerados fibrosos periovulares em espaço porta (HE- 100x).....	57
Figura 12	Camundongo eutrófico, com 90 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Infiltração eosinofílica e aumento do tecido fibroso do espaço-porta devido à presença de conglomerados de ovos (HE- 200x).....	57
Figura 13	Camundongo desnutrido, com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Conglomerados de ovos degenerados e granulomas colagenizados (HE- 200x).....	59
Figura 14	Camundongo desnutrido, com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Detalhe do granuloma periovular, observado em maior aumento: observar presença de eosinófilos, riqueza de células mononucleares e início de deposição colágena (HE- 400x).....	59
Figura 15	Camundongo eutrófico, com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Infiltração difusa por polimorfonuclearares e presença de granulomas periovulares colagenizados, envolvendo restos de cascas de ovos (HE- 200x).....	59
Figura 16	Camundongo eutrófico, com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> . Fibrose hepática periportal murina: observar o aumento do tecido conjuntivo portal com restos de estruturas granulomatosas periovulares, infiltração inflamatória crônica, hiperplasia de ductos bilíferos e neoformação vascular (HE- 200x).....	59
Figura 17	Níveis de hidroxiprolina hepática ($\mu\text{mol/g}$ de fígado), mensurada através da dosagem bioquímica em camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com <i>S. mansoni</i>	61
Figura 18	Curvas ponderais de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com <i>S. mansoni</i> e seus respectivos controles não infectados (DNI e ENI).....	62
Figura 19	Número de parasitos coletados por perfusão do sistema venoso portal em camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com <i>S. mansoni</i>	63
Figura 20	Número de ovos encontrados no fígado de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com <i>S. mansoni</i>	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição percentual das dietas.....	37
Tabela 2	Análise morfométrica realizada no tecido hepático de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI) infectados com <i>S. mansoni</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

11B11	Anticorpo de captura anti-IL-4
ABTS	2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
BALB/c	Linhagem isogênica de camundongo
BH	Belo Horizonte
BSA	“Bovine Serum Albumin”
BVD624G2	Anticorpo biotilado anti-IL-4
C57BL/6	Linhagem isogênica de camundongo
CD4	<i>Cluster of differentiation 4</i>
CECAL	Centro de Criação de Animais de Laboratório
CEUA	Comissão Ética no Uso de Animais
CO ₂	Dióxido de carbono
ConA	Concanavalina A
Da	Dalton
DBR	Dieta básica regional
DI	Desnutrido infectado
DNI	Desnutrido não infectado
EDTA	“Ethylene diamine tetracetic acid”
EI	Eutrófico infectado
ENI	Eutrófico não infectado
EPM	Erro padrão da média
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Foxp3	<i>Forkhead box protein 3</i>
g	Aceleração da gravidade

h	Hora
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina-eosina
IFN- γ	Interferon gama
IgE	Imunoglobulina E
IgG1	Imunoglobulina G 1
IgG2b	Imunoglobulina G 2 b
IgG3	Imunoglobulina G 3
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
kDa	Kilodaltons
Kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de Potássio
M	Molar
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar

N	Normal
n	Número de animais por grupo
NaOH	Hidróxido de Sódio
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
Nn	Densidade numérica
NUVILAB	Nuvital Nutrients LTDA
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBST	Tampão salina fosfato com Tween 20
PM	Peso molecular
PMSF	“Phenylmethylsulfonyl fluoride”
PS	Picro-sirius vermelho
rIFN- γ	Interferon gama recombinante
rIL-13	Interleucina 13 recombinante
rIL-4	Interleucina 4 recombinante
RPMI	Meio <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Segundos
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEA	<i>Soluble Egg Antigen</i>
Th	Linfócito T auxiliar
Th0	Linfócito T auxiliar tipo 0
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
TMB	3,3',5,5' – tetramethylbenzidine
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

T reg	Linfócito T regulatório
V	Volume
Vv	Densidade de volume
W	Watts
X	Média

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Aspectos epidemiológicos	19
1.2 Ciclo evolutivo	21
1.3 A doença	22
1.4 Imunopatologia	24
1.4.1 Fibrose hepática periportal.....	28
1.4.1.1 <i>Modelos experimentais e fibrose</i>	29
1.5 Estado nutricional e reação imune	30
2 JUSTIFICATIVA	33
3 PERGUNTA CONDUTORA	34
4 OBJETIVOS	35
4.1 Geral	35
4.2 Específicos	35
5 MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 Animais	36
5.2 Dietas	36
5.3 Estado nutricional	37
5.4 Obtenção de cercárias e infecção	37
5.5 Grupos experimentais	38
5.6 Estudo parasitológico	39
5.6.1 Coleta e quantificação dos vermes após perfusão do sistema venoso portal	39
5.6.2 Contagem dos ovos contidos no fígado.....	39
5.7 Estudo morfológico	40
5.7.1 Análise macroscópica dos órgãos.....	40
5.7.2 Análise histopatológica.....	40
5.8 Estudo morfométrico	41
5.8.1 Volume dos granulomas (V).....	41
5.8.2 Densidade volumétrica dos granulomas (Vv).....	41
5.8.3 Densidade numérica dos granulomas (Nn).....	42
5.8.4 Percentual de tecido fibroso (%).....	42

5.9 Estudo bioquímico	42
5.10 Estudo imunológico	44
5.10.1 Obtenção de antígeno solúvel de ovo - SEA	44
5.10.2 Cultura de células esplênicas.....	45
5.10.3 Dosagem de citocinas nos sobrenadantes.....	46
5.10.4 Determinação da cinética de produção das citocinas.....	47
5.11 Análise estatística	47
6 RESULTADOS	49
6.1 Estudo imunológico	49
6.1.1 Avaliação do antígeno solúvel de ovo (SEA).....	49
6.1.2 Avaliação dos níveis de citocinas após estimulação com SEA.....	49
6.1.2.1 <i>Produção de IFN-γ</i>	49
6.1.2.2 <i>Produção de IL-4</i>	50
6.1.2.3 <i>Produção de IL-13</i>	51
6.2 Estudo morfológico	53
6.2.1 Macroscopia do fígado e do baço.....	53
6.2.2 Histopatologia do fígado.....	55
6.2.2.1 <i>Fase aguda</i>	55
6.2.2.2 <i>Fase intermediária</i>	56
6.2.2.3 <i>Fase crônica</i>	58
6.3 Estudo morfométrico	60
6.4 Estudo bioquímico	61
6.5 Estado Nutricional	61
6.6 Estudo parasitológico	63
6.6.1 Número de parasitos coletados após perfusão do sistema venoso portal	63
6.6.2 Número de ovos encontrados no fígado total.....	63
7 DISCUSSÃO	65
7.1 Avaliação da cinética de produção das citocinas	66
7.2 Avaliação morfológica	69
7.2.1 Aspectos macroscópicos.....	69
7.2.2 Aspectos histopatológicos.....	70
7.3 Avaliação morfométrica e bioquímica	72
7.4 Avaliação do estado nutricional	73

7.5 Avaliação da carga parasitária.....	74
8 CONCLUSÕES.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
APÊNDICE A – Artigo em preparação.....	86
ANEXO A – Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ).....	115

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos epidemiológicos

Embora sejam bastante antigas, com registros datados de mais de dois mil anos, ainda hoje as esquistossomoses permanecem como parasitoses de alta prevalência, sendo endêmicas em 76 países. Sua distribuição geográfica tem mudado nas últimas décadas, devido à realização de programas de controle em algumas áreas atingidas. No entanto, o número de pessoas infectadas ou sob risco de adquirir a infecção não tem diminuído (ENGELS et al., 2002). Estimativas sugerem que o maior número de pessoas infectadas esteja no continente Africano, onde poucos esforços têm sido implantados no sentido de controlar a infecção (CHITSULO et al., 2000).

Dentre as esquistossomoses, a mansônica (helminíase do sistema vascular mesentérico, causada pelo *Schistosoma mansoni*) é considerada a mais importante por sua grande disseminação mundial, estimando-se que existam cerca de 200 milhões de pessoas acometidas por essa doença (BINA; PRATA, 2003).

No Brasil, em virtude da grande diversidade geográfica, climática, econômica e social que se reflete na imensa variedade de parasitas encontrados no país (SCHNACK et al., 2003), a esquistossomose mansônica é uma das mais significativas endemias parasitárias (DOMINGUES; BARRETO, 2001), representando um grave problema sanitário, com estimativas de que existam cerca de seis milhões de pessoas infectadas no país, principalmente nos estados do Nordeste e em Minas Gerais (KATZ; ALMEIDA, 2003).

A mortalidade por esquistossomose mansônica, que ocorre, principalmente, em decorrência das manifestações clínicas da fase crônica da doença, foi demonstrada em estudo realizado por Ferreira e Silva (2007), que analisou os dados obtidos no Brasil entre os anos de 1980 e 2003. Esses dados revelaram uma redução de 62,9% na mortalidade no período estudado, porém essa redução não foi uniforme ao longo dos anos, sendo a região Nordeste aquela que concentrou a maior distribuição percentual desses óbitos (62,3%).

Estima-se que Pernambuco possui uma área endêmica para

esquistossomose mansônica que corresponde a 17,5% da área total do Estado (FAVRE et al., 2001), onde, apenas no ano de 2006, foram notificados 762 casos da parasitose (BRASIL. S. V. S., 2006). Nesse Estado, a doença é historicamente endêmica na região rural, apresentando-se, predominantemente, sob forma crônica, acometendo pessoas de baixa renda e tendo como vetor principal o caramujo *Biomphalaria straminea* (COUTINHO et al., 1997).

No entanto, em virtude da migração dos trabalhadores do campo associada à gradual ocupação e modificação dos espaços urbanos, tem sido observada uma expansão contínua da doença para o litoral do Estado, acometendo pessoas de classe média e alta, assumindo, eventualmente, nessa região, caráter de infecção aguda. Nas áreas litorâneas, o caramujo responsável pela transmissão da doença é o *Biomphalaria glabrata* (BARBOSA et al., 2001). Por outro lado, mesmo sendo raras ou inexistentes as áreas de infecção nos grandes centros urbanos do país, onde reside a população de maior poder aquisitivo, as periferias dessas cidades, onde habita a população de baixa renda, reproduzem as péssimas condições de saneamento das áreas rurais o que permite a instalação de novos focos de transmissão da esquistossomose mansônica (KATZ; PEIXOTO, 2000).

Apesar do diagnóstico e tratamento serem relativamente simples, o controle da esquistossomose mansônica requer, tanto medidas de saneamento básico, como mudança dos hábitos das pessoas que residem em áreas endêmicas. Essas medidas têm como finalidade interromper o ciclo evolutivo do parasita (KATZ; ALMEIDA, 2003). No entanto, esse controle é particularmente difícil por razões que variam, desde a extensa disseminação do hospedeiro intermediário; inexistência de uma vacina capaz de prevenir a doença; tempo necessário para que a educação sanitária seja efetivamente aceita e implantada na população, e ainda, o alto custo das obras de engenharia sanitária que garantam adequado abastecimento de água para as residências e eliminação dos dejetos, impedindo, assim, a contaminação dos recursos hídricos (CARVALHO et al., 1998; COURA; AMARAL, 2004; KATZ, 1999).

Embora ações de controle tenham sido implantadas no Brasil, o que se reflete na redução da mortalidade provocada pela esquistossomose, os danos físicos gerados por essa doença ainda incapacitam um grande número de pessoas em todo o país (FERREIRA; SILVA, 2007).

1.2 Ciclo evolutivo

O ciclo evolutivo do *S. mansoni* (Figura 1) é formado por duas fases, uma que ocorre no hospedeiro intermediário (caramujo do gênero *Biomphalaria*) e outra que ocorre no hospedeiro definitivo (que pode ser o homem ou outro vertebrado). As fases evolutivas consistem em ovo, miracídio, esporocistos, cercária, esquistossômulo e verme adulto, sendo o miracídio e a cercária as duas formas larvárias de vida livre no meio aquático. O ciclo completo ocorre em cerca de 80 dias. No hospedeiro definitivo, a fase sexuada dura, em média, 40 dias e vai desde a penetração das cercárias até a eliminação de ovos nas fezes. No hospedeiro intermediário, o ciclo é assexuado, e a duração é aproximadamente a mesma da fase sexuada (KATZ; ALMEIDA, 2003).

A localização habitual dos vermes adultos é o interior dos vasos sangüíneos da parede do reto, do sigmóide e do intestino grosso do hospedeiro vertebrado. Uma vez em seu habitat definitivo, a fêmea fecundada coloca cerca de 300 ovos por dia (REY, 2001). Parte desses ovos atravessa a parede dos vasos, a lâmina própria do epitélio intestinal, chegando à luz do intestino e é eliminada junto com as fezes. No momento em que essas fezes entram em contato com coleções de água, os ovos maduros eclodem, liberando a larva ciliada (miracídio), que nada ativamente ao encontro do hospedeiro invertebrado. Ao penetrar nas partes moles do caramujo, o miracídio sofre uma reorganização celular, dando origem aos esporocistos primários, posteriormente aos secundários, e por fim, às cercárias (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Em condições favoráveis de temperatura, luminosidade e oxigenação da água, os moluscos podem iniciar a eliminação das cercárias, as quais penetram ativamente pela pele ou mucosas íntegras do hospedeiro que esteja em contato com a água, através da ação lítica de enzimas e pela ação mecânica dos seus movimentos. Após atravessarem a pele, os corpos cercarianos passam por uma série de mudanças morfológicas, bioquímicas e antigênicas, passando a ser chamadas de esquistossômulos, último estágio larvário do parasito. Esses esquistossômulos penetram nos vasos sangüíneos e linfáticos e aqueles que não forem eliminados pelo sistema imunológico do hospedeiro migram para os pulmões, de onde são distribuídos para os outros órgãos. A maioria deles alcança o fígado, onde atingem a maturidade sexual no sistema venoso portal. Os vermes acasalados

migram para as veias mesentéricas onde iniciam a oviposição, completando assim, o ciclo evolutivo do *S. mansoni* (REY, 2001).

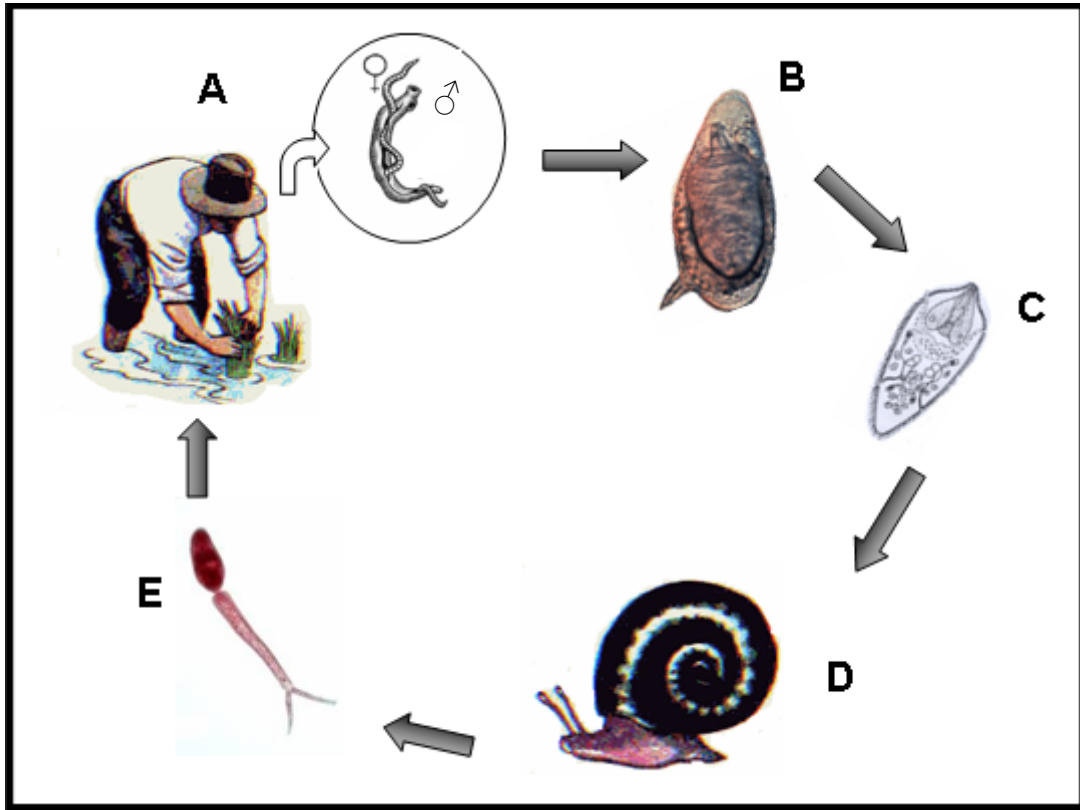


Figura 1 - Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*.

Fonte: da autora

Nota: **A** – Hospedeiro vertebrado infectado (vermes adultos acasalados). **B** – Ovo fértil. **C** – Miracídio. **D** – Hospedeiro invertebrado. **E** - Cercária.

1.3 A doença

A esquistossomose mansônica se desenvolve em duas fases, uma aguda (fase inicial) e uma crônica. Esta última pode apresentar três formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (REY, 2001).

Na fase aguda, o homem pode apresentar dermatite cercariana decorrente da morte de cerca de até metade das cercárias que penetraram na pele. As manifestações clínicas são micropápulas eritematosas e pruriginosas, com intensidade e duração geralmente pequenas (LAMBERTUCCI; SILVA; VOIETA, 2005). O desaparecimento dos sinais cutâneos corresponde ao período de

incubação, que pode durar de quatro a oito semanas, quando há o desenvolvimento dos esquistossômulos (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994). Após esse tempo, os pacientes podem apresentar febre alta, mal estar, astenia, urticária, tosse, anorexia, náuseas, vômitos, mialgias, cefaléia e diarreia. Em virtude desses sintomas também ocorrerem em várias outras doenças infecciosas e parasitárias, o quadro clínico pode não sugerir o diagnóstico. O exame físico pode detectar abdome distendido e doloroso, com fígado e baço aumentados (REY, 2001).

Essas manifestações da fase aguda não são evidenciadas em moradores de áreas endêmicas, caracterizando a forma inaparente (LAMBERTUCCI et al., 2000). Essa fase pode durar, em média, trinta a sessenta dias, desaparecendo quando o paciente é submetido a tratamento específico ou podendo evoluir para a fase crônica, caso não haja tratamento (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Após a regressão dos sintomas, a maioria dos pacientes permanece assintomática quando então são observadas manifestações clínicas predominantemente intestinais caracterizando a forma intestinal. Dentre os sintomas observados podem ser destacados indisposição, emagrecimento, tonturas, anorexia, empachamento pós-prandial, surtos diarreicos acompanhados ou não por cólicas, alternados por constipação intestinal. Na forma hepatointestinal os sintomas são praticamente os mesmos da forma intestinal, embora mais acentuados, havendo maior comprometimento hepático, estando o fígado aumentado ao exame clínico (REY, 2001). Os pacientes podem apresentar, também, um quadro leve de anemia, em decorrência da perda crônica de sangue através do intestino, associada à eosinofilia e ao estado de carência nutricional da grande maioria da população das áreas endêmicas. Com o aumento da intensidade da infecção, podem ocorrer processos inflamatórios no fígado, como reação granulomatosa em torno dos ovos com infiltrado celular na região periportal e discreta fibrose (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994).

Quando ocorre comprometimento das funções e aumento do volume do fígado e do baço, o indivíduo adquire a forma hepatoesplênica da doença, na qual são observadas alterações anatômicas, fisiopatológicas e clínicas, resultantes das lesões teciduais provocadas pelos ovos do parasito (MELO; COELHO, 2005). Nessa fase, há pacientes que permanecem na sua forma clínica estacionária ou compensada, conservando um bom estado geral, com sintomatologia de pequena intensidade. Outros, porém, evoluem para as formas mais graves ou

descompensadas apresentando hipertensão portal, circulação colateral, varizes esofagianas, hemorragias digestivas, fibrose periportal e ascite (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; REY, 2001).

Hipertensão portal, esplenomegalia, varizes esofagianas e circulação colateral são decorrentes do bloqueio da circulação pré-sinusoidal provocado pelo desenvolvimento do tecido fibroso cicatricial resultante da intensa formação de granulomas. Esse bloqueio reduz o fluxo sanguíneo do território drenado pela veia porta. O baço aumenta de volume, em grande parte devido à congestão venosa do ramo esplênico (veia esplênica do sistema porta), bem como devido à hiperplasia das células do sistema macrofágico-linfocitário, com diferenciação plasmocitária (MAGALHÃES FILHO; COUTINHO, 1960) e produção de imunoglobulinas, em virtude da presença de grande quantidade de substâncias antigênicas.

1.4 Imunopatologia

No processo inflamatório provocado pela esquistossomose, a lesão típica observada é o granuloma que se forma em torno dos ovos depositados pelos parasitos. Esses ovos maduros liberam antígenos que atravessam os tecidos, sendo elementos fundamentais para a formação da reação granulomatosa. Os granulomas são compostos, principalmente, por fibras colágenas, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos em proporções diferentes, variando nos diferentes órgãos e em função da fase de sua evolução (PEARCE; MACDONALD, 2002; WEINSTOCK; BOROS, 1983).

Essa inflamação granulomatosa é considerada uma reação de hipersensibilidade tipo tardia mediada por células T CD4 (BOROS; WARREN, 1970; PEARCE; MACDONALD, 2002). Estas células podem desencadear uma resposta Th1, com produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ ; ou uma resposta Th2, com secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (ABATH et al., 2006; BOROS; WHITFIELD, 1999; HOFFMAN; WYNN; DUNNE, 2002; PEARCE; MACDONALD, 2002). As citocinas Th1 ativam a resposta inflamatória e induzem a hipersensibilidade tipo tardia. Em contraste, as citocinas Th2 estimulam a produção de anticorpos, particularmente IgE e aumentam a proliferação de eosinófilos. A resposta Th0 é caracterizada pela

produção simultânea de ambos os padrões de citocinas (ABATH et al., 2006).

Na inflamação granulomatosa, a resposta Th2 está geralmente associada a uma maior deposição de componentes da matriz extracelular do que a resposta Th1 (CHEEVER et al., 1992). Estudos realizados em camundongos mostraram que as citocinas Th2 ativam os macrófagos aumentando a expressão de arginase com produção de prolina, aminoácido essencial na produção de colágeno, estando, assim, envolvidas na formação de granulomas e na fibrogênese. Além disso, a IL-13 é capaz de estimular os fibroblastos hepáticos a sintetizarem proteínas da matriz extracelular, aumentando, assim, a produção de tecido fibroso. O inverso ocorre com as citocinas Th1, que ativam os macrófagos inibindo a produção de arginase e induzindo a produção de óxido nítrico e citrulina (MODOLELL et al., 1995). O balanço entre essas respostas determina a extensão da inflamação (WYNN; CHEEVER, 1995).

A resposta imune do hospedeiro contra os antígenos dos ovos é mais intensa na fase aguda da infecção, diminuindo durante a fase crônica. Isso acontece porque durante a fase crônica ocorre uma diminuição na produção das citocinas Th2 ao mesmo tempo em que se verifica um ligeiro aumento na produção das citocinas Th1. Essa transição no perfil de citocinas produzidas leva a uma diminuição do tamanho dos granulomas recentemente formados (PEARCE; MACDONALD, 2002). Esse fenômeno é conhecido como imunomodulação e foi descrito pela primeira vez por Andrade e Warren (1964), em camundongos. Apesar de existir essa modulação, a contínua formação de granulomas no parênquima hepático pode ocasionar o desenvolvimento de fibrose hepática severa.

Atualmente, admite-se que a imunopatologia da esquistossomose pode ser controlada por uma resposta imunorregulatória dependente de uma subpopulação de células T, denominadas de células T regulatórias (T reg). Essas células são responsáveis por manter a homeostase imunológica suprimindo a ativação de células auto-reativas (SAKAGUCHI et al., 2006), assim como, controlando a magnitude da resposta imune para patógenos invasores (BELKAID; ROUSE, 2005), com a finalidade de regular e prevenir a evolução para a patologia propriamente dita (WILSON et al., 2007). Recentes trabalhos experimentais têm sugerido a atuação das células T reg naturais (Foxp3⁺) (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003) na redução do volume do granuloma hepático. No entanto, a correlação da expressão dessas células e o volume reduzido dos granulomas ainda não está totalmente

esclarecido (WILSON et al., 2007).

As citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 fazem uma regulação cruzada do balanço Th1/Th2 (BOROS; WHITFIELD, 1998; CHENSUE et al., 1994; JANKOVIC; SHER, 1996; WYNN et al., 1997). Dependendo da estimulação antigênica, a resposta imunológica se polariza para um perfil Th1 ou Th2. A produção de IFN- γ aumenta durante os estágios iniciais da formação dos granulomas (6 semanas após a infecção) e diminui subsequente durante o período de máxima atividade do granuloma (BOROS; LUKACS, 1992; CHENSUE et al., 1992; LUKACS; BOROS, 1992; SHER et al., 1991). Camundongos infectados tratados com doses gradativas de IFN- γ apresentam inibição da deposição de colágeno na inflamação crônica, bem como de formação de granulomas periovulares (CZAJA et al., 1989; GIRI; HYDE; MARAFINO, 1986). Essa citocina, o IFN- γ , parece funcionar como inibidor global da resposta Th2 em camundongos infectados, sendo considerado um antagonista da formação de granulomas na fase aguda (BOROS; LUKACS, 1992).

Estudos realizados em pacientes esquistossomóticos que exibiam hepatoesplenomegalia severa mostraram altos níveis de IFN- γ e TNF- α acompanhados de baixos níveis de IL-5, sugerindo que as citocinas proinflamatórias (IFN- γ e TNF- α) estariam relacionadas com a sintomatologia apresentada por esses pacientes (MWATHA et al., 1998). Esses achados corroboram dados obtidos por Brunet et al. (1997), em estudo realizado com camundongos deficientes em IL-4 infectados com *S. mansoni*, os quais não foram capazes de desenvolver uma resposta Th2 efetiva e apresentaram morbidade e mortalidade elevadas. A patologia nesses animais foi atribuída ao aumento da produção de mediadores proinflamatórios. O mesmo ocorreu com camundongos infectados que desenvolveram uma resposta Th1 polarizada por apresentarem uma ineficiente expressão de IL-4. As elevadas mortalidade e morbidade apresentadas por esses animais são resultantes de uma resposta granulomatosa atípica que falhou em conter ou neutralizar as hepatotoxinas produzidas pelo miracídio (FALLON, 2000a; HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000).

Com a progressão natural da doença, os antígenos liberados pelos ovos estimulam as células do hospedeiro a produzirem citocinas Th2, que suprimem a produção e as funções efetoras dos mediadores proinflamatórios (PEARCE; MACDONALD, 2002). Observações feitas em camundongos demonstram que a

doença crônica é caracterizada pelo estabelecimento da resposta Th2 contra os ovos depositados nos diversos órgãos, tais como fígado e intestinos. Uma marca dessa resposta é a expressão de níveis maiores de citocinas indutoras do colágeno como IL-4 (FERTIN et al., 1991; SEMPOWSKI; DERDAK; PHIPPS, 1996) e IL-13 (CHIARAMONTE et al., 1999a), em relação às citocinas supressoras do colágeno como IFN- γ (CZAJA et al., 1993) e do desenvolvimento de tecido fibroso (CHEEVER; YAP, 1997).

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). Outras observações realizadas em modelo murino infectado demonstraram que os animais nos quais a IL-13 estava ausente (IL-13 $-/-$) (FALLON et al., 2000b), ineficiente (camundongos IL-4R α nocaute) (JANKOVIC et al., 1999) ou naqueles onde a IL-13 foi neutralizada por tratamento com IL-13R α 2-Fc solúvel (CHIARAMONTE et al., 1999a) falharam em desenvolver fibrose hepática severa que normalmente ocorre durante a infecção, permitindo, assim, sobrevida prolongada desses camundongos. No entanto uma resposta Th2 polarizada leva ao desenvolvimento de uma doença crônica severa, com produção de granulomas grandes e exacerbada resposta fibrogênica. Isso foi observado em experimento realizado por Hoffmann, Cheever e Wynn (2000) com camundongos duplo-nocaute que não possuíam os genes que codificam a IL-10 e a IL-12. A IL-10 aparece, nesse estudo, como uma citocina chave na patogênese da esquistossomose, tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção, sendo crucial para a sobrevivência do hospedeiro. Esses autores atribuem à IL-10 o papel de controlar a excessiva polarização Th1 e Th2 durante a infecção na esquistossomose murina.

A formação de granulomas é uma importante função de defesa durante a infecção, pois, em indivíduos cronicamente infectados os ovos são um estímulo antigênico contínuo para a resposta imune. Caso esses antígenos não fossem neutralizados efetivamente, seriam muito mais danosos aos tecidos, principalmente

o hepático, que é particularmente sensível. Embora a resposta Th2 seja uma proteção montada pelo hospedeiro, a persistência na expressão desses mediadores poderá “cicatriz” o fígado, ou seja, contribuir para o eventual desenvolvimento da fibrose hepática. Sendo assim, a resposta Th2 exibe características protetora e danosa durante a fase aguda e crônica da infecção, respectivamente (WYNN, 2003). Assim, a sobrevivência a uma doença crônica parasitária requer o desenvolvimento de uma resposta imune controlada, que reconheça o patógeno invasor e limite a resposta potencialmente destrutiva do hospedeiro (HOFFMANN; CHEEVER; WYNN, 2000).

1.4.1 Fibrose hepática periportal

A matriz extracelular compreende o tecido que preenche os espaços entre as células, atuando como suporte para os vasos sanguíneos e linfáticos. Suas funções incluem integração e sustentação, sendo seus componentes moleculares fundamentais para ancoragem, estimulação e movimentação das células, bem como para as interações célula-matriz e célula-célula, uma vez que nela são encontrados fatores de crescimento, hormônios e moléculas de adesão (BEDOSSA; PARADIS, 2003). A matriz extracelular também é responsável pela troca de nutrientes e oxigênio, e nela são eliminados os produtos resultantes do catabolismo celular (ANDRADE, 2005).

A síntese da matriz extracelular (fibrogênese) é rigorosamente controlada, de modo que havendo excesso dessa síntese, seus componentes são degradados pelo processo de fibrólise (ANDRADE, 2005). No fígado existem várias células (fibroblastos, miofibroblastos e hepatócitos) capazes de sintetizar e secretar os componentes da matriz extracelular. Além dessas, as células estreladas de Ito têm sido implicadas como células-chave na produção desses componentes (GABELE; BRENNER; RIPPE, 2003). Essas células residem no espaço de Disse e são a maior reserva de vitamina A e gordura no fígado. Sob a ação de citocinas fibrogênicas elas se diferenciam em miofibroblastos e fibroblastos, sintetizando ativamente elementos da matriz extracelular, tais como colágenos, elastina, proteoglicanos e proteínas de constituição (ANDRADE, 2005).

Quando ocorre um dano hepático agudo, as células do parênquima se regeneram e há reposição das células que sofreram apoptose ou necrose. Esse processo é acompanhado por resposta inflamatória e uma limitada deposição de componentes da matriz extracelular. Todavia, quando há uma persistência desse dano, a regeneração eventualmente falha e os hepatócitos vão sendo substituídos por uma abundante quantidade de proteínas da matriz, principalmente colágeno, uma vez que os estímulos da fibrogênese superam aqueles da fibrólise e o tecido fibroso produzido em excesso se acumula, caracterizando o quadro de fibrose (ANDRADE, 2005), que nada mais é do que o resultado de uma resposta de cura montada pelo organismo do indivíduo, no sentido de reparar o dano sofrido pelo tecido hepático (FRIEDMAN, 2003).

A distribuição desse material fibroso formado depende da origem do dano hepático (BATALLER; BRENNER, 2005). Na esquistossomose mansônica, a disposição do tecido fibroso fica em torno das ramificações da veia porta. Isso se deve ao fato de que muitos ovos que são postos pelas fêmeas nos vasos do intestino são levados pela corrente sanguínea até os capilares dos espaços porta do fígado, onde ficam retidos. Uma vez localizados no parênquima hepático, esses ovos vão estimular a formação de granulomas. Esses granulomas se acumulam levando ao desenvolvimento de um manguito fibroso em torno das ramificações intra-hepáticas da veia porta. Esta disposição do tecido fibroso formado recebe o nome de fibrose periportal ou fibrose em haste de cachimbo de barro (“clay pipe stem fibrosis”), descrita pela primeira vez por Symmers em 1904 (REY, 2001).

A fibrose periportal é acompanhada de graus variáveis de obstrução vascular, com formação e dilatação de novos vasos no tecido fibroso (BOGLIOLO, 1957), o que garante oxigenação e nutrição ao parênquima hepático (REY, 2001).

1.4.1.1 Modelos experimentais e fibrose

Vários animais têm sido usados como modelos experimentais na reprodução da fibrose periportal. Entre eles estão macacos (SADUN et al., 1970), coelhos (CHEEVER et al., 1980) e camundongos (ANDRADE, 1987; ANDRADE; CHEEVER, 1993; ANDRADE; SILVA; SOUZA, 1997; WARREN, 1966). Estes últimos

representam o modelo de escolha por reproduzirem vários aspectos da doença humana, por desenvolverem um quadro de fibrose hepática semelhante ao que ocorre no homem, por serem facilmente manipuláveis e pelo seu baixo custo. Esses modelos têm trazido uma grande contribuição para o entendimento dos mecanismos envolvidos na patogênese da fibrose hepática esquistossomótica, esclarecendo aspectos que não podem ser investigados em seres humanos, por questões éticas e operacionais.

Warren (1966) conseguiu reproduzir uma lesão equivalente à fibrose de Symmers do homem no camundongo Swiss albino eutrófico, infectado com *S. mansoni*. Andrade e Warren (1964), Andrade (1987) e Andrade e Cheever (1993) também observaram o desenvolvimento dessa lesão em 30 a 50% dos animais da mesma linhagem, quando submetidos a infecções leves (1 a 2 pares de vermes) e prolongadas (16 ou mais semanas). Entretanto, Coutinho et al. (1997; 2003) não conseguiram reproduzir esse quadro histológico em camundongos desnutridos da mesma cepa, submetidos às mesmas condições de experimentação.

Os resultados acima citados sugerem, portanto, que tempo e carga parasitária, fatores causais comprovadamente importantes, não são os únicos que atuam no desenvolvimento da fibrose hepática esquistossomótica.

1.5 Estado nutricional e reação imune

Existe uma relação dinâmica entre doença, imunidade e nutrição. A imunidade do hospedeiro depende da replicação celular e da síntese protéica, por essa razão é diretamente afetada pelo estado nutricional do indivíduo, que determina a habilidade metabólica celular e a eficiência com que a célula reage aos estímulos, dando início e continuidade às respostas imunes. Dentre as conseqüências das deficiências nutricionais pode ser citada a diminuição da imunidade humoral e celular, da capacidade bactericida dos fagócitos, da produção de componentes do sistema complemento, do número total de linfócitos, do equilíbrio entre os subtipos de linfócitos T e dos mecanismos inespecíficos de defesa (BRUNETTO et al., 2007).

A desnutrição protéico-energética provoca uma deficiência de calorias e

aminoácidos, essenciais na síntese de DNA e RNA, na produção de proteínas de fase aguda e de energia (SAKER, 2004). Essa deficiência leva a um considerável comprometimento do sistema imune, uma vez que as citocinas são constituídas por aminoácidos e a expansão clonal desse sistema depende da síntese protéica (CHANDRA, 1992).

Considerando que a má absorção protéica que ocorre em camundongos subnutridos é agravada quando estes animais são expostos à infecção pelo *S. mansoni* (COUTINHO et al., 1992), Coutinho et al. (1997), utilizando dois grupos de animais, um alimentado com dieta balanceada (controle) e outro submetido a dieta hipoprotéica, observaram que o grupo eutrófico apresentou lesões decorrentes da formação de granulomas e fibrose periportal, ao contrário do que foi visto em animais desnutridos. Mesmo com a perda de peso corporal e com a generalizada atrofia dos órgãos internos, os animais desnutridos mostraram ausência de fibrose periportal (após análise histológica e morfométrica do tecido hepático), menor diâmetro dos granulomas e menor percentual de tecido colágeno. O estudo parasitológico revelou, nesses animais, menor carga parasitária em relação aos seus controles.

Em outro estudo, Coutinho et al. (2003) utilizaram dois grupos de camundongos albinos *Swiss* infectados com *S. mansoni*. Um grupo foi alimentado com dieta comercial balanceada, posteriormente substituída por dieta experimental hipoprotéica; enquanto que outro grupo de animais foi alimentado com dieta deficiente em proteína e, em seguida, submetido a alimentação com dieta balanceada. No primeiro grupo procurou-se induzir a redução da fibrose hepática já instalada; e no segundo, onde não havia fibrose, fez-se a tentativa de induzir a sua formação. Observou-se que os camundongos desnutridos falharam em desenvolver a lesão. Uma outra tentativa de induzir a formação da fibrose nessa mesma linhagem de camundongos foi desenvolvida por Coutinho et al. (2007). Camundongos desnutridos e eutróficos foram submetidos a repetidas infecções pelo *S. mansoni*. Novamente, os animais desnutridos foram incapazes de desenvolver a fibrose periportal, enquanto que a lesão ocorreu em 44% dos animais eutróficos.

Nesses casos, o estado nutricional pode estar relacionado com a inibição do desenvolvimento da fibrose periportal nos camundongos desnutridos, provavelmente por suprimir a resposta imunológica desses animais, o que se reflete no tamanho e na composição dos granulomas hepáticos periovulares.

Levando em consideração que a deficiência protéica é considerada um potente imunodepressor (MEIRA, 1995), Oliveira et al. (2004) avaliaram a resposta imune humoral e celular em camundongos esquistossomóticos desnutridos não isogênicos, na fase crônica da infecção. Os animais com deficiência protéica apresentaram baixos títulos séricos de IgG1, IgG2b e IgG3 em relação a camundongos eutróficos infectados. Contudo, não houve diferença quanto à produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-5 nos dois grupos de animais estudados.

O presente trabalho visa estudar as diferenças de perfil imunológico entre camundongos isogênicos desnutridos e eutróficos, avaliadas através da produção das citocinas IL-13, IL-4, e IFN- γ e desenvolvimento das lesões hepáticas esquistossomóticas, em três diferentes fases da infecção (aguda, intermediária e crônica).

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que o papel das citocinas na infecção esquistossomótica vem sendo exhaustivamente investigado no modelo camundongo eutrófico e também no homem, porém com resultados ainda discrepantes; e considerando, ainda, que são muito escassas na literatura as referências sobre o perfil imunológico e a imunopatologia de camundongos desnutridos infectados, é de grande relevância que sejam realizados estudos a respeito do papel do estado nutricional do hospedeiro no desenvolvimento da imunidade celular e das lesões hepáticas esquistossomóticas crônicas, em virtude do contingente de pacientes desnutridos encontrados nas áreas endêmicas para esquistossomose.

3 PERGUNTA CONDUTORA

Existem diferenças entre hospedeiros desnutridos e eutróficos, quanto à cinética da resposta imune celular e a morfologia hepática, durante a infecção por *Schistosoma mansoni*?

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar as características da resposta imune do tipo celular e da patologia hepática, na infecção por *S. mansoni*, em camundongos isogênicos desnutridos e eutróficos.

4.2 Específicos

- a) Determinar o estado nutricional dos camundongos, através da análise das curvas ponderais.
- b) Avaliar a produção das citocinas IL-4, IL-13 e IFN- γ em três diferentes tempos de infecção correspondentes às fases aguda, intermediária e crônica, em camundongos desnutridos e eutróficos.
- c) Estudar a morfologia hepática durante três fases da infecção esquistossomótica (60, 90 e 150 dias) em relação à formação dos granulomas e suas características, bem como ao desenvolvimento da fibrose hepática periportal, nos dois grupos acima citados.
- d) Caracterizar, morfometricamente, parâmetros relacionados aos granulomas e quantificar, morfométrica e bioquimicamente, a produção de colágeno no fígado de camundongos eutróficos e desnutridos.
- e) Avaliar a intensidade da infecção através da carga parasitária em camundongos desnutridos e eutróficos, pela quantificação do número de ovos no fígado e do número de parasitos recuperados após a perfusão.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Camundongos machos, recém-desmamados (21 dias), isogênicos (C57BL/6), pesando entre 11 e 15 g, provenientes do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL – FIOCRUZ/ Rio de Janeiro), foram mantidos em gaiolas individuais, sob condições padronizadas de temperatura (22 a 23°C) e luminosidade (ciclos de 12 h de claro e 12 h de escuro).

A utilização desses animais no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) sob licença nº L-0028/07, cujo certificado encontra-se anexo.

5.2 Dietas

A desnutrição foi induzida nos animais pela administração da Dieta Básica Regional (DBR). Esta dieta, caracterizada por ser multideficiente, essencialmente hipoprotéica contendo aproximadamente 7,87% de proteína (COUTINHO; FREITAS; ABATH, 1992), foi desenvolvida após a realização de inquéritos de consumo alimentar em populações humanas residentes em áreas endêmicas para esquistossomose mansônica em Pernambuco e outros Estados do Nordeste brasileiro (COUTINHO, et al., 1972). A DBR, composta por quatro tipos fundamentais de alimentos (Tabela 1), é capaz de induzir em camundongos (COUTINHO et al., 1997) e ratos (TEODÓSIO et al., 1990) um tipo de desnutrição protéico-energética semelhante à forma marasmática que ocorre no homem.

Como dieta controle utilizada na alimentação dos animais eutróficos, foi fornecida a dieta comercial NUVILAB (Nuvital Nutrients LTDA., Colombo, Paraná, Brasil), contendo 22% de proteína (Tabela 1).

Todos os animais receberam dieta e água “ad libitum”.

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						
(Nuvital Nutrientes Ltda)	100,0	22,00	OBS: Dieta comercial balanceada, para camundongos.			

Fonte: Coutinho et al. (1997).

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

5.3 Estado nutricional

O estado nutricional dos animais de todos os grupos foi avaliado através da análise das curvas ponderais, obtidas após registro semanal do peso corporal utilizando balança de precisão (Precision: modelo PR 5000), além da observação do aspecto clínico dos animais, tais como pelagem, postura e motilidade (COUTINHO, 1980; TEODÓSIO et al., 1990).

A mortalidade espontânea dos animais, no decorrer do experimento, foi registrada para obtenção da taxa de mortalidade relacionada à infecção e estado nutricional.

5.4 Obtenção de cercárias e infecção

Para obtenção de cercárias, caramujos da espécie *B. glabrata* infectados com miracídeos de *S. mansoni* da cepa LE (Belo Horizonte) foram expostos à luz

artificial por cerca de 40 min. Após esse tempo, as cercárias foram quantificadas e cerca de 30 foram distribuídas em um volume de água de aproximadamente 10 mL para infectar os camundongo, individualmente. Os animais foram expostos à luz e mantidos em contato com essa suspensão por 1 h. Após esse tempo, foram removidos para suas respectivas gaiolas e a suspensão examinada ao microscópio óptico, para contagem das cercárias que não penetraram. Essa infecção foi realizada 30 dias após o início do consumo das respectivas dietas nos grupos experimentais desnutridos e eutróficos (ver item 5.5).

A fase crônica da infecção esquistossomótica murina é considerada completamente estabelecida a partir da 12^a semana (3 meses) após a exposição cercariana (FALLON, 2000a; PEARCE; MCDONALD, 2002). Observações realizadas em estudos prévios (ANDRADE; CHEEVER, 1993; COUTINHO et al., 2007) demonstraram que a fibrose hepática periportal começa a esboçar-se a partir da 16^a semana (4 meses) de infecção. Por essa razão, foi estabelecido que os tempos de infecção utilizados no presente estudo seriam 60, 90 e 150 dias (5 meses), para avaliação das fases aguda, intermediária e crônica da infecção, respectivamente.

5.5 Grupos experimentais

Os camundongos foram divididos em 4 grupos (n= 76):

A - Desnutrido infectado (DI) n= 19

C - Desnutrido não infectado (DNI) n= 19

B - Eutrófico infectado (EI) n= 19

D - Eutrófico não infectado (ENI) n= 19

Os animais com 150 dias de infecção, pertencentes aos grupos DI e EI foram usados para estudos parasitológico, morfológico (macroscópico e histopatológico), morfométrico, bioquímico e imunológico; enquanto que os animais com 60 e 90 dias de infecção participaram, apenas, dos estudos morfológico (histopatológico) e imunológico.

Os camundongos dos grupos não infectados (DNI e ENI) considerados como controles, foram sacrificados no mesmo período de tempo que os infectados (60, 90

e 150 dias) e estudados, apenas, nas etapas de avaliação morfológica (macroscópica) e imunológica.

5.6 Estudo parasitológico

5.6.1 Coleta e quantificação dos vermes após perfusão do sistema venoso portal

Os camundongos dos grupos DI e EI, com 150 dias de infecção, foram sacrificados após sedação prévia por injeção intraperitoneal de Xilasina (10 mg/Kg de peso corporal) e Ketamina (115 mg/Kg de peso corporal). Realizado o monitoramento anestésico e a verificação de que o animal não apresentava qualquer reflexo digital e caudal, foi efetuada uma incisão próxima aos órgãos genitais indo até a caixa torácica. A veia porta foi, então, seccionada e o ventrículo esquerdo perfundido com solução de perfusão [cloreto de sódio (8,5 g/L) e citrato de sódio (15 g/L)] para retirada dos vermes do sistema portal mesentérico (DUVALL; DE WITT, 1967), os quais foram decantados em cálices de sedimentação e posteriormente quantificados.

Após a perfusão o fígado e o baço foram removidos e pesados, para avaliação morfológica macroscópica. Posteriormente, o fígado foi seccionado em três fragmentos destinados a estudo parasitológico (contagem de ovos), morfológico (histopatológico), morfométrico e bioquímico. Todos esses procedimentos estão descritos nos itens que se seguem.

5.6.2 Contagem dos ovos contidos no fígado

Fragmentos de fígado foram retirados após a perfusão e digeridos em hidróxido de potássio (KOH) a 4% (CHEEVER, 1970). Os ovos encontrados foram quantificados com o auxílio da câmara de contagem de células “Sedgewick Rafter” (Graticules Limited: modelo S50, Tonbridge - England).

5.7 Estudo morfológico

5.7.1 Análise macroscópica dos órgãos

Logo após a perfusão, o fígado e o baço dos animais foram removidos, pesados e examinados macroscopicamente. Os valores obtidos através da pesagem foram utilizados para determinação da relação percentual entre o peso corporal dos camundongos no momento da necropsia e o peso dos órgãos acima citados, em relação a cada grupo.

5.7.2 Análise histopatológica

Amostras de fígado foram fixadas em *Bouin* (75 mL de solução saturada de ácido pícrico, 25 mL de formaldeído e 5 mL de ácido acético glacial) por 8 h, para estudo histológico. Após sucessivas lavagens com etanol a 70% para completa remoção do fixador, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol a partir de 70% até álcool absoluto. Após essa etapa, as amostras foram diafanizadas em xilol e impregnadas em parafina histológica fundida a 60°C. Posteriormente, foram incluídas em parafina, cortadas em micrótomo rotativo (Leica: modelo RM2125RT, Nussloch - Germany), obtendo-se cortes de 5 µm de espessura. Os cortes destinados ao estudo histopatológico foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) e aqueles utilizados no estudo morfométrico, foram corados pela técnica do picro-sirius vermelho (PS), seletiva para colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLOS; BRENTANI, 1979).

5.8 Estudo morfométrico

As lâminas de fígado, coradas pelo picro-sirius vermelho, foram examinadas em dez campos microscópicos aleatórios, através de Sistema de Processamento e Análise de Imagem Leica QWin, versão 2.6 MC (Leica Cambridge, Cambridge – England), com câmara digital acoplada (Leica JVC: modelo TK-C1380, Pine Brook, New Jersey – USA). Foram calculados os parâmetros: volume, densidade volumétrica e densidade numérica dos granulomas, além de mensurada a área percentual de tecido fibroso no fígado. Todos esses parâmetros estão descritos abaixo.

5.8.1 Volume dos granulomas (V)

Foram medidos os diâmetros de todos os granulomas viáveis (contendo ovo ou vestígio de ovo) encontrados nos dez campos aleatórios, para cada animal, em cada grupo. Atribuindo-se aos mesmos uma forma esférica, os raios obtidos a partir dos seus diâmetros foram aplicados à fórmula utilizada para o cálculo do volume da esfera, obtendo-se, assim, o volume dos granulomas.

$$V = R^3 \times \text{Pi} \times 4/3$$

R = raio

Pi = 3,14

5.8.2 Densidade volumétrica dos granulomas (Vv)

Para se obter a densidade volumétrica, foi mensurada, manualmente, com o uso do programa QWin, a área de todos os granulomas viáveis encontrados, cujos diâmetros foram utilizados para calcular o volume dos mesmos. Todas as áreas foram somadas e o resultado foi dividido pela soma dos valores das áreas dos campos (compartimentos), ou seja, a densidade de volume é o valor da área total

dos granulomas dividido pelo valor da área total dos compartimentos.

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

5.8.3 Densidade numérica dos granulomas (Nn)

Os granulomas encontrados nos campos microscópicos aleatórios foram somados e o resultado obtido, juntamente com o valor da densidade volumétrica, foi aplicado à fórmula de Weibel (1963).

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

N = número de granulomas

V_v = densidade volumétrica dos granulomas

5.8.4 Percentual de tecido fibroso (%)

O programa de morfometria computadorizado marcou o tecido fibroso diferenciado pela coloração com picro-sírius vermelho, que é seletiva para fibras colágenas, e, em seguida, forneceu, automaticamente, o percentual de tecido marcado. Ao final, os percentuais dos dez campos foram somados.

5.9 Estudo bioquímico

Amostras de fígado foram utilizadas para determinação do colágeno, medido através da hidroxiprolina (BERGMAN; LOXLEY, 1963). Estes fragmentos, pesando entre 100 e 200 mg, fixados em formol, foram colocados em 5 mL de ácido clorídrico 6 N, a uma temperatura de 110°C, em estufa por 18 h, com a finalidade de serem hidrolisados. Após a hidrólise, foram acrescentados 5 mL de água destilada ao

material, que foi submetido a filtração.

Alíquotas de 2 mL de cada amostra do material filtrado foram coletadas para posterior neutralização, colocando-se uma gota de fenolftaleína a 1% (3,3-bis[4-hydroxyphenyl] – 1[3H] – isobenzofuranone, Sigma Chemical, St. Louis, Missouri - USA), adicionando-se solução de hidróxido de sódio (NaOH – 10 N) e agitando até que o material obtivesse uma coloração rósea. Em seguida, gotejando-se ácido clorídrico (HCl – 3 N), o material foi agitado até que voltasse à coloração inicial. Ao final desse procedimento, o volume foi ajustado para 4 mL com água destilada.

A etapa seguinte consistiu de um ensaio colorimétrico onde padrões de solução de hidroxiprolina a 0,1 mM (Trans-4-Hydroxy-L-Proline, Sigma Chemical, St. Louis, Missouri - USA) foram preparados. Esses padrões participaram das etapas abaixo especificadas.

Alíquotas das amostras e padrões em um volume de 200 μ L foram acrescidos de álcool isopropanol (400 μ L), procedendo-se em seguida, à oxidação com 200 μ L de solução A (Cloramina T [N-Chloro-p-toluene-sulfonamide sodium salt, Sigma Chemical, St. Louis, Missouri - USA] + tampão citrato acetato). Em seguida, as amostras e os padrões foram incubados com 2,5 mL de solução B composta por solução de Erlich (reagente de Erlich [p-Dimethylamino-Benzaldehyde, Sigma Chemical, St. Louis, Missouri - USA] + ácido perclórico a 60%) e álcool isopropanol em banho-maria a 60°C, por 25 min. Ao final desse período de tempo, procedeu-se à leitura da densidade óptica em espectrofotômetro (Pharmacia: modelo Ultrospec 3000), em comprimento de onda de 558 nm. Os dados coletados foram aplicados a um programa computadorizado, que fornece a quantidade de hidroxiprolina em micromol por grama de fígado. Os níveis de hidroxiprolina foram corrigidos para intensidade da infecção, dividindo-se a hidroxiprolina hepática total pelo número de ovos de *S. mansoni* no fígado, analisando-se os resultados com auxílio de planilha de cálculo elaborada por Cheever et al. (1987).

5.10 Estudo imunológico

5.10.1 Obtenção de antígeno solúvel de ovo - SEA

Para obtenção desse antígeno, segundo Gazzinelli et al. (1983), foi utilizado um grupo extra de camundongos albinos Swiss outbred que não participaram das demais etapas do estudo. Esses animais foram infectados (via percutânea) com aproximadamente 100 cercárias de *S. mansoni* e perfundidos 60 dias após a infecção, segundo técnica descrita no item 5.7.1. Em seguida, os fígados foram removidos, segmentados e embebidos em solução salina a 1,7% por 24 h a 4°C. Após esse período, foram submetidos a banho-maria por 2 h a 37°C (Fanem: modelo 100, São Paulo, Brasil). Posteriormente, os fígados foram triturados (em liquidificador comum) por 5 min e a suspensão filtrada uma vez em malha de 180 µm e uma segunda vez em malha de 130 µm. O material filtrado foi distribuído em cálices de sedimentação por 2 h, para decantação. O sedimento foi depositado em tubos Falcon de 50 mL e submetido a cinco centrifugações (200 x g) de 5 min a 4°C (Centrífuga refrigerada, Beckman Instruments, Inc: modelo TJ-6R). O sobrenadante foi, então, desprezado e o precipitado ressuspendido em 10 mL de salina 1,7%.

Em seguida, o sedimento foi submetido à maceração manual com bastão de vidro na presença de inibidor de protease [EDTA (“Ethylene diamine tetracetic acid”) 1 mM em metanol, PMSF (“Phenylmethylsulfonyl fluoride”) 1 mM] resfriado. Após a maceração, todo o material foi ultrassonicado em três ciclos de 20 pulsos, sendo cada pulso de 60 s a uma potência de 25 W (Processador Ultrassônico 500 Watts, Cole Parmer: modelo 501). Após essa etapa, o material foi ultracentrifugado a 10⁴ x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante submetido à nova ultracentrifugação a 10⁵ x g por 1 h a 4°C (Ultracentrífuga Beckman Coulter: modelo Optima LE-80K, Palo Alto, Califórnia – USA). Após essa centrifugação, o sobrenadante foi dialisado, utilizando-se membrana de celulose para diálise, com capacidade de reter proteínas de peso molecular a partir de 12 kDa, para completa retirada dos sais presentes no antígeno.

Os antígenos obtidos foram dosados através do método de Bradford (1976) e seus perfis protéicos analisados através de eletroforese em gel de poli-acrilamida a uma concentração de 12% na presença de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS-

PAGE), de acordo com Laemmli (1970) e corados pelo Comassie Blue.

Esse antígeno, SEA, foi utilizado na etapa de estimulação de células esplênicas, descrita abaixo:

5.10.2 Cultura de células esplênicas

Em condições estéreis, 9 animais de cada grupo (DI, EI, DNI e ENI) foram sacrificados por deslocamento cervical em diferentes tempos (60, 90 e 150 dias, utilizando-se 3 animais para cada tempo), sendo os baços removidos para obtenção de células destinadas ao estudo da resposta imune celular durante as fases aguda, intermediária e crônica da esquistossomose. As suspensões de células esplênicas foram obtidas por maceração dos baços em meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo - Brasil) acrescido de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina a 1%) e aminoácido (1% de L-glutamina), e centrifugadas por 5 min a 300 x 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 ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal - WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro - Brasil) e a viabilidade observada pelo emprego de Trypan Blue a 10%. As suspensões celulares foram distribuídas em placas de cultura de 24 poços, em duplicata, na concentração de 5×10^6 células/mL submetidas a diferentes estímulos [SEA – 20 µg/mL ou Concanavalina A (ConA) – 5 µg/mL] ou simplesmente meio de cultura (sem estímulo), e então, cultivadas por 24, 48 e 120 h a 37°C em estufa de CO₂ a 5% (Forma Scientific Inc.), para obtenção de sobrenadante e posterior dosagem de citocinas. Esses três tempos de cultivo foram utilizados para determinar o melhor tempo de produção de cada citocina.

As culturas sem estímulo (apenas com meio de cultura) foram utilizadas como controle interno negativo. Ao mesmo tempo, foram utilizadas como controle positivo as culturas estimuladas com o mitógeno (ConA) onde foi avaliada a capacidade imunoproliferativa dos esplenócitos.

5.10.3 Dosagem de citocinas nos sobrenadantes

A dosagem das citocinas foi realizada através de ELISA de captura. Para IL-13 foi utilizado kit DuoSet Mouse IL-13 (DuoSet ELISA Development System, R & D Systems, Minneapolis, Minnesota - USA); para IFN- γ , o Kit OptEIA Mouse INF- γ Set (Pharmingen, San Diego, Califórnia - USA) e para IL-4 foram utilizados anticorpos pareados (Pharmingen, San Diego, Califórnia - USA).

As placas de ELISA (“Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”, DYNEX Immulon 4 HBX, USA) foram sensibilizadas com os anticorpos de captura [anti-IFN- γ (diluição de 1:200), anti-IL-4 (11B11 a 2 $\mu\text{g/mL}$) ou anti-IL-13 (4 $\mu\text{g/mL}$)], diluídos em Tampão Carbonato Bicarbonato de Sódio a 0,12 M, com pH 9,5, sendo distribuídos 50 μL em cada poço da placa e incubadas à temperatura de 4°C por 18 h.

Em seguida, as placas foram bloqueadas com 150 μL de uma solução de PBST (Tampão Salina Fosfato com 0,05% de Tween 20) e 10% de SBF (Soro Bovino Fetal - WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro - Brasil) durante 1 h. Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBST e, em seguida, adicionados 50 μL dos respectivos padrões recombinantes de camundongos: rIFN- γ , rIL-4 ou rIL-13 em duplicatas, diluídos em meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo - Brasil) em concentrações que variaram de 10 ng/mL a 0,625 ng/mL. Após a distribuição dos padrões, os sobrenadantes de cultura de esplenócitos foram colocados em quadruplicata nas placas de ELISA, que foram incubadas a 4°C por 18 h. Em seguida, foram lavadas com PBST e adicionados 50 μL dos anticorpos biotinizados [anti-IFN- γ (diluição de 1:500), anti-IL-4 (BVD624G2, a 1 $\mu\text{g/mL}$), anti-IL-13 (200 ng/mL)], diluídos com PBST e 0,1% de BSA (“Bovine Serum Albumin”) e incubadas à temperatura ambiente por 1 h e 30 min.

Posteriormente, cada placa foi novamente lavada três vezes com PBST. O conjugado enzimático, diluído 1:3000 (estreptoavidina marcada com peroxidase, Sigma Chemical, St. Louis, Missouri - USA) em PBST contendo BSA a 0,1%, foi adicionado às placas e estas incubadas à temperatura ambiente por 1 h. Novamente foram lavadas com PBST e a reação revelada pela adição do substrato contendo H₂O₂ e o cromógeno ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Sigma Chemical, St. Louis, Missouri – USA] dissolvidos em tampão citrato fosfato de

sódio a 0,1 M com pH de 5,5 para a citocina IL-4. As citocinas IFN- γ e IL-13 foram reveladas pela adição de TMB (3,3',5,5' – tetramethylbenzidine, DAKO, Carpinteria, Califórnia - USA). A reação foi, então, bloqueada com ácido cítrico a 0,2 M para a citocina IL-4 e com ácido sulfúrico a 2 N para IFN- γ e IL-13. A leitura foi realizada em leitor de ELISA (Biorad Laboratories: modelo 3550) em comprimento de onda de 405 nm para a primeira citocina e em 450 nm para as duas últimas.

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 foram apresentados como médias aritméticas \pm erro padrão da média.

5.10.4 Determinação da cinética de produção das citocinas

Após a dosagem das citocinas em cada tempo utilizado para o cultivo das células (24, 48 e 120 h), foi verificado que a maior produção das citocinas IL-4 e IL-13 ocorrem no período de 120 h, enquanto que para IFN- γ o melhor tempo de produção foi de 24 h. Uma vez determinado o melhor tempo de produção para cada citocina, esse ponto foi utilizado para a construção de gráficos de evolução da cinética de produção de cada uma das citocinas nos tempos de infecção estudados (60, 90 e 150 dias).

5.11 Análise estatística

Foi realizada análise descritiva para expor os resultados obtidos utilizando-se os “softwares” Excel v. 2000 e SPSS v. 8.0. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas e gráficos, incluindo o uso de algumas medidas descritivas como média aritmética, desvio padrão ou erro padrão da média. Para a análise comparativa das variáveis quantitativas foram aplicados os testes “t”

de Student, Mann Whitney ou Análise de variância (ANOVA). Para testar os contrastes foi aplicado o teste de Levene para verificar a suposição da homogeneidade das variâncias; quando verificada, aplicou-se o teste de Tukey. Para a análise das variáveis qualitativas foi utilizado o teste do Qui-quadrado. Todas as conclusões foram tomadas a nível de significância de 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Estudo imunológico

6.1.1 Avaliação do antígeno solúvel de ovo (SEA)

A análise eletroforética do perfil protéico do SEA revelou que esse antígeno é constituído por um conjunto de proteínas de diferentes pesos moleculares, que variam desde superiores a 94 kDa até inferiores a 20,1 kDa (Figura 2).

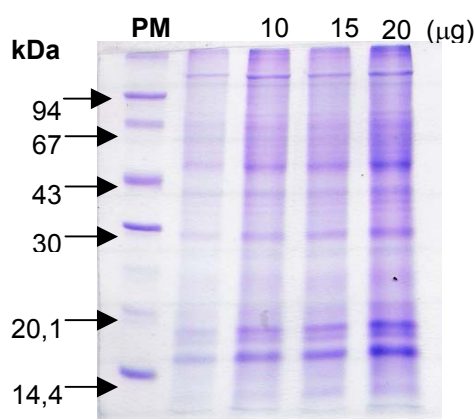


Figura 2- Eletroforese em gel de poliacrilamida com coloração pelo Coomassie blue, das proteínas do antígeno solúvel de ovo (SEA).

Nota: O SEA foi aplicado no gel em diversas quantidades (5, 10, 15 e 20 µg). A primeira coluna corresponde ao peso molecular padrão (PM).

6.1.2 Avaliação dos níveis de citocinas após estimulação com SEA

6.1.2.1 Produção de $IFN-\gamma$

Foi observada uma maior produção de $IFN-\gamma$ aos 60 dias de infecção para o grupo DI em relação ao grupo EI, com diferença estatisticamente significativa ($p =$

0,03). Noventa dias após a infecção, os níveis de IFN- γ diminuíram em ambos os grupos (DI e EI, $p > 0,05$). A análise realizada na fase crônica da doença, ou seja, 150 dias após a infecção, mostrou que não foi detectada produção de IFN- γ para esses mesmos grupos estudados (Figura 3).

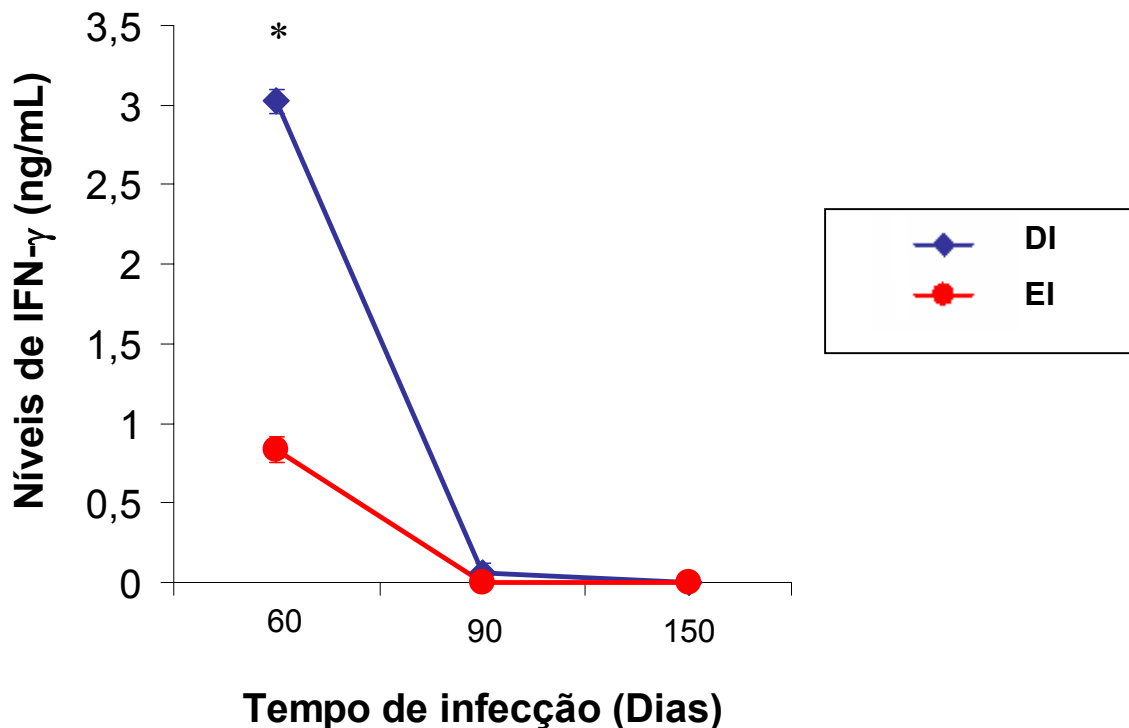


Figura 3 - Produção de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos e eutróficos, infectados com *S. mansoni*.

Nota: As células foram estimuladas com o antígeno SEA (20 μ g/mL) nos períodos de 60, 90 e 150 dias após a infecção e o sobrenadante coletado após 24h de cultivo. A cor azul representa o grupo desnutrido infectado (DI) e a vermelha representa o grupo eutrófico infectado (EI). (*) Diferença estatística ($p = 0,03$) entre os grupos DI e EI no período de 60 dias após a infecção ($X \pm EPM$).

6.1.2.2 Produção de IL-4

Sessenta dias após a infecção, não foi detectada produção de IL-4, tanto para o grupo desnutrido quanto para o grupo eutrófico. No período de 90 dias de infecção, foram detectados níveis elevados dessa citocina, com valores mais altos para os animais do grupo DI ($p = 0,02$). Aos 150 dias de infecção, a produção de IL-

4 diminuiu para ambos os grupos estudados, atingindo níveis equivalentes ($p > 0,05$, Figura 4).

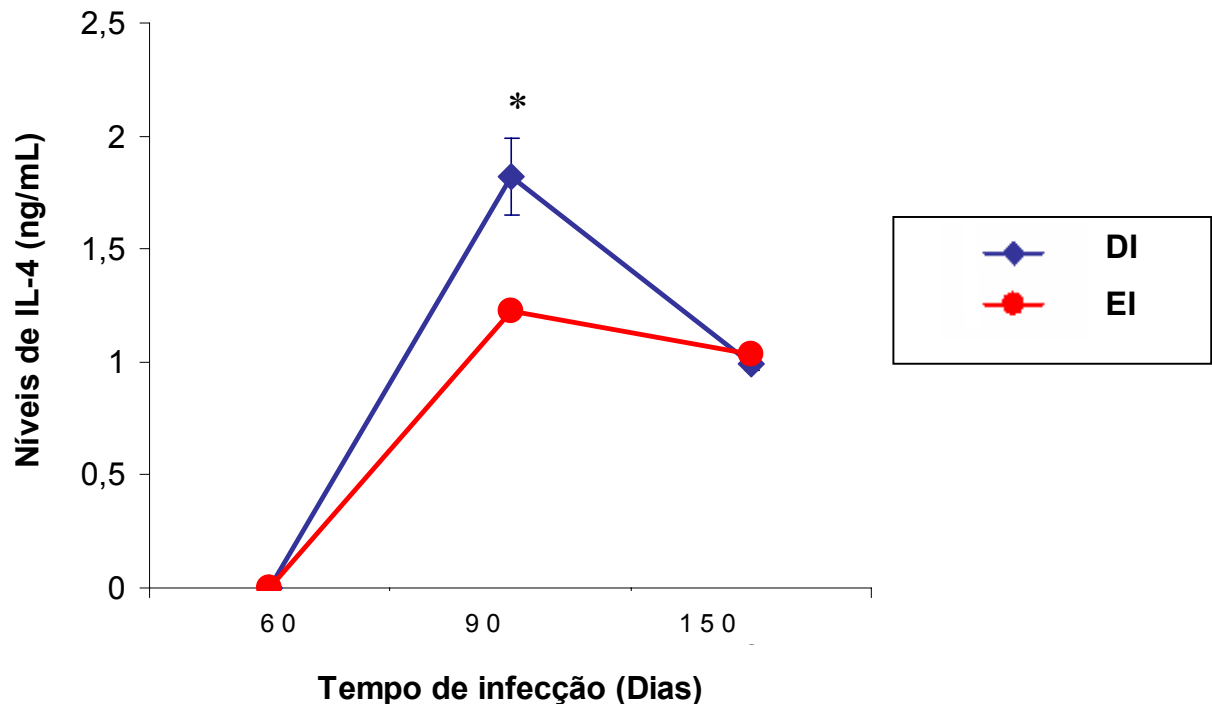


Figura 4 - Produção de IL-4 nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos e eutróficos, infectados com *S. mansoni*.

Nota: As células foram estimuladas com o antígeno SEA (20 μ g/mL) nos períodos de 60, 90 e 150 dias após a infecção e o sobrenadante coletado após 120h de cultivo. A cor azul representa o grupo desnutrido infectado (DI) e a vermelha representa o grupo eutrófico infectado (EI). (*) Diferença estatística ($p = 0,02$) entre os grupos DI e EI no período de 90 dias de infecção ($X \pm EPM$).

6.1.2.3 Produção de IL-13

Analisando a produção de IL-13 no período de 60 dias de infecção foram observados níveis mais elevados para os animais eutróficos, quando comparados aos desnutridos ($p > 0,05$). No entanto, aos 90 dias, os níveis de IL-13 do grupo DI aumentaram e atingiram níveis mais elevados do que o grupo EI ($p = 0,02$). Esse último grupo (EI) apresentou uma diminuição na produção IL-13, quando comparada com os seus níveis aos 60 dias ($p > 0,05$). O grupo EI permaneceu produzindo níveis semelhantes de IL-13 aos 150 dias, enquanto que o DI apresentou uma

queda, chegando a valores mais baixos que o grupo EI. A diferença entre as médias desses grupos (DI e EI), nesse período de tempo, foi significativa ($p = 0,001$, Figura 5).

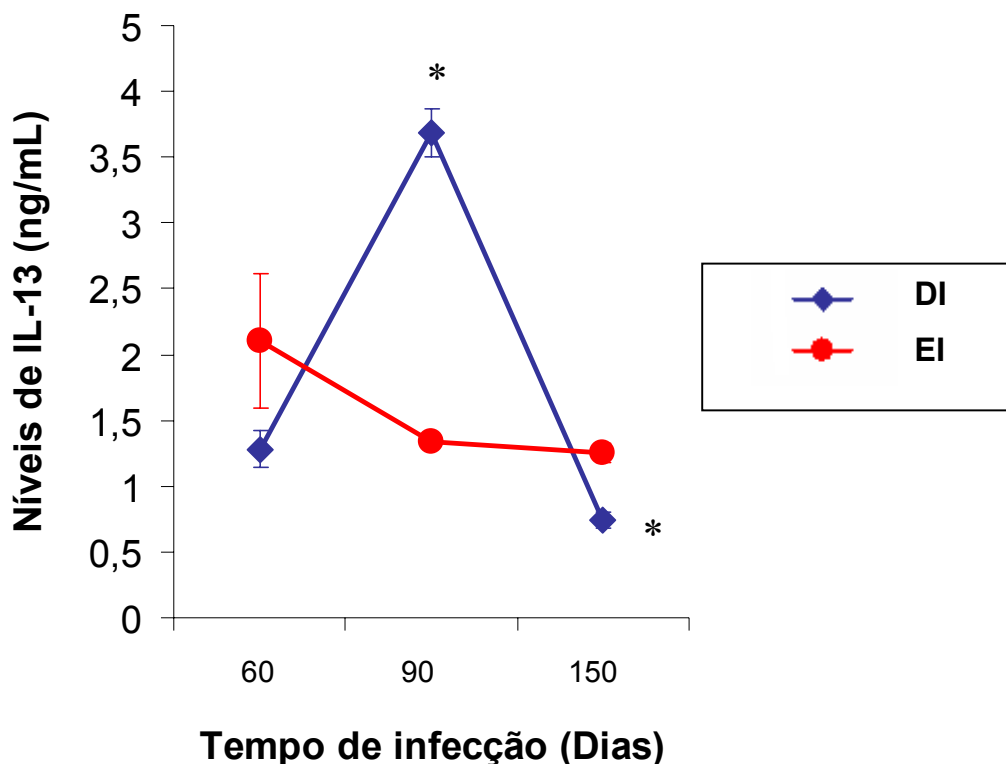


Figura 5 - Produção de IL-13 nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos isogênicos (C57BL/6) desnutridos e eutróficos, infectados com *S. mansoni*.

Nota: As células foram estimuladas com o antígeno SEA (20 $\mu\text{g/mL}$) nos períodos de 60, 90 e 150 dias após a infecção e o sobrenadante coletado após 120 h de cultivo. O ponto azul representa o grupo desnutrido infectado (DI) e o vermelho representa o grupo eutrófico infectado (EI). (*) Diferença estatística entre os grupos DI e EI no período de 90 ($p = 0,02$) e 150 ($p = 0,001$) dias de infecção ($\bar{X} \pm \text{EPM}$).

Para todas as citocinas avaliadas os controles positivos utilizados (culturas estimuladas com ConA) apresentaram resultados satisfatórios relacionados a imunoproliferação dos esplenócitos (dados não mostrados).

Na Tabela 2 encontra-se descrita, sinopticamente, a evolução da resposta imune celular de ambos os grupos estudados, em todos os pontos de tempo analisados.

Quadro 1: Sinopse dos resultados da resposta imune celular durante a infecção esquistossomótica, em camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI).

60 dias de infecção	90 dias de infecção	150 dias de infecção
Desnutridos: Indicativo de perfil Th1.	Desnutridos: Perfil Th2.	Desnutridos: Perfil Th2.
IFN- γ : 3 ng/mL	IFN- γ : não foi detectada	IFN- γ : não foi detectada
IL-4: não foi detectada	IL-4: 1,8 ng/mL	IL-4: 0,9 ng/mL
IL-13: 1,2 ng/mL	IL-13: 3,6 ng/mL	IL-13: 0,7 ng/mL
Eutróficos: Indicativo de perfil Th2	Eutróficos: Perfil Th2	Eutróficos: Perfil Th2
IFN- γ : 0,8 ng/mL	IFN- γ : não foi detectada	IFN- γ : não foi detectada
IL-4: não foi detectada	IL-4: 1,2 ng/mL	IL-4: 1,0 ng/mL
IL-13: 2,1 ng/mL	IL-13: 1,3 ng/mL	IL-13: 1,2 ng/mL

Nota: Os resultados acima representam a média aritmética dos respectivos grupos (desnutridos ou eutróficos), nos tempos de infecção estudados.

6.2 Estudo morfológico

6.2.1 Macroscopia do fígado e do baço

A Figura 6 mostra a relação percentual entre o peso corporal e o peso dos órgãos (fígado e baço) dos animais infectados e seus respectivos controles, no momento do sacrifício (150 dias após a infecção).

A relação peso corporal *versus* peso do fígado foi maior para os animais eutróficos, quando comparada com os desnutridos, havendo diferença estatística entre os grupos EI e DI ($p < 0,001$). A comparação realizada entre os grupos

eutróficos mostrou que o grupo infectado (EI) apresentou uma relação percentual maior que o grupo não infectado (ENI), com $p < 0,001$. O mesmo foi observado entre os grupos desnutridos infectados (DI) e não infectados (DNI), sendo $p < 0,001$.

A relação peso corporal *versus* peso do baço mostrou que os animais infectados, tanto eutróficos (EI) quanto desnutridos (DI), apresentaram sempre relações percentuais maiores que os seus respectivos controles não infectados (ENI e DNI), porém essa diferença entre as médias não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$).

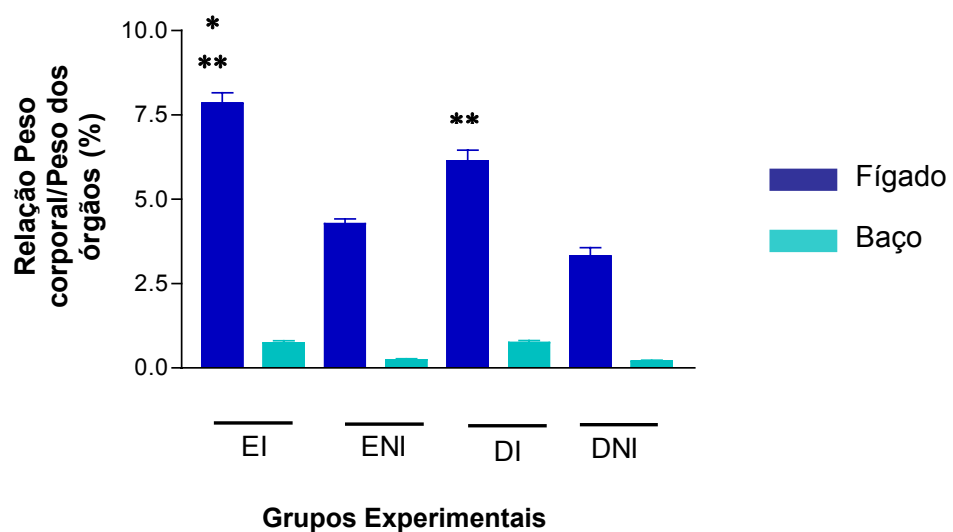


Figura 6 - Relação percentual entre o peso corporal e o peso dos órgãos (fígado e baço) de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com *S. mansoni*, em comparação com seus respectivos controles não infectados (DNI e ENI).

Nota: * Diferença estatística significativa entre os grupos eutróficos e desnutridos, infectados. ** Diferença estatística significativa entre os grupos infectados eutróficos e desnutridos, comparados com os respectivos grupos não infectados ($p < 0,001$).

6.2.2 Histopatologia do fígado

6.2.2.1 *Fase aguda*

Os camundongos desnutridos e com 60 dias de infecção apresentavam parênquima com discreta atrofia das traves hepáticas, mas sem alterações degenerativas importantes, exceto eventuais focos de necrose coagulativa aguda, com intensa infiltração local de polimorfonucleares, sobretudo de eosinófilos. Esses infiltrados inflamatórios, de caráter difuso, eram freqüentemente observados nos espaços-porta médios e grandes (hepatite reacional). Os granulomas esquistosomóticos periovulares eram pouco numerosos, de pequena dimensão, isolados, distribuídos esparsamente pelo parênquima e, em sua maioria, compostos predominantemente por polimorfonucleares eosinófilos e neutrófilos, com predomínio dos primeiros, além de alguns macrófagos e linfócitos (granulomas em fase exsudativa). Esses granulomas mostravam-se, às vezes, agrupados, formando extensos conglomerados. Em todos os camundongos desse grupo as infecções foram de caráter moderado, em relação ao aspecto histopatológico (Figura 7).

Nos camundongos eutróficos com 60 dias de infecção, os aspectos histológicos diferiam em relação à presença de maior número de granulomas periovulares, isolados e esparsamente distribuídos pelo parênquima hepático, às vezes formando conglomerados, sendo os mesmos de maior dimensão em relação ao que foi visto no grupo dos animais desnutridos. Além disto, em muitos desses granulomas notava-se deposição de pequena quantidade de colágeno. Também ocorria intensa infiltração eosinofílica nos médios e grandes espaços-porta e, às vezes, na porção central dos granulomas. Áreas de necrose aguda coagulativa (necrose isquêmica) também foram observadas (Figura 8).

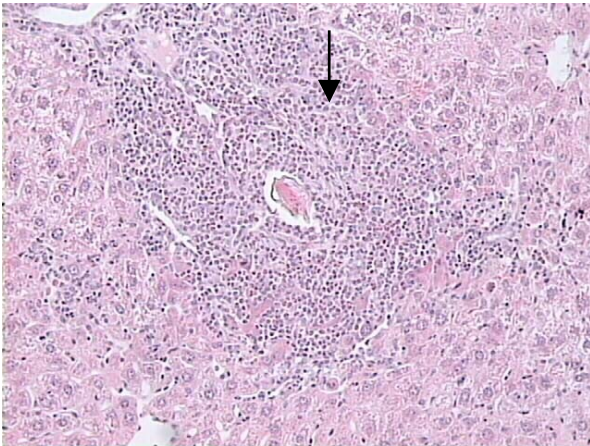


Figura 7 - Camundongo desnutrido, com 60 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Granuloma do tipo exsudativo, observando-se intensa proliferação de eosinófilos em torno de ovo em degeneração (HE – 100x).

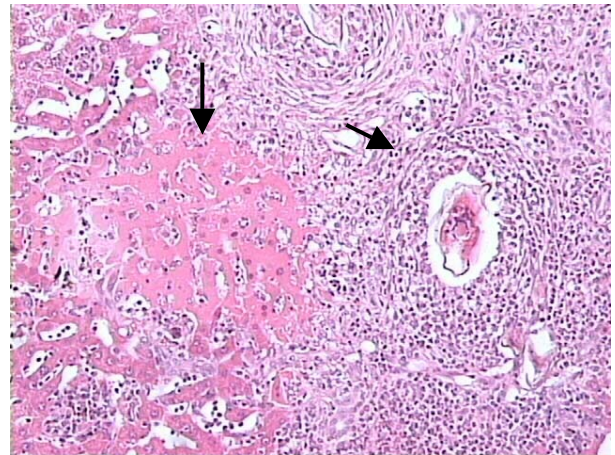


Figura 8 - Camundongo eutrófico, com 60 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Presença de eosinofilia intensa em torno do ovo com miracídio em desintegração e alguns mononucleares permeando o infiltrado eosinofílico. Observa-se, ainda, área de necrose isquêmica coagulativa, (HE – 200x).

6.2.2.2 Fase intermediária

Aos 90 dias, fase arbitrada na presente investigação como “intermediária”, o grupo desnutrido apresentava numerosos granulomas periovulares ora isolados, ora coalescentes, com presença de macrófagos e deposição colágena moderada. A infiltração eosinofílica ocorria em menor intensidade e nos granulomas depositava-se um colágeno de aspecto fibrilar. Em 3 animais desse grupo foram vistos, em grandes espaços-porta, conglomerados de ovos e aumento moderado do tecido conjuntivo portal (Figuras 9, 10 e 11).

Nesse mesmo ponto de tempo, camundongos eutróficos também apresentavam infecções intensas, com granulomas periovulares ora isolados, ora agrupados. Em 4 animais ocorria aumento do tecido conjuntivo portal, com presença de granulomas periovulares em fase predominantemente produtiva, notando-se, ainda, certo grau de eosinofilia em grandes espaços-porta e na intimidade de alguns granulomas (Figura 12).

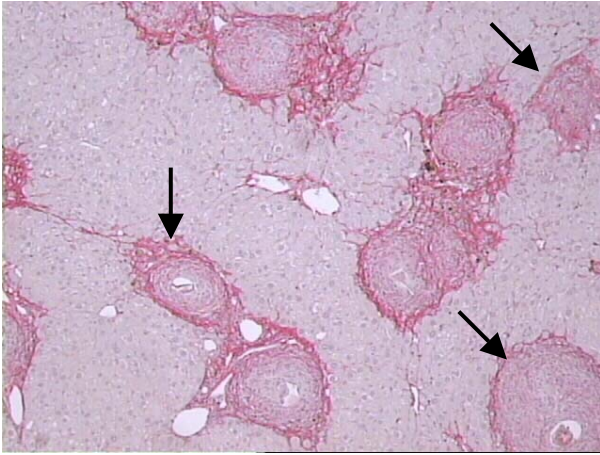


Figura 9 - Camundongo desnutrido, com 90 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Granulomas isolados, pequenos, esparsos pelo parênquima e com pequena deposição de tecido colágeno (PS- 100x).

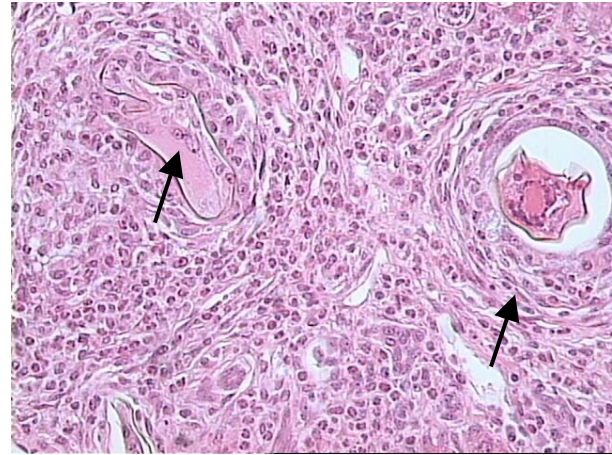


Figura 10 - Camundongo desnutrido, com 90 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Ovos do parasito em degeneração, envolvidos por intensa reação eosinofílica. Presença de mononucleares na estrutura do granuloma (à direita) e de gigantócito invadindo a casca do ovo (à esquerda) - HE- 400x.

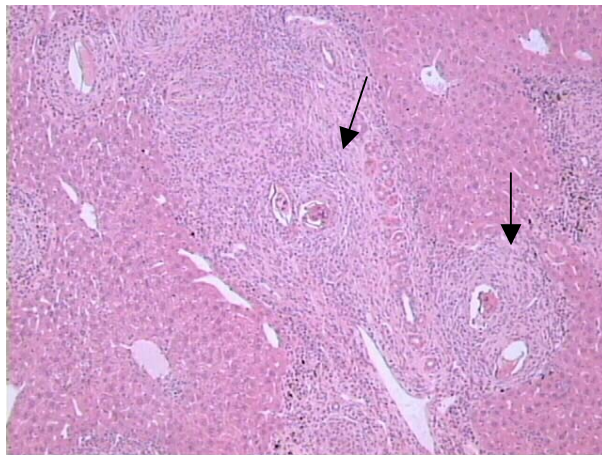


Figura 11 - Camundongo desnutrido, com 90 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Conglomerados fibrosos periovulares em espaço porta (HE- 100x).

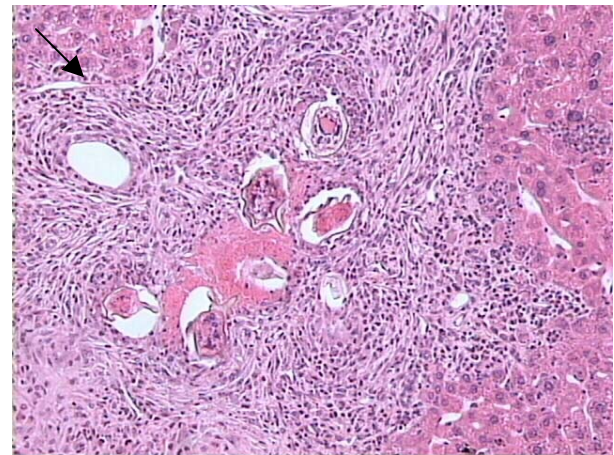


Figura 12 - Camundongo eutrófico, com 90 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Infiltração eosinofílica e aumento do tecido fibroso do espaço-porta devido à presença de conglomerados de ovos (HE- 200x).

6.2.2.3 Fase crônica

Na fase crônica da infecção (150 dias), os camundongos desnutridos apresentavam numerosos granulomas periovulares isolados, pequenos, sendo freqüente formação de extensos conglomerados de ovos nos espaços-porta e/ou em pleno parênquima hepático. Esses granulomas eram formados por células mononucleares, alguns linfócitos e eosinófilos em quantidade moderada. Observava-se, ainda, pequena deposição de colágeno nos granulomas e discreto aumento de colágeno nos espaços-porta médios e grandes. Esses granulomas de aspecto produtivo, com pouca fibrose, contrastavam com os granulomas exsudativos, ricos em polimorfonucleares, sobretudo eosinófilos, presentes na fase aguda da infecção. Eventuais focos de esteatose não sistematizada também foram observados. Em nenhum dos animais foram detectadas imagens sugestivas de fibrose periportal murina equivalente à fibrose hepática humana de Symmers (Figuras 13 e 14).

O grupo de camundongos eutróficos 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 periovulares formados em torno de ovos de *S. mansoni* degenerados ou de resto de cascas, a maioria de predominância colágena, às vezes exibindo componente exsudativo, particularmente eosinófilos. Também pôde ser observada presença de pigmento pardo-amarelado, grumoso, sobretudo nos espaços-porta mais calibrosos (pigmento esquistossomótico). Esses granulomas eram isolados e distribuídos de modo não sistematizado no parênquima. Nos casos de infecção mais intensa, apresentavam-se em colescência, 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 (Figuras 15 e 16).

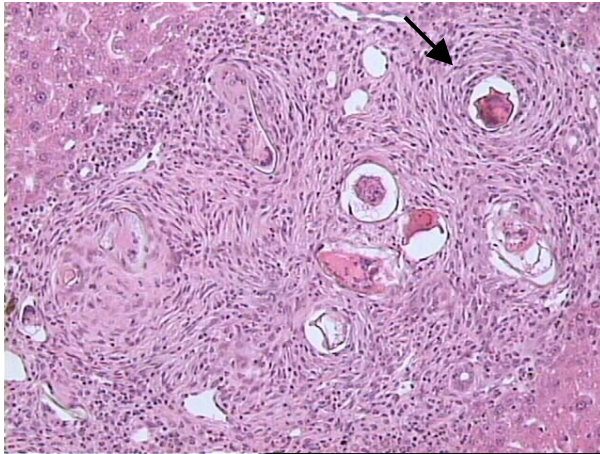


Figura 13 - Camundongo desnutrido, com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Conglomerados de ovos degenerados e granulomas colagenizados (HE- 200x).

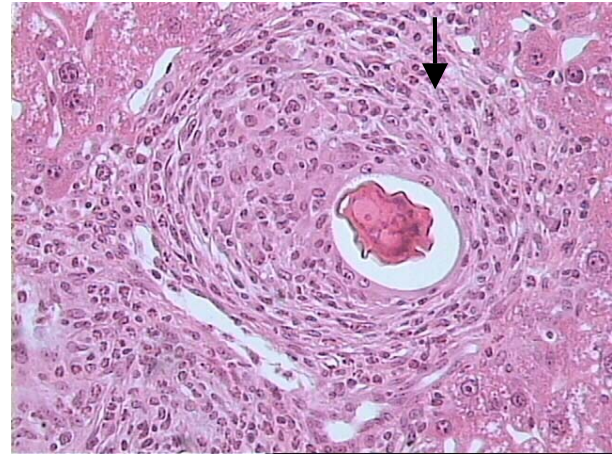


Figura 14 - Camundongo desnutrido, com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Detalhe do granuloma periovular, observado em maior aumento: observar presença de eosinófilos, riqueza de células mononucleares e início de deposição colágena (HE- 400x).

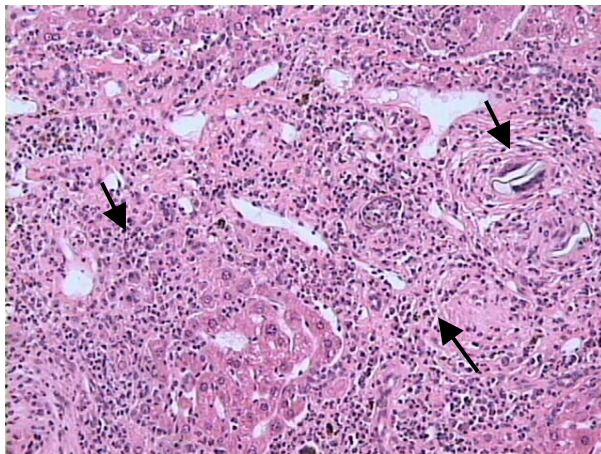


Figura 15 - Camundongo eutrófico, com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Infiltração difusa por polimorfonuclearares e presença de granulomas periovulares colagenizados, envolvendo restos de cascas de ovos (HE- 200x).

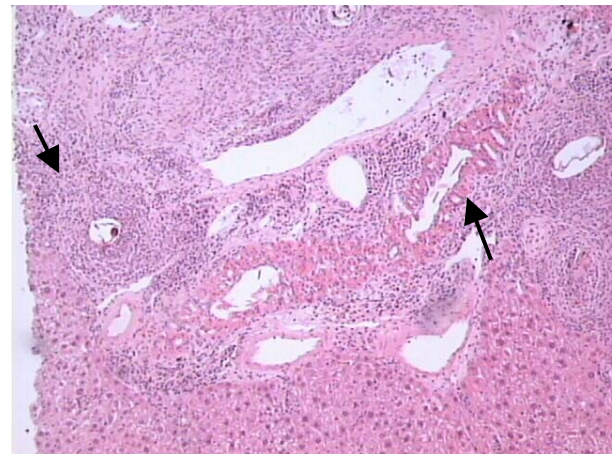


Figura 16 - Camundongo eutrófico, com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Fibrose hepática periportal murina: observar o aumento do tecido conjuntivo portal com restos de estruturas granulomatosas periovulares, infiltração inflamatória crônica, hiperplasia de ductos bilíferos e neoformação vascular (HE- 200x).

6.3 Estudo morfométrico

De acordo com a análise morfométrica realizada no tecido hepático dos camundongos infectados, o percentual de tecido fibroso encontrado foi mais elevado para os animais eutróficos em relação aos desnutridos. Do mesmo modo, os parâmetros sobre densidade volumétrica e numérica dos granulomas esquistossomóticos periovulares mostraram valores mais altos para o grupo de animais alimentados com dieta NUVILAB (EI), em comparação com os animais alimentados com a dieta DBR (DI). O parâmetro volume dos granulomas, todavia, apresentou-se mais elevado entre os animais desnutridos comparados com os eutróficos. No entanto, nenhum dos parâmetros analisados apresentou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Todos os valores estão expostos na Tabela 3.

Tabela 2 - Análise morfométrica realizada no tecido hepático de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com *S. mansoni*.

	Grupo	n ^(*)	X	EPM
Fibrose (%)	DI	8	6,88	1,13
	EI	8	8,07	0,87
Volume dos granulomas (μm^3)	DI	8	$4,24 \times 10^6$	$0,72 \times 10^6$
	EI	8	$3,77 \times 10^6$	$0,57 \times 10^6$
Densidade volumétrica	DI	8	0,019	0,002
	EI	8	0,025	0,006
Densidade numérica (mm^{-4})	DI	8	107,44	15,71
	EI	8	148,99	42,29

Nota: n = número de animais por grupo (dos 10 animais usados no estudo histopatológico, apenas 8 participaram do estudo morfométrico); X = média; EPM = erro padrão da média.

6.4 Estudo bioquímico

A Figura 17 ilustra a quantidade de colágeno hepático medido através da dosagem bioquímica da hidroxiprolina. No grupo eutrófico foi observado um discreto aumento na quantidade de tecido colágeno em relação ao grupo desnutrido, no entanto essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$). Esse resultado apresentou associação com o percentual de tecido colágeno mensurado morfometricamente.

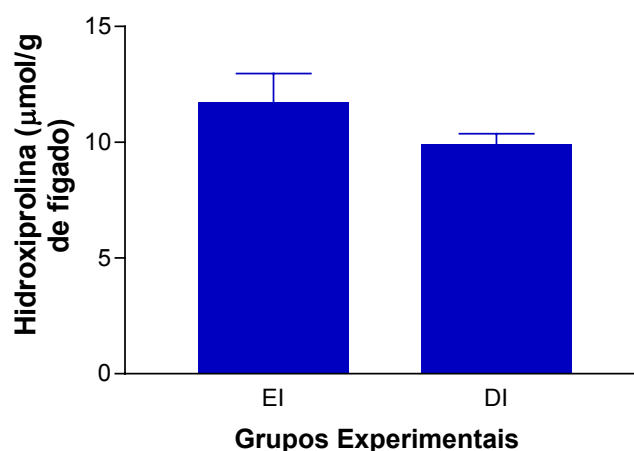


Figura 17 - Níveis de hidroxiprolina hepática ($\mu\text{mol/g}$ de fígado), mensurada através da dosagem bioquímica em camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com *S. mansoni*.

6.5 Estado Nutricional

O estudo da curva ponderal dos animais (Figura 18) revelou superposição das curvas dos grupos EI e ENI, o mesmo fenômeno sendo observado em relação aos grupos DI e DNI. As curvas dos grupos eutróficos mostraram, durante todo o experimento, valores maiores quando comparadas às dos grupos desnutridos ($p < 0,001$).

Os animais alimentados com dieta balanceada apresentaram curvas ascendentes a partir da 3ª até a última semana de experimento. Por outro lado, os animais alimentados com dieta DBR mostraram curvas discretamente ascendentes nas dez primeiras semanas de experimento e, a partir desse ponto, mantiveram-se

estáveis até o final do período estudado. O estado nutricional dos animais parece não ter sofrido influência da infecção, uma vez que ambos os grupos infectados apresentaram comportamento semelhante ao de seus respectivos controles.

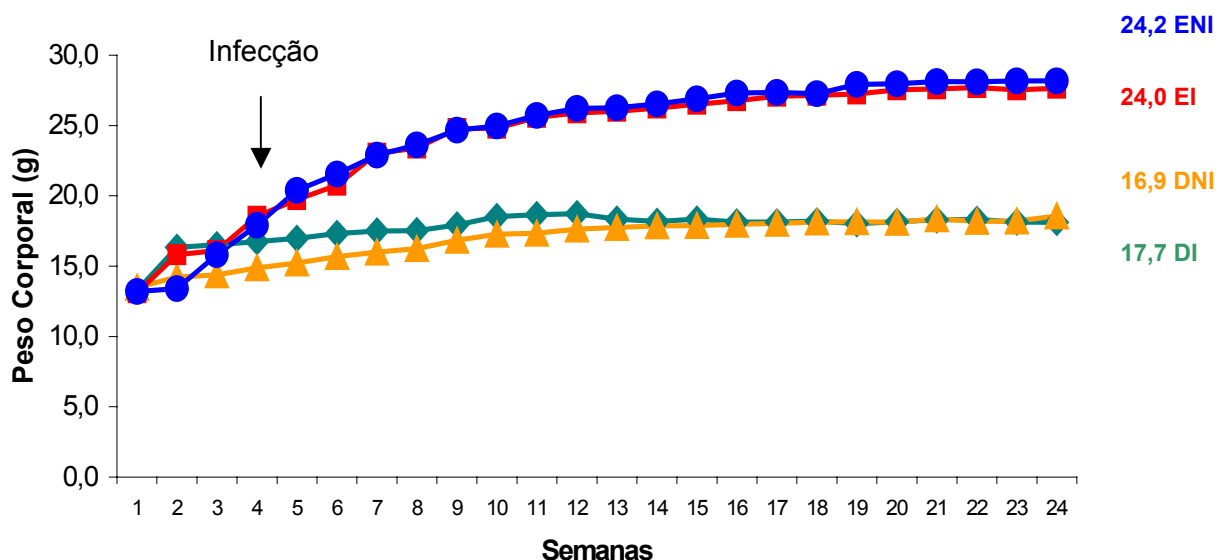


Figura 18 - Curvas ponderais de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com *S. mansoni* e seus respectivos controles não infectados (DNI e ENI).

Nota: Os valores numéricos apresentados se referem às médias de peso corporal de cada grupo, obtidas na 24ª semana de experimento; a seta representa o ponto de tempo no qual a infecção dos grupos DI e EI foi realizada.

A mortalidade espontânea dos animais foi acompanhada durante todo o experimento. O percentual de mortalidade diferiu significativamente entre os 4 grupos estudados ($p < 0,001$). Os valores mais elevados foram encontrados entre os grupos infectados, com maior percentual para o grupo desnutrido (37,6 %). Entre os grupos controles, o percentual mais baixo foi verificado no grupo ENI (5,5 %).

6.6 Estudo parasitológico

6.6.1 Número de parasitos coletados após perfusão do sistema venoso portal

A quantidade média de parasitos coletados em cada grupo, após perfusão do sistema venoso portal (Figura 19), mostra que camundongos desnutridos desenvolveram cargas parasitárias significativamente menores que camundongos eutróficos ($p < 0,0001$).

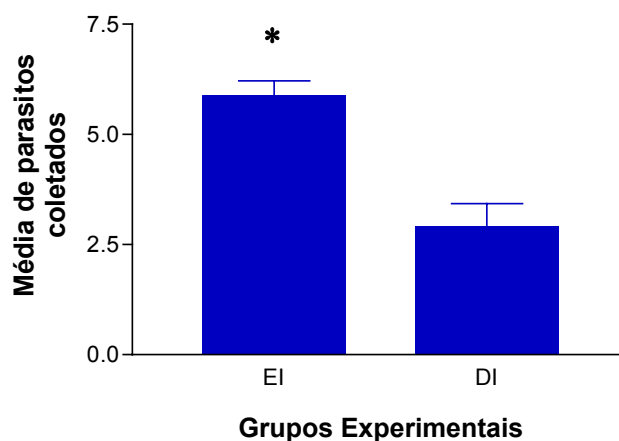


Figura 19 - Número de parasitos coletados por perfusão do sistema venoso portal em camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com *S. mansoni*.
Nota: * $p < 0,05$.

6.6.2 Número de ovos encontrados no fígado total

O número médio de ovos de *S. mansoni* encontrados no fígado total dos camundongos não revelou diferença significativa ($p = 0,75$) entre os grupos EI e DI (Figura 20).

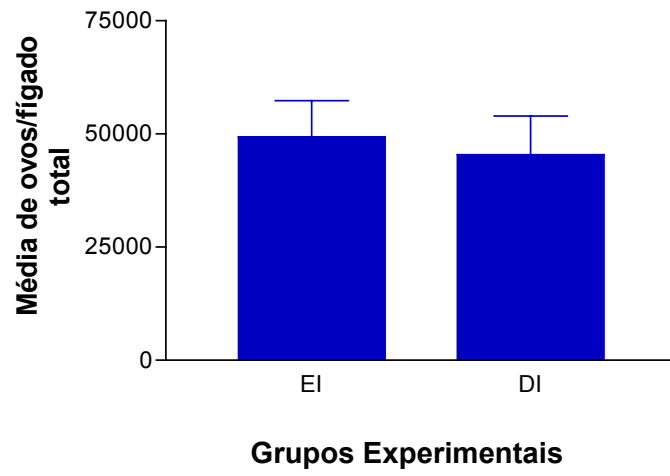


Figura 20 - Número de ovos encontrados no fígado de camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com *S. mansoni*.

7 DISCUSSÃO

A elucidação dos mecanismos responsáveis pela patofisiologia e patogênese das lesões hepáticas da esquistossomose mansônica requer o desenvolvimento de um modelo experimental que mimetize características patofisiológicas da doença humana. Nesse contexto, animais de laboratório, particularmente camundongos, têm sido bastante utilizados na infecção experimental por *S. mansoni*, contribuindo para esclarecer aspectos imunopatológicos da parasitose, particularmente aqueles associados à formação de granulomas e subsequente fibrogênese hepática (ABATH et al., 2006). No entanto, são escassas, na literatura, referências sobre o perfil imunológico e patológico de camundongos desnutridos infectados, considerando que o estado nutricional do hospedeiro é tido como um dos prováveis fatores coadjuvantes no agravamento dessa infecção parasitária.

Camundongos “outbred” *Swiss webster* desnutridos apresentam granulomas periovulares menores, inflamação portal menos intensa e menor produção de tecido fibroso, quando comparados com animais eutróficos da mesma linhagem. Além disso, os camundongos desnutridos são incapazes de desenvolver o quadro da fibrose hepática periportal semelhante à humana (COUTINHO, 2004). A literatura também descreve os efeitos que a má nutrição do hospedeiro exerce sobre a biologia do *Schistosoma*, alterando seu desenvolvimento corporal e reduzindo a carga parasitária (MAGALHÃES et al., 1986). Estudos realizados por Oliveira et al. (2003) demonstraram que as características fenotípicas de vermes adultos recuperados de camundongos desnutridos são diferentes daquelas observadas em parasitos recolhidos de camundongos eutróficos (atrofia dos vermes machos, alterações morfométricas no sistema reprodutivo das fêmeas e oviposição prejudicada). Diante disso, os resultados do presente estudo foram discutidos de maneira organizada nas seções abaixo.

7.1 Avaliação da cinética de produção das citocinas

O papel da resposta imune na formação dos granulomas esquistossomóticos periovulares tem sido bastante estudado em camundongos infectados eutróficos. Todavia, faltam na literatura, nessa área de estudo, informações sobre camundongos infectados desnutridos. O presente trabalho avaliou a resposta imune celular quanto à produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-13 em três diferentes tempos da infecção (60, 90 e 150 dias) em camundongos isogênicos da linhagem C57BL/6, submetidos à desnutrição protéico-calórica, comparando-os com seus respectivos controles eutróficos.

Por questões operacionais que dificultavam a realização do estudo imunológico nos mesmos animais utilizados para as demais avaliações, foi usado um grupo distinto de camundongos da mesma linhagem (C57BL/6), submetido às mesmas condições de experimentação. A escolha das citocinas estudadas deve-se ao fato de que IL-4 e IFN- γ são consideradas fatores de diferenciação da resposta de células Th (NELMS et al., 1999), importantes na caracterização do perfil de resposta desenvolvida pelos camundongos, em cada tempo de infecção; e ainda, por ser a IL-13 considerada como uma importante citocina efetora na patogênese da fibrose hepática esquistossomótica (WYNN, 2003).

Durante a infecção esquistossomótica no modelo murino eutrófico, é observada uma dicotomia Th1/Th2 (MOSMANN; SAD, 1996). Na fase inicial da doença ocorrem altos níveis de IFN- γ , que caracterizam o perfil de resposta Th1. Com a produção de ovos pelos vermes adultos, uma forte resposta Th2 passa a ser observada, representada por níveis elevados de IL-4 e IL-13 (STADECKER et al., 2004; PEARCE et al., 1991). As funções efetoras de cada resposta são distintas, inclusive no que se refere ao desenvolvimento da fibrose hepática, sendo a IL-13 considerada um mediador primário da fibrogênese, enquanto o IFN- γ apresenta uma marcada atividade anti-fibrogênica (CHIARAMONTE et al., 2001; HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000; PEARCE; MACDONALD, 2002). No entanto, a contribuição da IL-4 para o desenvolvimento de fibrose na esquistossomose 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 é incapaz de repor a atividade fibrogênica da IL-13 durante a infecção esquistossomótica.

A avaliação da imunidade celular, no presente estudo, mostrou que na fase aguda (60 dias pós-infecção), os camundongos desnutridos apresentaram resposta indicativa de perfil Th1, com intensa produção de IFN- γ e baixa produção de IL-13, enquanto que os eutróficos apresentaram resposta indicativa de perfil Th2, representada por níveis mais elevados de IL-13. Vale salientar que nos dois grupos de animais estudados não foi detectada produção de IL-4. Uma explicação para isso seria que os níveis dessa citocina poderiam estar abaixo do limite de detecção da técnica empregada, ou ainda pelo fato de que essa citocina seria rapidamente utilizada após sua produção. Os resultados do grupo eutrófico corroboram as informações disponíveis na literatura, uma vez que nesse tempo de infecção, já havendo oviposição, os antígenos dos ovos estimulam o desenvolvimento de uma resposta Th2, enquanto que o grupo desnutrido apresenta um retardamento no desenvolvimento dessa resposta. Esse retardamento é, provavelmente, ocasionado pelo atraso na deposição dos ovos pelos parasitos, atraso este induzido pela desnutrição (COUTO et al., 2002; FERREIRA et al., 1993, 1998; TSHIKUKA et al., 1997).

Apesar de não ter sido detectada a citocina IL-4 aos 60 dias de infecção, a síntese de IL-13 em ambos os grupos DI e EI representa um indício de que houve produção inicial de IL-4, uma vez que essa citocina é responsável por desencadear a resposta Th2 (NELMS et al., 1999).

É importante salientar que a IL-13 atua como uma citocina efetora crítica da resposta Th2. Mesmo que sua produção seja marcadamente reduzida na ausência de IL-4, a IL-13 residual é suficiente para mediar muitas de suas funções efetoras in vivo (WYNN, 2003). Na esquistossomose murina a produção de IL-13 diminui mais de 80% na ausência de IL-4 (CHIARAMONTE et al., 1999), no entanto a formação de granulomas ocorre normalmente, a menos que a IL-13 também seja neutralizada (WYNN, 2003), demonstrando, assim, sua importância no desenvolvimento da patologia na esquistossomose.

Aos 90 dias de infecção, período de transição entre fase aguda e crônica (fase intermediária), ambos os grupos desenvolveram resposta Th2, porém nos desnutridos essa resposta se apresentou mais forte do que nos eutróficos. Nesses últimos, o componente Th2 começou a diminuir em relação ao período de 60 dias.

Apesar de terem sido detectados níveis de IL-4 nesse período (90 dias), os níveis de IL-13 começaram a diminuir e não foi detectada produção de IFN- γ . Nos desnutridos, o componente Th2 aumentou aos 90 dias, tanto pela produção de IL-4, que passou a ser detectada, como pela elevação dos níveis de IL-13 em relação ao período de 60 dias. Como nos camundongos eutróficos, também não foi detectada produção de IFN- γ no grupo desnutrido, nesse tempo da infecção.

Aos 150 dias pós-infecção, período correspondente à consolidação da fase crônica, ambos os grupos continuaram apresentando resposta Th2. No grupo desnutrido, a produção tanto de IL-4 como de IL-13 se revelou bastante reduzida em relação ao período de 90 dias. No grupo eutrófico, porém, os níveis de ambas as citocinas não sofreram alterações significativas, permanecendo constantes ao se comparar com o tempo de 90 dias. Produção de IFN- γ não foi detectada em nenhum dos dois grupos.

De modo semelhante aos resultados obtidos nos grupos DI e EI, Chiaramonte et al. (2001) observaram que em camundongos C57BL/6 eutróficos os maiores níveis de expressão de IL-4 e IL-13, eram alcançados entre 9 e 12 semanas após a infecção. Além disso, Silva et al. (2004) demonstraram que camundongos da linhagem BALB/c, eutróficos, cronicamente infectados (150 dias), que desenvolveram fibrose periportal ou apenas granulomas isolados, tiveram a resposta Th1 suprimida, apresentando níveis elevados de IL-4 e IL-5, caracterizando o perfil de resposta Th2. Esses achados corroboram as observações relacionadas tanto com animais desnutridos como eutróficos, os quais apresentaram perfil Th2 na fase crônica da infecção.

A cinética de produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-13 nos camundongos desnutridos não acompanhou a cinética de produção dessas mesmas citocinas nos animais eutróficos, os quais apresentaram desenvolvimento de resposta imune similar ao que se acha descrito na literatura (PEARCE; MACDONALD, 2002).

No presente estudo, a carência protéica parece não ter exercido influência direta sobre os níveis de produção dessas citocinas, uma vez que os animais desnutridos, em determinados tempos de infecção, produziram níveis mais elevados de citocinas que os eutróficos. Essas observações foram de encontro às nossas expectativas, representando um questionamento que, até o presente momento, não somos capazes de explicar.

A produção de IL-13 no grupo DI, que se mostrava relativamente baixa no período de 60 dias quando comparada ao grupo EI, apresentou níveis significativamente mais elevados que o grupo EI no período de 90 dias. No entanto, a produção dessa citocina no grupo desnutrido sofreu modulação durante a fase crônica, chegando a níveis significativamente mais baixos que o grupo eutrófico. Nesse último, a produção de IL-13 apresentou-se sem grandes oscilações, principalmente entre as fases intermediária e crônica da infecção, nas quais os níveis dessa citocina permaneceram praticamente constantes.

Diante dessas observações é possível especular que as oscilações dos níveis de produção de IL-13, observados nos animais desnutridos, poderiam alterar sua atividade fibrogênica, no processo de formação e deposição da matriz extracelular, dificultando, dessa maneira, o desenvolvimento do quadro de fibrose periportal no modelo murino desnutrido, como observado por Coutinho et al. (1997).

7.2 Avaliação morfológica

7.2.1 Aspectos macroscópicos

A relação percentual mais elevada entre o peso corporal dos animais e o peso dos órgãos (fígado e baço), observada nos camundongos infectados, tanto desnutridos quanto eutróficos, nos animais sem infecção, mostrou que os grupos infectados desenvolveram um quadro de organomegalia característico dos estágios avançados da esquistossomose mansônica. A hepatomegalia, apesar de ter sido observada em ambos os grupos infectados, apresentou-se de forma mais acentuada nos animais eutróficos, demonstrando que o estado nutricional do hospedeiro é fator importante nessa patologia, considerando que os animais alimentados com dieta balanceada possuem uma maior reserva de proteínas no fígado do que aqueles alimentados com dieta hipoprotéica (COUTINHO et al., 2003). O mesmo não ocorreu com a esplenomegalia, que não mostrou diferença entre desnutridos e eutróficos infectados. A hipertrofia do baço é diretamente influenciada pelo fator infecção, que propicia estimulação antigênica levando a uma hiperplasia das células do sistema

fagocítico mononuclear do baço (MAGALHÃES FILHO; COUTINHO, 1960) e pelas alterações hemodinâmicas resultantes da hipertensão portal. Nesse caso, o estado nutricional exerce, apenas, uma influência secundária (COUTINHO et al., 2003, 2007; COUTINHO, 2004).

7.2.2 Aspectos histopatológicos

Estudos desenvolvidos no modelo murino sobre a patologia hepática esquistossomótica mostraram que a má nutrição do hospedeiro afeta a proliferação de fibroblastos, produção de colágeno e albumina, acarretando modificação dos tecidos conectivos (COUTINHO, 2004).

Os achados histopatológicos dos grupos estudados revelaram que, aos 60 dias após a infecção (fase aguda), os animais dos grupos DI e EI apresentaram intensa resposta inflamatória nos espaços porta, com grande infiltração de polimorfonucleares, especialmente eosinófilos, bem como alguns focos de necrose coagulativa aguda. A principal diferença observada entre os grupos, nesse tempo de infecção, baseia-se, na quantidade e dimensões das lesões granulomatosas, sendo o grupo DI aquele que apresentou menor número de granulomas. Nesse grupo, as lesões eram de menor tamanho, quando comparadas às do grupo EI. A composição celular dos granulomas de ambos os grupos era basicamente de eosinófilos, com presença de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, em menor quantidade. No grupo EI, além de granulomas maiores, já podia ser observada uma pequena deposição de colágeno, confirmando que a nutrição adequada do hospedeiro favorece a resposta inflamatória, contribuindo para o aumento da colagenização (COUTINHO, 2004).

Em virtude de a resposta granulomatosa ser comandada por citocinas Th2, fenotipicamente os granulomas apresentam uma grande e distinta população de eosinófilos (ABATH et al., 2006), tendo IL-4, IL-5 e IL-13 papéis importantes no desenvolvimento, diferenciação e recrutamento dessas células para os sítios de inflamação (CHIARAMONTE et al., 1999a; 1999b; JABARA et al., 1988; HAMAGUCHI et al., 1987). Além disso, IL-5 e IL-4 aumentam o tempo de vida dos eosinófilos *in vitro*, sugerindo que a sobrevivência prolongada dessas células, observada nos granulomas periovulares, esteja relacionada à produção dessas

citocinas, como descrito por Rumbley et al. (1999). Grande concentração do componente eosinofílico foi encontrada nos granulomas dos animais desnutridos e eutróficos, porém em maior quantidade nestes últimos.

Os eosinófilos, além de serem capazes de destruir parasitos do *S. mansoni* na presença de anticorpos específicos, pelo mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), também são incriminados na destruição dos ovos depositados pelos vermes (JAMES; COLLEY, 1976), indicando funções dirigidas a diferentes estágios do ciclo do parasito (CAPRON; CAPRON, 1992). Semelhante ao que foi visto no presente estudo, Rumbley et al. (1999) afirmam que os eosinófilos constituem aproximadamente 90% das células dos granulomas de fase aguda em camundongos C57BL/6. Chiaramonte et al. (2001), avaliando a resposta granulomatosa de diferentes cepas de camundongos esquistossomóticos, observaram que os eosinófilos representavam a população celular dominante (60%), enquanto linfócitos, macrófagos, mastócitos, neutrófilos e outras células inflamatórias correspondem a 40% da composição celular.

Na fase intermediária (90 dias após a infecção), os camundongos desnutridos mostraram maior número de granulomas, em relação ao período de 60 dias. Nesses granulomas, a infiltração eosinofílica apresentou-se menos intensa do que na fase aguda, podendo ser observada uma população distinta de macrófagos. Como os macrófagos ativados também são responsáveis pela produção de colágeno nesse modelo experimental (HESSE et al., 2001), o número aumentado dessas células poderia explicar a moderada colagenização dos granulomas desse grupo, observada nesse ponto de tempo.

Os animais eutróficos, aos 90 dias após a infecção, mostraram granulomas em fase produtiva, ainda apresentando certo grau de eosinofilia, bem como persistência do processo inflamatório dos espaços porta. Em 3 animais do grupo DI e 4 do EI houve aumento moderado do tecido conjuntivo portal, ocasionado pelo processo inflamatório acentuado.

Na fase crônica da infecção (150 dias), os camundongos desnutridos apresentaram numerosos granulomas periovulares isolados. Apesar de esses granulomas terem sido visualizados, muitas vezes, formando extensos conglomerados, não se observava deposição de colágeno intensa no interior das lesões, ou mesmo nos espaços-porta. Também não houve desenvolvimento de

fibrose periportal nesses animais, confirmando, assim, os achados de Coutinho et al. (1997, 2003, 2007).

No grupo eutrófico, os granulomas apresentavam-se em maior número e tamanho que no grupo desnutrido, tendo, em sua maioria, predominância do componente colágeno. Da mesma forma como foi visto nos camundongos desnutridos, esses granulomas mostravam-se ora dispersos, ora agrupados. Quarenta por cento dos animais desse grupo desenvolveram o padrão da fibrose hepática periportal murina, corroborando os achados de Andrade e Warren (1964), Andrade (1987) e Andrade e Cheever (1993) que observaram o desenvolvimento dessa lesão em 30 a 50% dos animais eutróficos estudados. Os 60% restantes apresentaram características do padrão histológico de granulomas isolados (HENDERSON et al., 1993).

Embora todos os camundongos tenham sido expostos ao mesmo número de cercárias, o número de vermes recuperados diferiu discretamente entre os animais. Essa pequena diferença na carga parasitária pode ter influenciado, de alguma forma, o desenvolvimento dos padrões histopatológicos observados, tal como foi descrito por Silva et al. (2004).

Com base nas características da resposta inflamatória, na quantidade de lesões granulomatosas e desenvolvimento da fibrose hepática, os camundongos avaliados histologicamente apresentaram infecção ora de caráter moderado, ora intenso. Essas observações diferem do que foi descrito em trabalhos anteriores, utilizando a mesma cepa de camundongo (C57BL/6), nos quais a infecção apresentava intensidade leve (CHEEVER et al., 1987; CHIARAMONTE et al., 2001). Uma provável explicação para a falta de concordância entre os resultados poderia ser a utilização de cepa parasitária diferente no presente estudo.

7.3 Avaliação morfométrica e bioquímica

Os dados referentes à mensuração do colágeno hepático, realizada através de análise morfométrica e bioquímica, mostraram equivalência de resultados entre ambas as técnicas, sendo a primeira considerada mais sensível (BARBOSA Jr, 2001). Ambos os grupos (desnutridos e eutróficos) revelaram quantidades

semelhantes de tecido fibroso, não havendo diferença estatística entre os mesmos. Esse resultado difere dos achados de Coutinho et al., (2003, 2007) onde foi observado que os animais eutróficos apresentaram valores mais elevados para a quantidade de tecido colágeno, em relação aos desnutridos. Todavia, deve ser levado em consideração que, nos trabalhos acima citados foram utilizadas diferentes cepas, tanto de camundongo quanto de parasito (camundongos albinos Swiss “outbred”, e parasitos da cepa BH – Belo Horizonte, respectivamente). Os demais parâmetros morfométricos analisados aos 150 dias de infecção (volume, densidade volumétrica e numérica dos granulomas) também não diferiram estatisticamente entre animais desnutridos e eutróficos. Provavelmente, o tamanho da amostra, considerado pequeno para análise estatística, pode ter contribuído para a semelhança entre os resultados.

7.4 Avaliação do estado nutricional

No presente estudo, o estado nutricional dos animais, avaliado através de curvas ponderais mostrou que, em todo o período observado, os animais alimentados com dieta hipoprotéica apresentaram pesos corporais inferiores aos camundongos que receberam dieta balanceada. Além do prejuízo no ganho de peso, a desnutrição pôde ser comprovada através dos aspectos clínicos apresentados por esses animais, como dificuldade de locomoção e eriçamento dos pêlos. A infecção pelo *S. mansoni* parece não ter influenciado de modo marcante o estado nutricional de ambos os grupos, uma vez que os animais infectados apresentaram, quanto à curva ponderal, comportamento semelhante aos seus respectivos controles não infectados. Esses achados corroboram as observações realizadas por Coutinho et al. (2003, 2007), em estudos anteriores. A sobreposição de desnutrição e infecção, como já era esperado, afetou negativamente a sobrevivência dos animais do grupo DI, que apresentaram maior percentual de mortalidade espontânea, comparados com os demais grupos, sobretudo quando atingiram a fase crônica da infecção.

7.5 Avaliação da carga parasitária

Os resultados referentes à avaliação da carga parasitária dos animais, mostraram que o número de parasitos recuperados foi maior para o grupo eutrófico, quando comparado ao desnutrido.

A diferença entre o número de vermes recuperados do grupo EI, em comparação com o grupo DI, dá suporte à hipótese defendida por vários autores, de que o estado nutricional do hospedeiro exerce influência sobre a biologia do parasito (FERREIRA; COUTINHO, 1999), podendo induzir alterações nos vermes adultos de ambos os gêneros (NEVES et al., 2001, 2002). Essas alterações são, provavelmente, decorrentes da indisponibilidade de nutrientes essenciais requeridos para um adequado crescimento e desenvolvimento dos mesmos no interior dos vasos sangüíneos, ocasionada pela carência nutricional do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2003).

Em relação ao número de ovos encontrados no fígado total dos animais dos grupos EI e DI, foi observada uma discreta redução na quantidade absoluta de ovos do grupo desnutrido. Embora essa diferença entre os grupos não tenha sido significativa, a redução na fecundidade dos vermes, descrita em hospedeiros desnutridos, poderia explicar o menor número de ovos encontrados no fígado total desses animais (COUTINHO et al., 1997, 2003, 2007).

8 CONCLUSÕES

- Camundongos desnutridos, infectados pelo *S. mansoni*, apresentaram níveis de citocinas que sugerem alterações na cinética de produção dos perfis Th1/Th2.
- Oscilações nos níveis da citocina IL-13 observadas no grupo desnutrido poderiam contribuir para a falta de desenvolvimento da fibrose hepática periportal nesses animais.
- Apesar do estudo da histopatologia hepática, na fase aguda da infecção (60 dias) não ter apresentado diferenças entre camundongos desnutridos e eutróficos, quanto à composição celular dos granulomas, no grupo EI houve leve deposição de colágeno, confirmando o efeito positivo do estado nutricional adequado sobre a colagenização desses granulomas.
- Histologicamente, os camundongos da cepa C57BL/6 desenvolveram lesões hepáticas moderadas ou intensas, ao contrário do que se acha registrado na literatura. Na presente investigação, o uso de cepa parasitária diferente pode explicar a maior susceptibilidade do hospedeiro definitivo, em relação à infecção pelo *S. mansoni*.
- A carga parasitária de camundongos desnutridos e eutróficos apenas diferiu significativamente no que diz respeito ao número de parasitos, maior no grupo dos eutróficos, sendo equivalente a quantidade de ovos existente no fígado total dos animais, determinada no momento do sacrifício (150 dias). Esse achado reforça a hipótese de que o estado nutricional do hospedeiro exerce influência sobre o desenvolvimento dos parasitos.
- A infecção esquistossomótica aparentemente não influenciou na curva ponderal dos camundongos, a diferença detectada entre animais desnutridos e eutróficos guardando relação com o tipo de dieta consumida pelos mesmos.

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.
- 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, p. 325-334, 1987.
- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, DF, v. 38, n. 6, p. 514-520, 2005.
- ANDRADE, Z. A.; CHEEVER, A. W. The characterization of the murine model of schistosomal periportal fibrosis ("pipestem" fibrosis). International Journal of Experimental Medicine, Basel, v. 74, p. 195-202, 1993.
- ANDRADE, Z. A.; SILVA, L. M.; SOUZA, M. M. Anexperimental approach to the pathogenesis of "pipestem" fibrosis (Symmers fibrosis of the liver). Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 699-706, 1997.
- 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.
- BARBOSA Jr., A. A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. Jornal Brasileiro de Patologia, Rio de Janeiro, v. 37, p. 197-200, 2001.
- BARBOSA, C. S. et al. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 17, p. 725-728. 2001.
- BATALLER, R.; BRENNER, D. A. Liver fibrosis. The Journal of Clinical Investigation, New Haven, v. 115, n. 2, p. 209-218, 2005.
- BEDOSSA, P.; PARADIS, V. Liver extracellular matrix in health and disease. The Journal of Pathology, Londres, v. 200, p. 504-515, 2003.
- BELKAID, Y.; ROUSE, B. T. Natural regulatory T cells in infectious disease. Nature immunology, Nova York, v. 6, p. 353-360, 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.
- BINA, J. C.; PRATA, A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I – Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, DF, v. 36, n. 2, p. 211-2116, 2003.

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.; LUKACS, N. W. The role of egg antigens, cytokines in granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 87, supl. 4, p. 75-9, 1992.

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

BOROS, D. L.; WHITFIELD, J. R. Endogenous IL-10 relates IFN- γ and IL-5 cytokine production and the granulomatous response in schistosomiasis mansoni- infected mice. Immunology, Oxford, v. 94, p. 481-487, 1998.

BOROS, D. L.; WHITFIELD, J. R. Enhanced Th1 and dampened Th2 responses synergize to inhibit acute granulomatous and fibrotic responses in murine schistosomiasis mansoni. Infection and immunity, Washington, v. 67, p. 1187-1193, 1999.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry, Orlando, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Esquistossomose. Brasília, DF, 2006.

BRUNET, L. R. et al. IL-4 protects against TNF- α -mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. Journal of Immunology, Baltimore, v.159, p. 777, 1997.

BRUNETTO, M. A. et al. Imunonutrição: o papel da dieta no restabelecimento das defesas naturais. Acta Scientiae Veterinariae, Porto Alegre, v. 35, supl. 2, p. s203-s232, 2007.

CAPRON, M.; CAPRON, A. Effector functions of eosinophils in schistosomiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 87, supl. 4, p. 167-170, 1992.

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.

CHANDRA, R. K. Protein energy malnutrition and immunological responses. The Journal of Nutrition. Philadelphia, v. 122, p. 597-600, 1992.

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

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. Hepatic fibrosis in rabbits infected with Japanese and Philippine strains of *Schistosoma japonicum*. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 29, n. 6, p. 1327-1339, 1980.

CHEEVER, A. W. et al. Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansoni* - infected mice while selectively inhibiting T cell IL-5 production. Journal of Immunology, Baltimore, v. 148, p. 3244-3248, 1992.

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.

CHEEVER, A. W.; YAP, G. S. Immunologic basis of disease and disease regulation in schistosomiasis. Chemical Immunology, Basel, v. 66, p. 159, 1997.

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.

CHENSUE, S. W. et al. Cross-regulatory role of interferon-gamma (IFN- γ), IL-4 e IL-10 in schistosome egg granuloma formation: *in vivo* regulation of Th activity and inflammation. Clinical and Experimental Immunology, Londres, v. 98, p. 395-400, 1994.

CHENSUE, S. W. et al. Role of IL-4 and IFN-gamma in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function. Journal of Immunology, Baltimore, v. 148, p. 900, 1992.

CHIARAMONTE, M. G. et al. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type-2-dominated inflammatory response. Journal of Clinical Investigation, Nova York, v. 104, n. 6, p. 777-785, 1999a.

CHIARAMONTE, M. G. et al. IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. Journal of Immunology, Baltimore, v. 162, p. 920-930, 1999b.

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.

CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. Acta Tropica, Basel, v. 77, p. 41-51, 2000.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomes in Brazilian endemic areas. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99 (supl.1), p.13-19, 2004.

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. Inquérito clínico-nutricional e antropométrico preliminar, em áreas endêmicas de esquistossomose mansônica, no Nordeste do Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 6, n. 4, p. 211-236, 1972.

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

COUTINHO, E. M. et al. Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. Acta Tropica, Basel, v. 101, n. 1, p. 15–24, 2007.

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

COUTINHO, E. M. Patobiologia da desnutrição nas doenças parasitárias. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 75, p. 63-76, 1980.

COUTINHO, E. M.; FREITAS, L. P. C. G.; ABATH, F. G. C. The influence of the regional basic diet from Northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 25, n. 1, p. 13–20, 1992.

COUTO, J. L. A. et al. Structural changes in the jejunal mucosa of mice infected with *Schistosoma mansoni*, fed low or high protein diets. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília v. 35, p. 601-607, 2002.

CZAJA, M. J. et al. Gamma-interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. Hepatology, Baltimore, v. 10, p. 795-800, 1989.

CZAJA, M. J. et al. g-Interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. Hepatology, Baltimore, v.10, p. 795, 1993.

DOMINGUES, A. L. C.; BARRETO, V. S. T. Esquistossomose hepática. In: Matos, A. A; Dantas, W. Conferência de Hepatologia, São Paulo: Fundo Editorial Byk, 2001, p. 391-405.

DOMINGUES, A. L. C.; DOMINGUES, L. A. W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA, J. (Ed). Esquistossomose mansônica. Recife: Ed. Universitária da UFPE, 1994. cap. 5, p. 91-105.

- DUVALL, R. H.; DE WITT, W. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 16, p. 483-486, 1967.
- ENGELS, D. et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. Acta Tropica, Basel, v. 82, p. 139-146, 2002.
- FALLON, P. G. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. Journal of Immunology, Baltimore, v. 164, p. 2585–2591, 2000b.
- FALLON, P. G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. Immunology Today, Cambridge, v. 21, n. 1, p. 29-35, 2000a.
- FAVRE, T. C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. . Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 34, n. 6, p. 569-576, 2001.
- FERREIRA, H. S. et al. A long-term intake of a protein hydrolysate seems to increase the risk of encephalopathy in mice infected with *Schistosoma mansoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 93, p.199-203, 1998.
- FERREIRA, H. S. et al. Intestinal protein absorption in malnourished mice acute *Schistosoma mansoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 88, p. 581-587, 1993.
- FERREIRA, H. S.; COUTINHO, E. M. Should nutrition be considered as a supplementary measure in schistosomiasis control? Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 93, p. 437-447, 1999.
- FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. Revista de Patologia Tropical, Goiania, v.36, n. 1, p. 67-74, 2007.
- FERTIN, C. J. F. et al. Interleukin-4 stimulates collagen synthesis by normal and scleroderma fibroblasts in dermal equivalents. Cellular and Molecular Biology, Elmsford, v. 37, p. 823, 1991.
- FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. Nature immunology, Nova York, v. 4, p. 330–336, 2003.
- FRIEDMAN, S. L. Liver fibrosis – from bench to bedside. Journal of Hepatology, Amsterdam, v. 38, supl. 1, p. S38-S53. 2003.
- GABELE, E.; BRENNER, D. A.; RIPPE, R. A. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. Frontiers in Bioscience, Tampa FL, v. 8, p. D69-D77, 2003.

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 of Immunology, Baltimore, v. 130, p. 2891-2895, 1983.

GIRI, S. N.; HYDE, D. M.; MARAFINO, B. J. Ameliorating effect of murine interferon gamma on bleomycin-induced lung collagen fibrosis in mice. Biochemical Medicine and Metabolic Biology, Nova York, v. 36, p. 194-197, 1986.

HAMAGUCHI, Y. et al. Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. Journal of Experimental Medicine, Nova York, v. 165, p. 268-273, 1987.

HENDERSON, G. S. et al. Two distinct pathological syndromes in male CBA/j inbred mice with chronic *Schistosoma mansoni* infections. American Journal of Pathology, Nova York, v. 142, p. 703-714, 1993.

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. 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, Nova York, v. 157, p. 945-955, 2000.

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, K. F.; WYNN, T. A.; DUNNE, D. W. Cytokine-mediated host responses during schistosome infection; walking the fine line between immunological control and immunopathology. Advances in parasitology, Londres, v. 52, p. 265-307, 2002.

JABARA, H. H. et al. Induction of interleukin-4-dependent IgE synthesis and interleukin-5-dependent eosinophil differentiation by supernatants of a human helper T-cell clone. Journal of Clinical Immunology, Nova York, v. 8, p. 437-446, 1988.

JAMES, S. L.; COLLEY, D. G. Eosinophil mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. J. Reticuloendothel. Soc. [S. I.], v. 20, p. 359-374, 1976.

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.

JANKOVIC, D.; SHER, A. Initiation and regulation of CD4+ T- cell function in host-parasite models. Chemical Immunology, Basel, v. 63, p. 51-65, 1996.

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

KATZ, A; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38-41, 2003.

KATZ, N. Dificuldade no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, DF, v. 32, p. 705-711, 1999.

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

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, Londres, v. 227, p. 685-689, 1970.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. Acta Tropica, Basel, v. 77, p. 101-109. 2000.

LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; VOIETA, I. Esquistossomose mansônica. In: COURA, J. R. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. v. 1, cap 76, p. 931-946.

LUKACS, N. W.; BOROS, D. L. Utilization of fractionated soluble egg antigens reveals selectively modulated granulomatous and lymphokine responses during murine schistosomiasis mansoni. Infection and Immunity, Washington, v. 60, p. 3209-3216, 1992.

MAGALHÃES FILHO, A.; COUTINHO, E. M. Lesões esplênicas iniciais na Esquistossomose mansônica humana. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 2, p. 251-259, 1960.

MAGALHÃES, L. A. et al. Schistosomiasis mansoni in experimentally malnourished mice. Revista de Saúde Pública de São Paulo, São Paulo, v. 20, p. 362-368, 1986.

MEIRA, D. A. Interactions of infection, nutrition, and immunity. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 28, n. 4, p. 315-9, 1995.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: NEVES, D. P., Parasitologia Humana, 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005, cap. 22, p. 193-212.

MODOLELL, M. et al. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. European Journal of Immunology, Weinheim, v. 25, p. 1101-1104, 1995.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunology Today, Cambridge, v. 17, p. 138-146, 1996.

MWATHA, J. K. et al. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-g, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. Journal of Immunology, Baltimore, v. 160, p. 1992, 1998.

NELMS, K. et al. The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 17, p. 701-738, 1999.

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, DF, v. 35, n. 4, p. 405-407, 2002.

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

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, Nova 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.

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

RUMBLEY, C. A. et al. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the *Schistosoma* granuloma. Journal of Immunology, Baltimore, v. 162, p. 1003-1009, 1999.

SADUN, E. H. et al. Schistosomiasis mansoni in the chimpanzee (The natural history of chronic infections after single and multiple exposures). American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 19, n. 2, p. 258-277, 1970.

SAKAGUCHI, S. et al. Foxp3CD25CD4 natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. Immunological reviews, Munksgaard, v. 212, p. 8-27, 2006.

SAKER, K. E. Diet and the immune system: selected overview of nutritional immunomodulation. In: _____. Proceedings of the 3rd Pet Food Industry (Chicago, U. S. A.). p. 44-59, 2004.

SCHNACK, F. J. et al. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (< 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 1205-1208, 2003.

SEMPOWSKI, G. D.; DERDAK, S.; PHIPPS, R. P. Interleukin-4 and interferon-g discordantly regulate collagen biosynthesis by functionally distinct lung fibroblast subsets. Journal of Cellular Physiology, Philadelphia, v. 167, p. 290, 1996.

SHER, A. et al. Production of IL-10 by CD4+ T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. Journal of Immunology, Baltimore, v. 147, p. 2713-2716, 1991.

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.

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

SYMMERS, W. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia hematobia*. Journal of Pathology and Bacteriology, Edinburgh, v. 9, p. 237-239, 1904.

TEODÓSIO, N. R. et al. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. Archives Latinoamericanas de Nutrición, Caracas, v. 40, p. 533-547, 1990.

TSHIKUKA, J. G. et al. Relationship of childhood protein-energy malnutrition and parasite infections in an urban African setting. Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 2, p. 374-382, 1997.

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

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.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. Immunology and Cell Biology, Adelaide, v. 85, p. 148–154, 2007.

WYNN, T. A. et al. Analysis of granuloma formation in double cytokine deficient mice reveals a central role for IL-10 in polarizing both Th1 and Th2-type cytokine responses *in vivo*. Journal of Immunology, Baltimore, v. 159, p. 5014-5023, 1997.

WYNN, T. A. IL-13 effector functions. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 21, p. 425-56, 2003.

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

Apêndice A – Artigo em preparação

Resposta imune celular e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com *Schistosoma mansoni*.

Silva, F. L.¹; Barros, A. F.¹; Costa, V. M. A.²; Araújo, R. E.¹; Ramos, R. P.¹; Oliveira, S. A.¹; Montenegro, S. M. L.¹; Coutinho, E. M.¹

¹ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ, Recife-PE

² Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Correspondência para: Eridan de Medeiros Coutinho, Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420, Recife, PE, Brasil. Fone: 81-2101-2525/2101-2581. email: eridan@cpqam.fiocruz.br

RESUMO

O estado nutricional do hospedeiro parece ser importante cofator no agravamento da esquistossomose mansônica. O presente trabalho avaliou as características da resposta imune celular em camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*, comparando-os com eutróficos infectados da mesma linhagem. A metodologia abordou produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-13 em sobrenadante de cultura de esplenócitos (fases aguda, intermediária e crônica da infecção), estado nutricional, carga parasitária, macroscopia do fígado e do baço, estudo histopatológico do fígado, morfometria dos granulomas hepáticos periovulares e mensuração bioquímica e morfométrica do colágeno hepático. Os animais desnutridos desenvolveram peso corporal inferior, comparados aos eutróficos. O estudo parasitológico revelou maior quantidade de parasitos no grupo eutrófico. Na relação percentual entre os pesos dos animais e dos órgãos (fígado e baço), os camundongos infectados apresentaram taxas superiores às dos animais

sem infecção, caracterizando organomegalia característica dos estágios avançados da doença. A histopatologia revelou maior quantidade e tamanho dos granulomas nos animais eutróficos e intensa resposta inflamatória nos espaços-porta, com abundante infiltração eosinofílica nas fases aguda e intermediária, em ambos os grupos. Na fase crônica, 40% dos eutróficos desenvolveram fibrose periportal, não sendo observada essa lesão nos desnutridos. A morfometria dos granulomas e a quantificação do tecido fibroso não revelaram diferenças entre os grupos. A imunidade celular dos animais eutróficos mostrou níveis mais elevados de IL-13 do que IFN- γ , na fase aguda, indicando perfil Th2. Essa resposta Th2 permanece nas fases intermediária e crônica da infecção, embora em níveis mais baixos. A cinética desses animais evoluiu conforme descrito na literatura. Todavia, a produção dessas citocinas nos desnutridos parece alterada em relação aos eutróficos. Na fase aguda esses animais produziram níveis mais elevados de IFN- γ do que IL-13, caracterizando perfil Th1. Na fase intermediária o componente Th1 diminuiu e foram observados altos níveis de IL-13 e IL-4 (perfil Th2), que diminuíram com a cronicidade da infecção. Pode-se especular que essa cinética diferente dificulte a atuação das citocinas fibrogênicas, sendo uma das razões pelas quais camundongos desnutridos não conseguem desenvolver fibrose periportal murina.

Palavras-chaves: Esquistossomose mansoni, Desnutrição, Imunidade celular, Lesões hepáticas.

INTRODUÇÃO

No Brasil, em virtude da grande diversidade geográfica, climática, econômica e social que se reflete na imensa variedade de parasitas encontrados no país (SCHNACK et al., 2003), a esquistossomose mansônica é uma das mais significativas endemias parasitárias (DOMINGUES; BARRETO, 2001), representando um grave problema sanitário, com estimativas de que existam cerca de seis milhões de pessoas infectadas no país, principalmente nos estados do Nordeste e em Minas Gerais (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Uma das conseqüências mais graves da esquistossomose mansônica crônica é o desenvolvimento de fibrose hepática periportal (fibrose de Symmers) que

compromete essencialmente os espaços-porta, sendo acompanhada de graus variáveis de obstrução vascular, com formação e dilatação de novos vasos no tecido fibroso (BOGLIOLO, 1957). A etiopatogênese das formas clínicas graves da doença ainda não é completamente entendida (COUTINHO, 2004), sendo necessário, para isso, o estudo de animais de laboratório, utilizados como modelos experimentais, que reproduzam aspectos da doença humana.

O quadro histológico da fibrose periportal foi reproduzido por Warren (1966) em camundongos albinos *Swiss* eutróficos, infectado com *S. mansoni*. Anos mais tarde, Andrade e Warren (1964), Andrade (1987) e Andrade e Cheever (1993) também observaram o desenvolvimento dessa lesão em 30 a 50% dos animais da mesma linhagem, quando submetidos a infecções leves (1 a 2 pares de vermes) e prolongadas (16 ou mais semanas). Entretanto, Coutinho et al. (1997; 2003) não conseguiram reproduzir esse quadro histológico em camundongos desnutridos da mesma linhagem, submetidos às mesmas condições de experimentação. Esses achados sugerem que tempo e carga parasitária, fatores causais comprovadamente importantes, não são os únicos que atuam no desenvolvimento da fibrose hepática esquistossomótica.

Estudos da resposta imune têm sido bastante utilizados na tentativa de explicar o desenvolvimento das lesões hepáticas em animais eutróficos, porém pouco se conhece a respeito da resposta imunológica dos camundongos desnutridos. Oliveira et al. (2004) avaliaram a resposta imune humoral e celular em camundongos esquistossomóticos desnutridos não isogênicos, na fase crônica da infecção. Os animais com deficiência protéica apresentaram baixos títulos séricos de IgG1, IgG2b e IgG3 em relação a camundongos eutróficos infectados. Contudo, não houve diferença quanto à produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-5 nos dois grupos de animais estudados.

O presente estudo avalia as características da resposta imune celular e lesões hepáticas em camundongos isogênicos apresentando deficiência protéica, em três fases da infecção esquistossomótica.

METODOLOGIA

Animais: Camundongos machos, recém-desmamados (21 dias), isogênicos (C57BL/6), pesando entre 11 e 15 g, provenientes do CECAL (Centro de Criação de Animais de Laboratório – FIOCRUZ/ Rio de Janeiro), foram mantidos em gaiolas individuais, sob condições padronizadas de temperatura (22 a 23°C) e luminosidade ciclos de 12 h de claro e 12 h de escuro). A utilização desses animais no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ).

Dietas: A desnutrição foi induzida pela administração da Dieta Básica Regional (DBR), que se caracteriza por ser uma dieta multideficiente, essencialmente hipoprotéica contendo aproximadamente 7,87% de proteína, baseada no padrão dietético de populações humanas de áreas endêmicas para esquistossomose, no Nordeste do Brasil (COUTINHO; FREITAS; ABATH, 1992). Como dieta controle utilizada para alimentação dos animais eutróficos, foi fornecida a dieta comercial NUVILAB (Nuvital Nutrients LTDA., Colombo, Paraná, Brasil), contendo 22% de proteína (Tabela 1). Todos os animais receberam dieta e água “ad libitum”.

Infecção: Realizada após 30 dias do início do consumo das respectivas dietas nos grupos experimentais desnutridos e eutróficos. Cercárias foram obtidas caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* infectados com *Schistosoma mansoni* da cepa LE (Belo Horizonte) foram expostos à luz por cerca de 40 min para eliminação de cercárias. Após esse tempo, aproximadamente 30 cercárias foram distribuídas em um volume de água de aproximadamente 10 mL, para cada camundongo. Os animais foram mantidos em contato com essa suspensão por 1 h e após a recontagem das cercárias, foram, então, removidos para suas respectivas gaiolas.

Grupos experimentais: Os camundongos foram divididos em 4 diferentes grupos, com 19 animais cada um. Grupo desnutrido infectado (DI); grupo desnutrido não infectado (DNI); grupo eutrófico infectado (EI); grupo eutrófico não infectado (ENI).

Avaliação do estado nutricional: O estado nutricional dos animais de todos os grupos foi avaliado através da análise das curvas ponderais, obtidas após registro semanal do peso corporal, além da observação do aspecto clínico dos animais, tais

como pelagem, postura e motilidade (COUTINHO, 1980; TEODÓSIO et al., 1990).

Estudo parasitológico: Os camundongos foram sacrificados após sedação prévia por injeção intraperitoneal de Xilasina (10 mg/Kg de peso do corporal) e Ketamina (115 mg/Kg de peso do corporal) 20 semanas após a infecção e submetidos a perfusão do sistema venoso portal para coleta e quantificação dos vermes (DUVALL; DE WITT, 1967) e contagem dos ovos contidos no fígado, após digestão em KOH a 4% (CHEEVER, 1970).

Estudo morfológico: Fígado e baço foram removidos, pesados e examinados macroscopicamente. Os valores obtidos através da pesagem foram utilizados para determinação da relação percentual entre o peso corporal dos camundongos no momento da necropsia e o peso dos órgãos acima citados, para cada grupo. Posteriormente, amostras de fígado foram fixadas em *Bouin*, incluídas em parafina e cortadas em 5 µm de espessura. Os cortes destinados ao estudo histopatológico foram corados pela hematoxilina-eosina e aqueles utilizados no estudo morfométrico, foram corados pela técnica do picro-sirius vermelho, seletiva para colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLOS; BRENTANI, 1979).

Estudo morfométrico: Os corte histológicos de fígado, coradas pelo picro-sirius vermelho, foram examinadas em dez campos microscópicos aleatórios, através de Sistema de Processamento e Análise de Imagem Leica QWin, versão 2.6 MC (Leica Cambridge, Cambridge – England), com câmara digital acoplada (Leica JVC: modelo TK-C1380, Pine Brook, New Jersey – USA). Foram calculados os parâmetros: volume, densidade de volume e densidade numérica dos granulomas, além de mensurada a área percentual de tecido fibroso no fígado.

Estudo bioquímico: Amostras de fígado foram utilizadas para determinação do colágeno, medido através da hidroxiprolina (BERGMAN; LOXLEY, 1963). Os dados obtidos foram aplicados a um programa computadorizado, que fornece a quantidade de hidroxiprolina em micromol por grama de fígado. Os níveis de hidroxiprolina foram corrigidos para intensidade da infecção, dividindo-se a hidroxiprolina hepática total pelo número de ovos de *S. mansoni* no fígado, analisando-se os resultados com auxílio de planilha de cálculo elaborada por Cheever et al. (1987).

Estudo imunológico: Camundongos infectados (via percutânea) com aproximadamente 100 cercárias de *S. mansoni*, foram perfundidos 60 dias após a infecção e seus fígados removidos, segmentados e embebidos em solução salina a 1,7% por 24 h a 4°C. Após esse período, foram submetidos a banho-maria por 2 h a 37°C. Posteriormente, os fígados foram triturados, e a suspensão filtrada uma vez em malha de 180 µm e uma segunda vez em malha de 130 µm. O material filtrado foi distribuído em cálices de sedimentação por 2 h, para decantação. O sedimento foi submetido a cinco centrifugações (200 x g) de 5 min a 4°C, o sobrenadante desprezado e o precipitado ressuspendido em 10 mL de salina 1,7%. Em seguida, o sedimento foi macerado manualmente, na presença de inibidor de protease [EDTA (“Ethylene diamine tetracetic acid”) 1 mM em metanol, PMSF (“Phenylmethylsulfonyl fluoride”) 1 mM] resfriado. Após a maceração, todo o material foi ultrassonicado. Em seguida, o material foi ultracentrifugado a 10⁴ x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante submetido à nova ultracentrifugação a 10⁵ x g por 1 h a 4°C. Após essa etapa, o sobrenadante foi dialisado, utilizando-se membrana de celulose. Os antígenos obtidos foram dosados através do método de Bradford (1976) e seus perfis protéicos analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a uma concentração de 12% na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), de acordo com Laemmli (1970) e corados pelo Comassie Blue.

Cultura de células esplênicas: Em condições estéreis, 9 animais de cada grupo (DI, EI, DNI e ENI) foram sacrificados por deslocamento cervical em diferentes tempos (60, 90 e 150 dias, utilizando-se 3 animais para cada tempo), sendo os baços removidos para obtenção de células destinadas ao estudo da resposta imune celular durante as fases aguda, intermediária e crônica da esquistossomose. As suspensões de células esplênicas foram obtidas por maceração dos baços em meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo - Brasil) acrescido de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina a 1%) e aminoácido (1% de L-glutamina), e centrifugadas por 5 min a 300 x 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 ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal - WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro - Brasil) e a viabilidade observada pelo emprego de Trypan Blue a 10%. As suspensões celulares foram distribuídas

em placas de cultura de 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 e 120 h a 37°C em estufa de CO₂ a 5%, para obtenção de sobrenadante e posterior dosagem de citocinas. Esses três tempos de cultivo foram utilizados para determinar o melhor tempo de produção de cada citocina.

Dosagem de citocinas nos sobrenadantes: A produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-13 por células esplênicas foi avaliada através de ELISA de captura, utilizando pares de anticorpos Pharmingen ou R & D Systems, seguindo as instruções do fabricante. As reações foram reveladas pelo uso de TMB (3,3',5,5' – tetramethylbenzidine, DAKO) ou ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), Sigma] como substrato. Para as leituras das densidades ópticas foram utilizados comprimentos de onda de 450 ou 405 nm, respectivamente.

Determinação da cinética de produção das citocinas: Após a dosagem das citocinas em cada tempo utilizado para o cultivo das células (24, 48 e 120 h), foi verificado que a maior produção das citocinas IL-4 e IL-13 ocorrem no período de 120 h, enquanto que para IFN- γ o melhor tempo de produção foi de 24 h. Uma vez determinado o melhor tempo de produção para cada citocina, esse ponto foi utilizado para a construção de gráficos de evolução da cinética de produção de cada uma das citocinas nos tempos de infecção estudados (60, 90 e 150 dias).

Análise estatística: Os resultados obtidos foram analisados pelos testes ANOVA, “t” de Student, Mann-Whitney ou Qui-Quadrado. Para todos os testes, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estado Nutricional

A avaliação do estado nutricional revelou que os animais desnutridos apresentaram pesos corporais inferiores aos camundongos eutróficos, com diferença estatística entre os grupos ($p < 0,001$). Além do ganho de peso prejudicado, a desnutrição pôde ser comprovada através dos aspectos clínicos apresentados por esses animais, como dificuldade de locomoção e eriçamento dos pêlos. A infecção pelo *S. mansoni* parece não ter influenciado o estado nutricional de ambos os grupos, uma vez que os animais infectados apresentaram, na curva ponderal, comportamento similar aos seus respectivos controles não infectados. Esses achados corroboram as observações realizadas por Coutinho et al. (2003; 2007) em estudos anteriores (Figura 1).

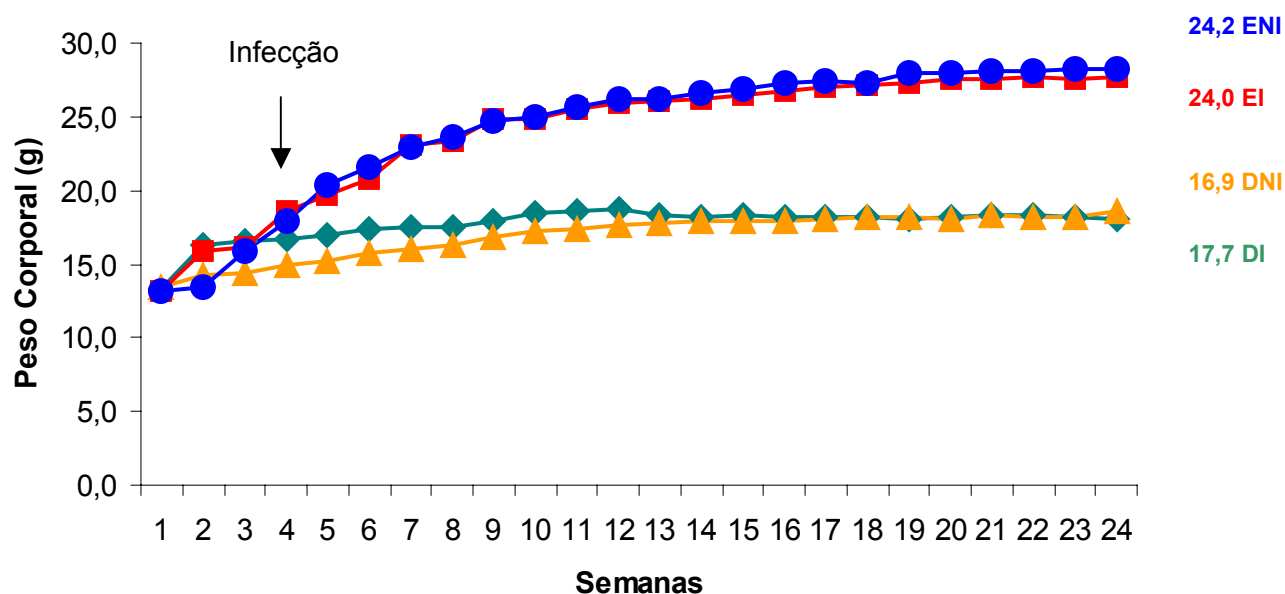


Figura 1: Curvas ponderais de camundongos isogênicos (C57BL/6) desnutridos (DI) e eutróficos (EI) infectados com *S. mansoni* e seus respectivos controles não infectados (DNI e ENI). Os valores numéricos apresentados se referem às médias de peso corporal de cada grupo, obtidas na 24ª semana de experimento, a seta representa o ponto de tempo no qual a infecção dos grupos DI e EI foi realizada.

Avaliação da carga parasitária

A quantidade média de parasitos coletados em cada grupo (Figura 2), mostra que camundongos desnutridos desenvolveram cargas parasitárias significativamente menores que camundongos eutróficos ($p < 0,0001$). Com relação ao número de ovos de *S. mansoni* encontrados no fígado total dos animais (Figura 3), foi observada uma discreta redução na no valor absoluto do grupo desnutrido, no entanto, a diferença entre os grupos não foi significativa ($p = 0,75$). A diferença entre o número de vermes recuperados do grupo EI, em comparação com o grupo DI, suporta a hipótese defendida por outros autores de que o estado nutricional do hospedeiro exerce influência sobre o comportamento biológico do parasito (FERREIRA; COUTINHO, 1999), podendo induzir alterações nos vermes adultos de ambos os gêneros (NEVES et al., 2001; 2002). Essas alterações são, provavelmente, decorrentes da indisponibilidade de nutrientes essenciais requeridos para um adequado crescimento e desenvolvimento do parasito no interior dos vasos sangüíneos, ocasionada pela carência nutricional do hospedeiro (OLIVEIRA et al., 2003). A redução na fecundidade dos vermes, descrita em hospedeiros desnutridos, poderia explicar o menor número de ovos encontrados no fígado total desses animais (COUTINHO et al., 1997; 2003; 2007).

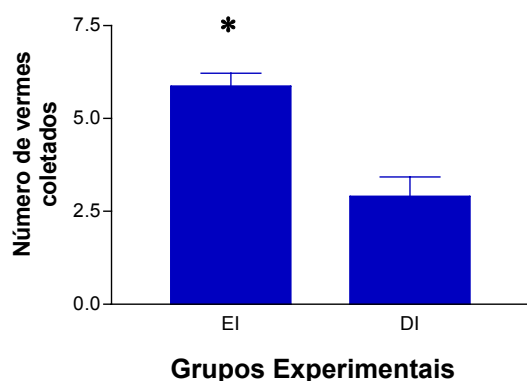


Figura 2: Número de parasitos coletados por perfusão do sistema venosos portal em camundongos isogênicos (C57BL/6) desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com *S. mansoni* (*) $p < 0,001$.

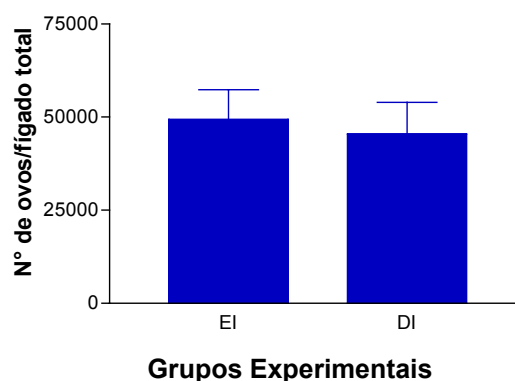


Figura 3: Número de ovos encontrados no fígado de camundongos isogênicos (C57BL/6) desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com *S. mansoni*.

Estudo morfológico macroscópico do fígado e do baço

A Figura 4 mostra a relação percentual entre o peso corporal e o peso dos órgãos (fígado e baço) dos animais infectados e seus respectivos controles, no momento do sacrifício (150 dias após a infecção).

A relação peso corporal *versus* peso do fígado foi maior para os animais eutróficos, quando comparada com os desnutridos, havendo diferença estatística entre os grupos EI e DI ($p < 0,001$). A comparação realizada entre os grupos eutróficos mostrou que o grupo infectado (EI) apresentou uma relação percentual maior que o grupo não infectado (ENI), com $p < 0,001$. O mesmo foi observado entre os grupos desnutridos infectados (DI) e não infectados (DNI), sendo $p < 0,001$. A hepatomegalia, apesar de ter sido observada em ambos os grupos infectados, apresentou-se de forma mais acentuada nos animais eutróficos, mostrando que o estado nutricional do hospedeiro, é um fator determinante nesse processo patológico, considerando que os animais alimentados com dieta balanceada possuem uma maior reserva de proteínas no fígado do que aqueles alimentados com dieta hipoprotéica (COUTINHO et al., 2003).

A relação peso corporal *versus* peso do baço mostrou que os animais infectados, tanto eutróficos (EI) quanto desnutridos (DI), apresentaram sempre relações percentuais maiores que os seus respectivos controles não infectados (ENI e DNI), porém essa diferença entre as médias não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). A hipertrofia do baço é diretamente influenciada pelo fator infecção, que propicia estimulação antigênica levando a uma hiperplasia das células do sistema fagocítico mononuclear do baço (MAGALHÃES FILHO; COUTINHO, 1960). Nesse caso, o estado nutricional exerce, apenas, uma influência secundária (COUTINHO et al., 2003, 2007; COUTINHO, 2004).

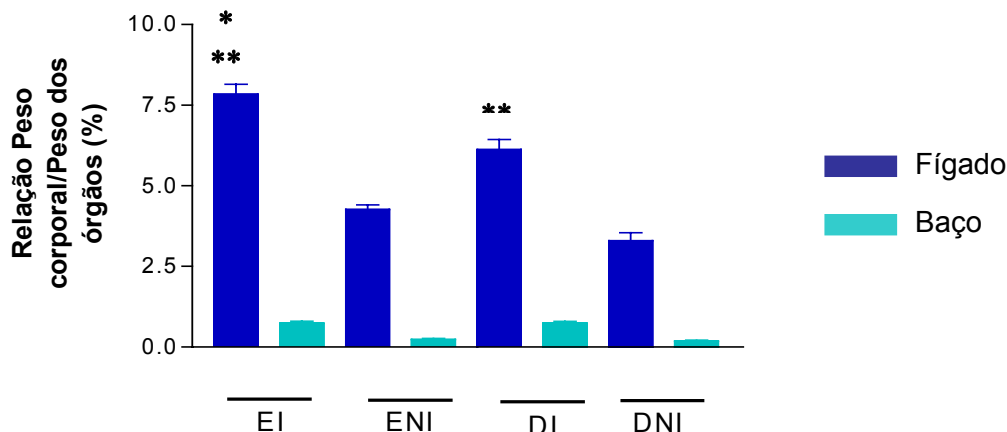


Figura 4: Relação percentual entre o peso corporal e o peso dos órgãos (fígado e baço) de camundongos isogênicos (C57BL/6) desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com *S. mansoni*, em comparação com seus respectivos controles não infectados (DNI e ENI). * Diferença estatística significativa entre os grupos eutróficos e desnutridos, infectados. ** Diferença estatística significativa entre os grupos infectados eutróficos e desnutridos, comparados com os respectivos grupos não infectados ($p < 0,001$).

Estudo histopatológico do fígado

Fase aguda

Os camundongos desnutridos e com 60 dias de infecção apresentavam parênquima com discreta atrofia das traves hepáticas, mas sem alterações degenerativas importantes, exceto eventuais focos de necrose coagulativa aguda, com intensa infiltração local de polimorfonucleares, sobretudo de eosinófilos. Esses infiltrados inflamatórios, de caráter difuso, eram freqüentemente observados nos espaços-porta médios e grandes (hepatite reacional). Os granulomas esquistossomóticos periovulares eram pouco numerosos, de pequena dimensão, isolados, distribuídos esparsamente pelo parênquima e, em sua maioria, compostos predominantemente por polimorfonucleares eosinófilos e neutrófilos, com predomínio dos primeiros, além de alguns macrófagos e linfócitos (granulomas em fase exsudativa). Esses granulomas mostravam-se, às vezes, agrupados, formando extensos conglomerados. Em todos os camundongos desse grupo as infecções foram de caráter moderado, em relação ao aspecto histopatológico (Figura 5).

Nos camundongos eutróficos com 60 dias de infecção, os aspectos histológicos diferiam em relação à presença de maior número de granulomas periovulares, isolados e esparsamente distribuídos pelo parênquima hepático, às

vezes formando conglomerados, sendo os mesmos de maior dimensão em relação ao que foi visto no grupo dos animais desnutridos. Além disto, em muitos desses granulomas notava-se deposição de pequena quantidade de colágeno. Também ocorria intensa infiltração eosinofílica nos médios e grandes espaços-porta e, às vezes, na porção central dos granulomas. Áreas de necrose aguda coagulativa (necrose isquêmica) também foram observadas (Figura 6).

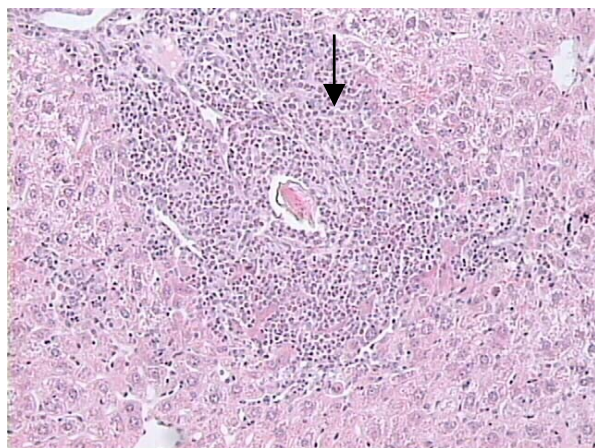


Figura 5: Camundongo desnutrido, com 60 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Granuloma do tipo exsudativo, observando-se intensa proliferação de eosinófilos em torno de ovo em degeneração (HE – 100x).

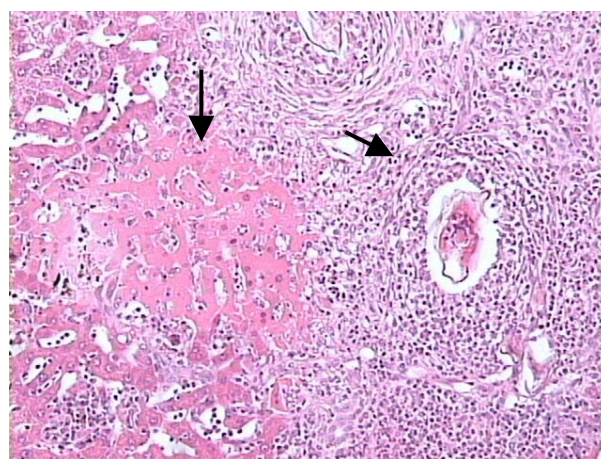


Figura 6: Camundongo eutrófico, com 60 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Presença de eosinofilia intensa em torno do ovo com miracídio em desintegração e alguns mononucleares permeando o infiltrado eosinofílico (HE – 200x).

A principal diferença observada entre os grupos, nesse tempo de infecção, baseia-se, principalmente na quantidade e dimensões das lesões granulomatosas, sendo o grupo DI aquele que apresentou menor número de granulomas. Nesse grupo, as lesões eram de menor tamanho, quando comparadas às do grupo EI. A composição celular dos granulomas de ambos os grupos era basicamente de eosinófilos, com presença de neutrófilos, linfócitos e macrófagos, em menor quantidade. Em virtude de a resposta granulomatosa ser comandada por citocinas Th2, fenotipicamente, os granulomas apresentam uma grande e distinta população de eosinófilos (ABATH et al., 2006), tendo IL-4 e IL-13 papéis importantes no desenvolvimento, diferenciação e recrutamento dessas células para os sítios de inflamação (CHIARAMONTE et al., 1999a; 1999b; JABARA et al., 1988; HAMAGUCHI et al., 1987) justificando, assim, a grande concentração do componente eosinofílico encontrado nos granulomas dos animais desnutridos e eutróficos, porém em maior quantidade para estes últimos. Os eosinófilos, além de

serem capazes de destruir parasitos do *S. mansoni* na presença de anticorpos específicos, pelo mecanismo de citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC), também são incriminados na destruição dos ovos depositados pelos vermes (JAMES; COLLEY, 1976), indicando funções dirigidas a diferentes estágios do ciclo do parasito (CAPRON; CAPRON, 1992).

Fase intermediária

Aos 90 dias, fase arbitrada na presente investigação como “intermediária”, o grupo desnutrido apresentava numerosos granulomas periovulares ora isolados, ora coalescentes, com presença de macrófagos e deposição colágena moderada. A infiltração eosinofílica ocorria em menor intensidade e nos granulomas depositava-se um colágeno de aspecto fibrilar. Em 3 animais desse grupo foram vistos, em grandes espaços-porta, conglomerados de ovos e aumento moderado do tecido conjuntivo portal (Figuras 7, 8, 9).

Nesse mesmo ponto de tempo, camundongos eutróficos também apresentavam infecções intensas, com granulomas periovulares ora isolados, ora agrupados. Em 4 animais ocorria aumento do tecido conjuntivo portal, com presença de granulomas periovulares em fase predominantemente produtiva, notando-se, ainda, certo grau de eosinofilia em grandes espaços-porta e na intimidade de alguns granulomas (Figura 10).

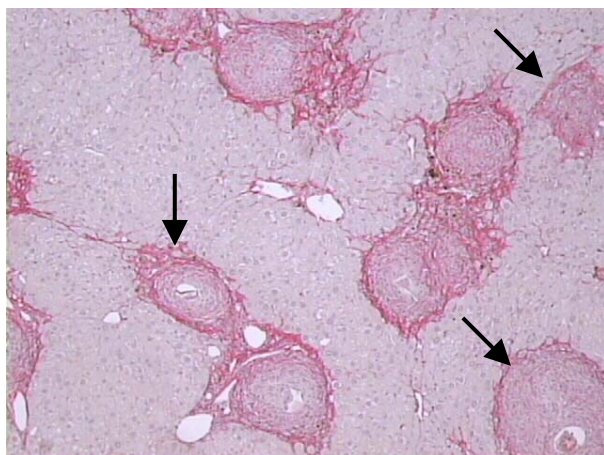


Figura 7: Camundongo desnutrido, com 90 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Granulomas isolados, pequenos, esparsos pelo parênquima e com pequena deposição de tecido colágeno (PS- 100x).

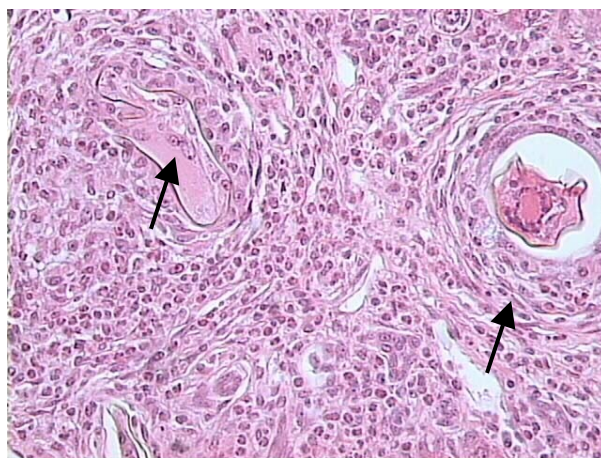


Figura 8: Camundongo desnutrido, com 90 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Ovos do parasito em degeneração, envolvidos por intensa reação eosinofílica. Presença de mononucleares na estrutura do granuloma (à direita) e de gigantócito invadindo a casca do ovo (à esquerda) - HE- 400x.

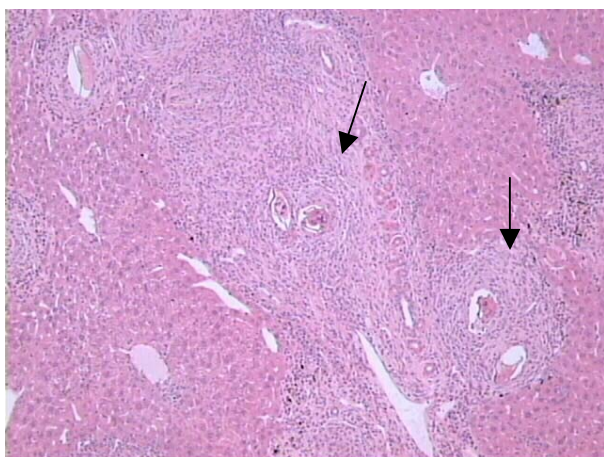


Figura 9: Camundongo desnutrido, com 90 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Conglomerados fibrosos periovulares em espaço porta (HE– 100x).

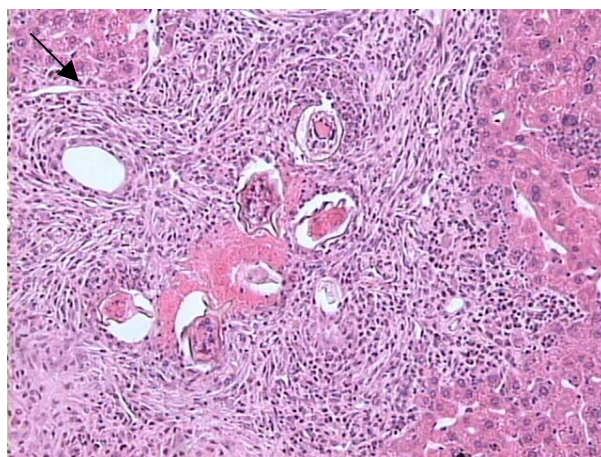


Figura 10: Camundongo eutrófico, com 90 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Infiltração eosinofílica e aumento do tecido fibroso do espaço-porta devido à presença de conglomerados de ovos (HE– 200x).

Nessa fase, os camundongos desnutridos mostraram maior número de granulomas, em relação ao período de 60 dias. Nesses granulomas, a infiltração eosinofílica apresenta-se menos intensa que na fase aguda, podendo ser observada uma população distinta de macrófagos. Como os macrófagos ativados também são responsáveis pela produção de colágeno, nesse modelo experimental (HESSE et al., 2001), o número diferenciado dessas células poderia explicar a moderada colagenização dos granulomas desse grupo observada nesse ponto de tempo. Os animais eutróficos, aos 90 dias após a infecção, mostraram granulomas em fase produtiva, ainda apresentando certo grau de eosinofilia, bem como persistência do processo inflamatório dos espaços porta. O aumento moderado do tecido conjuntivo portal, observado em animais de ambos os grupos foi, provavelmente, ocasionado pelo processo inflamatório acentuado.

Fase crônica

Na fase crônica da infecção (150 dias), os camundongos desnutridos apresentavam numerosos granulomas periovulares isolados, pequenos, sendo freqüente formação de extensos conglomerados de ovos nos espaços porta e/ou em pleno parênquima hepático. Esses granulomas eram formados por células

mononucleares, alguns linfócitos e eosinófilos em quantidade moderada. Observava-se, ainda, pequena deposição de colágeno nos granulomas e discreto aumento de colágeno nos espaços-porta médios e grandes. Esses granulomas de aspecto produtivo, com pouca fibrose, contrastavam com os granulomas exsudativos, ricos em polimorfonucleares, sobretudo eosinófilos, presentes na fase aguda da infecção. Eventuais focos de esteatose não sistematizada também foram observados. Em nenhum dos animais foram detectadas imagens sugestivas de fibrose periportal murina equivalente à fibrose hepática humana de Symmers (Figuras 11 e 12).

O grupo de camundongos eutróficos 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 periovulares formados em torno de ovos de *S. mansoni* degenerados ou de resto de cascas, a maioria de predominância colágena, às vezes exibindo componente exsudativo, particularmente eosinófilos. Também pôde ser observada presença de pigmento pardo-amarelado, grumoso, sobretudo nos espaços-porta mais calibrosos (pigmento esquistossomótico). Esses granulomas eram isolados e distribuídos de modo não sistematizado no parênquima. Nos casos de infecção mais intensa, apresentavam-se em colescência, 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 (Figuras 13 e 14).

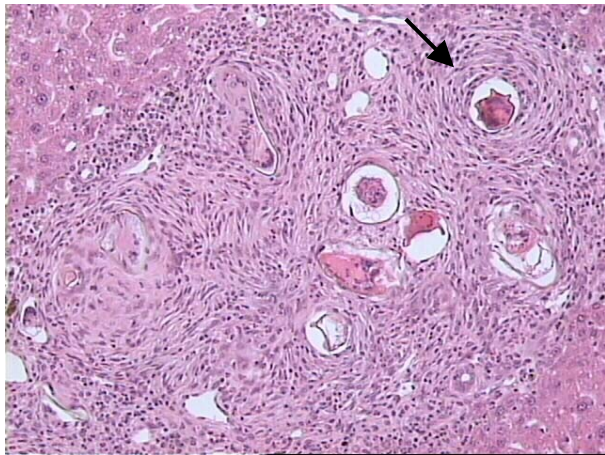


Figura 11: Camundongo desnutrido, com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Conglomerados de ovos degenerados e granulomas colagenizados (HE- 200x).

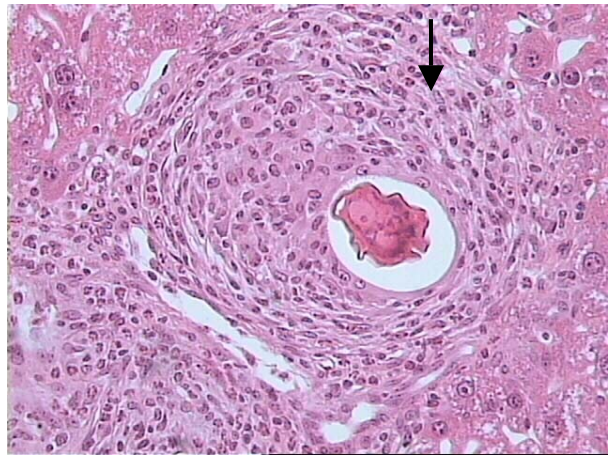


Figura 12: Camundongo desnutrido, com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Detalhe do granuloma peri-ovular, observado em maior aumento. Observar a presença de eosinófilos, a riqueza de células mononucleares e início de deposição colágena (HE- 200x).

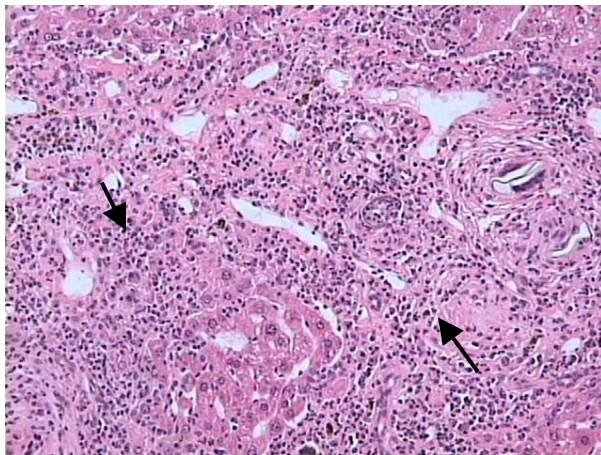


Figura 13: Camundongo eutrófico, com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Fibrose hepática periportal murina. Observar a extensa área de fibrose com restos de estruturas granulomatosas, neo-vascularização e infiltração inflamatória crônica (PS - 100x).

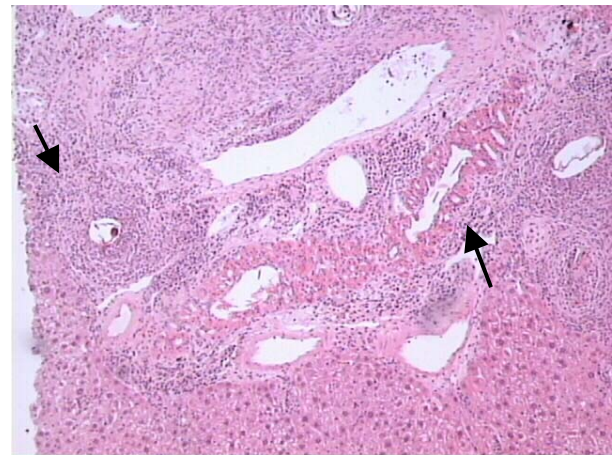


Figura 14: Camundongo eutrófico, com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. Fibrose hepática periportal murina. Observar o aumento do tecido conjuntivo portal com restos de estruturas granulomatosas peri-ovulares, infiltração inflamatória crônica, hiperplasia de ductos bilíferos e neoformação vascular (HE- 200x).

Nesta fase, os camundongos desnutridos apresentaram numerosos granulomas peri-ovulares. Apesar de esses granulomas terem sido visualizados, muitas vezes, formando extensos conglomerados, não se observava deposição de colágeno intensa no interior das lesões, ou mesmo nos espaços porta,

caracterizando, assim, o padrão histológico de granulomas isolados (HENDERSON et al., 1993), não sendo observado desenvolvimento de fibrose periportal nesses animais, confirmando, assim, os achados de Coutinho et al. (1997; 2003; 2007).

No grupo eutrófico, os granulomas apresentavam-se em maior número e tamanho que nos desnutrido, tendo, em sua maioria, predominância do componente colágeno. Da mesma forma que os desnutridos, esses granuloma mostravam-se ora dispersos, ora agrupados. No entanto, foi observada, em 40% dos animais desse grupo, formação de fibrose hepática periportal. Os demais 60% apresentaram características de granulomas isolados (HENDERSON et al., 1993).

Embora todos os camundongos tenham sido expostos ao mesmo número de cercárias, o número de vermes recuperados diferiu discretamente entre os animais. Essa diferença na carga parasitária pode ter influenciado o desenvolvimento dos padrões histopatológicos observados nesse grupo, assim como descrito por Silva et al. (2004).

Os camundongos avaliados histologicamente apresentaram infecção ora caráter moderado, ora intenso, baseado nas características da resposta inflamatória, quantidade de lesões granulomatosas e fibrose hepática. Essas observações contrastam com o que foi descrito em trabalhos anteriores que utilizaram a mesma cepa de camundongo (C57BL/6), nos quais a infecção apresentava intensidade leve, comparada com outras linhagem de animais isogênicos (CHEEVER et al., 1987; CHIARAMONTE et al., 2001).

Estudo morfométrico

De acordo com a análise morfométrica realizada no tecido hepático dos camundongos infectados, o percentual de tecido fibroso encontrado foi mais elevado para os animais eutróficos em relação aos desnutridos. Do mesmo modo, os parâmetros sobre densidade volumétrica e numérica dos granulomas esquistossomóticos periovulares mostraram valores mais altos para o grupo de animais alimentados com dieta NUVILAB (EI), em comparação com os animais alimentados com a dieta DBR (DI). O parâmetro volume dos granulomas, todavia, apresentou-se mais elevado entre os animais desnutridos, quando comparados aos eutróficos. No entanto, nenhum dos parâmetros analisados apresentou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$)

Estudo bioquímico

A Figura 15 ilustra a quantidade de colágeno hepático medido através da dosagem bioquímica da hidroxiprolina. No grupo eutrófico foi observado um discreto aumento na quantidade de tecido colágeno em relação ao grupo desnutrido, no entanto essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$). Esse resultado apresentou associação com o percentual de tecido colágeno mensurado morfometricamente.

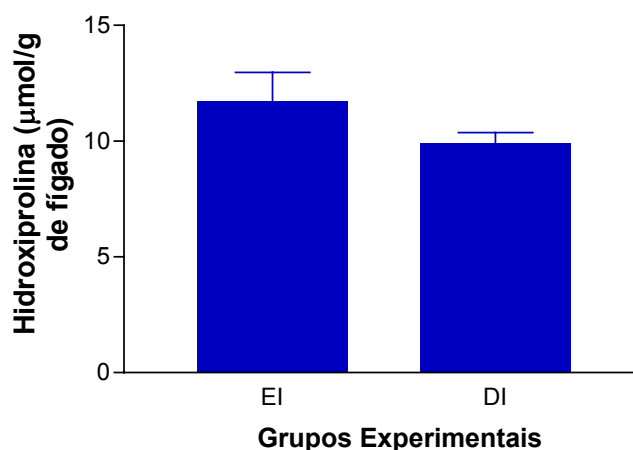


Figura 15: Níveis de de hidroxiprolina hepática ($\mu\text{mol/g}$ de fígado), mensurada através da dosagem bioquímica em camundongos isogênicos (C57BL/6) desnutridos (DI) e eutróficos (EI), infectados com *S. mansoni*.

Os dados referentes à mensuração do colágeno hepático, realizada através de análise morfométrica e bioquímica, mostraram equivalência de resultados entre ambas as técnicas, sendo a primeira considerada a mais sensível (apud BARBOSA Jr, 2001). Ambos os grupos (desnutridos e eutróficos) revelaram quantidades semelhantes de tecido fibroso, não havendo diferença estatística entre os mesmos. Esse resultado difere dos achados de Coutinho et al., (2003, 2007) onde foi observado que os animais eutróficos apresentaram valores mais elevados para a quantidade de tecido colágeno, em relação aos desnutridos. Todavia, deve ser levado em consideração que, nos trabalhos acima citados foram utilizadas diferentes cepas, tanto de camundongo quanto de parasito (camundongos albinos Swiss “outbred”, e parasitos da cepa BH – Belo Horizonte, respectivamente). Os demais parâmetros morfométricos analisados aos 150 dias de infecção (volume, densidade volumétrica e numérica dos granulomas) também não diferiram estatisticamente, entre animais desnutridos e eutróficos.

Avaliação dos níveis de citocinas

Produção de IFN- γ

Foi observada uma maior produção de IFN- γ aos 60 dias de infecção para o grupo DI em relação ao grupo EI, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0,03$). Noventa dias após a infecção, os níveis de IFN- γ diminuíram em ambos os grupos (DI e EI, $p > 0,05$). A análise realizada na fase crônica da doença, ou seja, 150 dias após a infecção, mostrou que não houve produção de IFN- γ para esses mesmos grupos estudados (Figura 16).

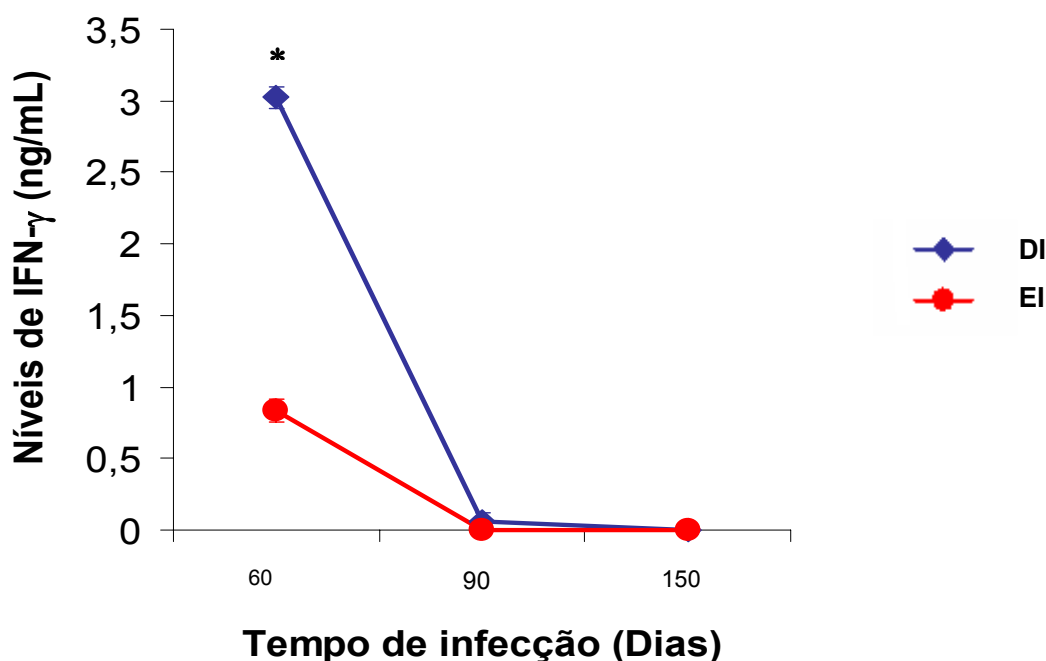


Figura 16: Produção de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos isogênicos (C57BL/6) desnutridos e eutróficos, infectados com *S. mansoni*. As células foram estimuladas com o antígeno SEA (20 μ g/mL) nos períodos de 60, 90 e 150 dias após a infecção e o sobrenadante coletado após 24h de cultivo. A cor azul representa o grupo desnutrido infectado (DI) e a vermelha representa o grupo eutrófico infectado (EI). (*) Diferença estatística ($p = 0,03$) entre os grupos DI e EI no período de 60 dias após a infecção ($X \pm EPM$).

Produção de IL-4

Sessenta dias após a infecção, não foi observada produção de IL-4, tanto para o grupo desnutrido quanto para o grupo eutrófico. No período de 90 dias de

infecção, foram detectados níveis elevados dessa citocina, com valores mais altos para os animais do grupo DI ($p = 0,02$). Aos 150 dias de infecção, a produção de IL-4 diminuiu para ambos os grupos estudados, atingindo níveis equivalentes ($p > 0,05$, Figura 17).

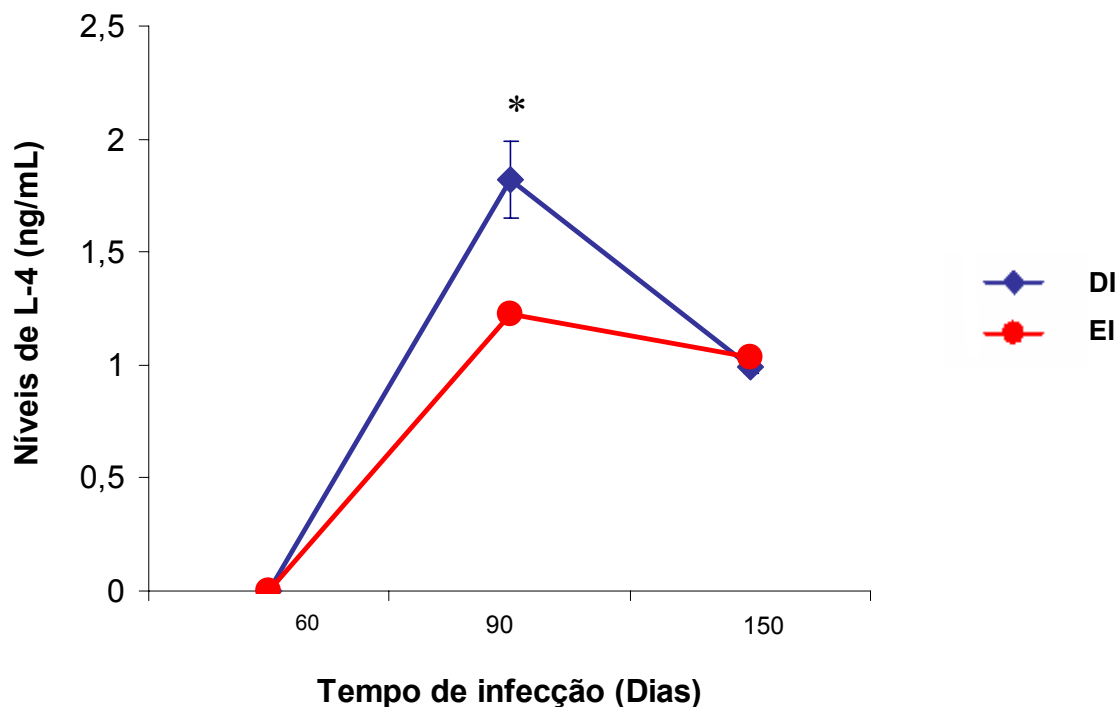


Figura 17: Produção de IL-4 nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos isogênicos (C57BL/6) desnutridos e eutróficos, infectados com *S. mansoni*. As células foram estimuladas com o antígeno SEA ($20\mu\text{g/mL}$) nos períodos de 60, 90 e 150 dias após a infecção e o sobrenadante coletado após 120h de cultivo. A cor azul representa o grupo desnutrido infectado (DI) e a vermelha representa o grupo eutrófico infectado (EI). (*) Diferença estatística ($p = 0,02$) entre os grupos DI e EI no período de 90 dias de infecção ($X \pm \text{EPM}$).

Produção de IL-13

Analisando a produção de IL-13 no período de 60 dias de infecção foram observados níveis mais elevados para os animais eutróficos, quando comparados aos desnutridos ($p > 0,05$). No entanto, aos 90 dias, os níveis de IL-13 do grupo DI aumentaram e atingiram níveis mais elevados do que o grupo EI ($p = 0,02$). Esse último grupo (EI) apresentou uma diminuição na produção IL-13, quando comparada com os seus níveis aos 60 dias ($p > 0,05$). O grupo EI permaneceu produzindo níveis semelhantes de IL-13 aos 150 dias, enquanto que o DI apresentou uma

queda, chegando a valores mais baixos que o grupo EI. A diferença entre as médias desses grupos (DI e EI), nesse período de tempo, foi significativa ($p = 0,001$, Figura 18).

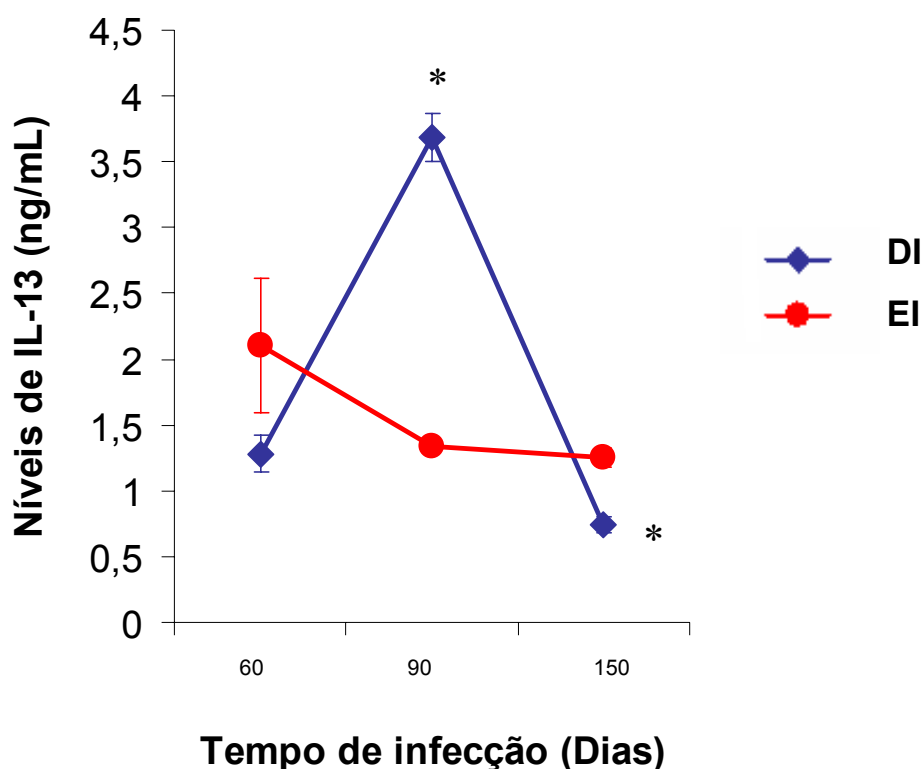


Figura 8: Produção de IL-13 nos sobrenadantes de cultura de esplenócitos de camundongos isogênicos (C57BL/6) desnutridos e eutróficos, infectados com *S. mansoni*. As células foram estimuladas com o antígeno SEA (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) nos períodos de 60, 90 e 150 dias após a infecção e o sobrenadante coletado após 120 h de cultivo. O ponto azul representa o grupo desnutrido infectado (DI) e o vermelho representa o grupo eutrófico infectado (EI). (*) Diferença estatística entre os grupos DI e EI no período de 90 ($p = 0,02$) e 150 ($p = 0,001$) dias de infecção ($X \pm \text{EPM}$).

Na Tabela 1 encontra-se descrita, sinteticamente, a evolução da resposta imune celular de ambos os grupos estudados, em todos os tempos analisados.

Tabela 1: Quadro sinóptico dos resultados da resposta imune celular durante a infecção esquistossomótica, em camundongos isogênicos (C57BL/6) desnutridos (DI) e eutróficos (EI).

60 dias de infecção	90 dias de infecção	150 dias de infecção
Desnutridos: Indicativo de perfil Th1.	Desnutridos: Perfil Th2.	Desnutridos: Perfil Th2.
IFN- γ : 3 ng/mL	IFN- γ : nenhuma produção	IFN- γ : nenhuma produção
IL-4: nenhuma produção	IL-4: 1,8 ng/mL	IL-4: 0,9 ng/mL
IL-13: 1,2 ng/mL	IL-13: 3,6 ng/mL	IL-13: 0,7 ng/mL
Eutróficos: Indicativo de perfil Th2	Eutróficos: Perfil Th2	Eutróficos: Perfil Th2
IFN- γ : 0,8ng/mL	IFN- γ : nenhuma produção	IFN- γ : nenhuma produção
IL-4: nenhuma produção	IL-4: 1,2 ng/mL	IL-4: 1,0 ng/mL
IL-13: 2,1 ng/mL	IL-13: 1,3 ng/mL	IL-13: 1,2 ng/mL

Durante a infecção esquistossomótica do modelo murino, é observada uma dicotomia Th1/Th2 (apud MOSMANN; SAD, 1996). Na fase inicial da doença são observados altos níveis de IFN- γ que caracterizam o perfil de resposta Th1. Com a produção de ovos pelos vermes adultos, uma forte resposta Th2 passa a ser observada, representada por níveis elevados de IL-4 e IL-13 (STADECKER et al., 2004; PEARCE et al., 1991). As funções efetoras de cada resposta são distintas, inclusive no que se refere ao desenvolvimento de fibrose hepática, sendo a IL-13 considerada um mediador primário da fibrogênese, enquanto o IFN- γ apresenta uma marcada atividade anti-fibrogênica (PEARCE; MACDONALD, 2002; HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000; CHIARAMONTE et al., 2001). No entanto, a contribuição da IL-4 para o desenvolvimento de fibrose na esquistossomose 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 é incapaz de repor a atividade fibrogênica da IL-13 durante a infecção esquistossomótica.

A avaliação da resposta imune celular, no presente estudo, mostrou que aos 60 dias de infecção, os camundongos desnutridos apresentaram resposta Th1 com intensa produção de IFN- γ e baixa produção de IL-13, enquanto que os eutróficos apresentaram uma resposta Th2, representada por níveis mais elevados de IL-13. Nesses dois grupos não foi detectada produção de IL-4. Os resultados do grupo eutrófico corroboram as informações disponíveis na literatura, uma vez que nesse tempo de infecção, já havendo oviposição, os antígenos dos ovos estimulam o desenvolvimento de uma resposta Th2, enquanto que o grupo desnutrido apresenta um retardamento no desenvolvimento dessa resposta. Esse retardamento é, provavelmente, ocasionado por alterações no sistema reprodutor dos parasitos fêmeas, causando distúrbios na formação e deposição dos ovos (apud COUTO et al., 2002; FERREIRA et al., 1993; FERREIRA et al., 1998; TSHIKUKA et al., 1997).

Apesar de não ter sido detectada IL-4 em ambos os grupos, a produção de IL-13 pôde ser observada tanto no grupo DI (menores níveis), quanto no grupo EI (maiores níveis). Isso é possível uma vez que a IL-13 é produzida independentemente da IL-4, sendo considerada como uma citocina crítica no desenvolvimento da resposta Th2 (WYNN, 2003).

Aos 90 dias de infecção, ambos os grupos desenvolveram resposta Th2, porém nos desnutridos essa resposta se apresentou mais forte do que nos eutróficos. Nesses últimos, o componente Th2 começou a diminuir em relação ao período de 60 dias. Apesar de terem sido detectados níveis de IL-4 nesse período (90 dias), a produção de IL-13 começou a diminuir e não foi detectada produção de IFN- γ . Nos desnutridos, o componente Th2 aumentou, tanto pela produção de IL-4, como pelo aumento dos níveis de IL-13, em relação ao período de 60 dias. Como nos eutróficos, também não foi detectada produção de IFN- γ no grupo desnutrido.

Aos 150 dias após a infecção, período correspondente à consolidação da fase crônica, ambos os grupos continuaram apresentando resposta Th2, sendo mais baixa no grupo desnutrido. A produção tanto de IL-4 como de IL-13 se revelou bastante reduzida. No grupo eutrófico, porém, os níveis de ambas as citocinas não sofreram alterações significativas permanecendo constantes. Produção de IFN- γ não foi detectada em nenhum dos dois grupos estudados.

Os resultados obtidos nos grupos DI e EI estão de acordo com os achados de Chiaramonte et al. (2001) que observaram que os maiores níveis de expressão de IL-4 e IL-13, em camundongos C57BL/6 eutróficos, eram alcançados entre 9 e 12 semanas após-infecção. Além disso, Silva et al. (2004) demonstraram que camundongos da linhagem BALB/c, eutróficos, cronicamente infectados (150 dias), que desenvolveram fibrose periportal ou apenas granulomas isolados no fígado, tiveram a resposta Th1 suprimida, apresentando níveis de IL-4 e IL-5 e caracterizando, assim, o perfil de resposta Th2.

A cinética de produção das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-13 nos camundongos desnutridos não acompanhou a cinética de produção dessas mesmas citocinas nos animais eutróficos, os quais apresentaram desenvolvimento de resposta imune similar ao descrito na literatura (PEARCE; MACDONALD, 2002).

Nesse estudo, a carência protéica parece não ter exercido influência direta sobre os níveis de produção dessas citocinas, uma vez que os animais desnutridos, em determinados tempos de infecção, produziram níveis mais elevados de citocinas que os eutróficos. Essas observações foram de encontro às nossas expectativas, representando um questionamento que, até o presente momento, não fomos capazes de explicar.

A produção de IL-13 nos animais desnutridos, que apresentavam níveis mais elevados que os eutróficos no período de 90 dias, sofreu modulação durante a fase crônica, chegando a níveis significativamente mais baixos que os eutróficos. Nesses últimos, a produção de IL-13 apresentou-se sem grandes oscilações, principalmente entre as fases intermediária e crônica da infecção, nas quais os níveis dessa citocina permaneceram praticamente constantes.

Diante dessas observações é possível especular que a redução dos níveis de IL-13 observados nos animais desnutridos, na fase crônica da esquistossomose, poderia alterar sua atividade fibrogênica, no processo de formação e deposição da matriz extracelular, dificultando, dessa maneira, o desenvolvimento do quadro de fibrose periportal no modelo murino desnutrido, como observado por Coutinho et al. (1997).

Agradecimentos

Agradecemos a Cláudia Lopes pela grande colaboração durante a realização desse trabalho, a Vlademir Melo pela assistência técnica e ao Biotério do CPqAM. Agradecemos, principalmente, à Virginia Lorena, Joelma Souza e à professora Vladia Costa, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), pela fundamental colaboração.

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.

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, p. 325-334, 1987.

ANDRADE, Z. A.; CHEEVER, A. W. The characterization of the murine model of schistosomal periportal fibrosis ("pipestem" fibrosis). International Journal of Experimental Medicine, Basel, v. 74, 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.

BARBOSA Jr., A. A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. Jornal Brasileiro de Patologia, Rio de Janeiro, v. 37, p. 197-200, 2001.

BERGMAN, I.; LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. Analytical Chemistry, Washington, v. 35, p. 1961-1965, 1963.

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.

CAPRON, M.; CAPRON, A. Effector functions of eosinophils in schistosomiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 87 (supl. 4), p. 167-170, 1992.

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

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. 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. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type-2-dominated inflammatory response. Journal of Clinical Investigation, Nova York, v. 104, n. 6, p. 777-785, 1999a.

CHIARAMONTE, M. G. et al. IL-13 is a key regulatory cytokine for Th2 cell-mediated pulmonary granuloma formation and IgE responses induced by *Schistosoma mansoni* eggs. Journal of Immunology, Baltimore, v. 162, p. 920-930, 1999b.

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. 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 for Parasitology, Nova York, v. 78, p. 337-342, 1997.

COUTINHO, E. M. et al. Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. Acta Tropica, Basel, v. 101, n. 1, p. 15-24, 2007.

COUTINHO, E. M. Malnutrition and Hepatic Fibrosis in Murine Schistosomiasis. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 99 (supl. 1), p. 85-92, 2004.

COUTINHO, E. M. Patobiologia da desnutrição nas doenças parasitárias. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 75, p. 63-76, 1980.

COUTINHO, E. M.; FREITAS, L. P. C. G.; ABATH, F. G. C. The influence of the regional basic diet from Northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 25, n. 1, p. 13-20, 1992.

COUTO, J. L. A. et al. Structural changes in the jejunal mucosa of mice infected with *Schistosoma mansoni*, fed low or high protein diets. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília v. 35, p. 601-607, 2002.

DOMINGUES, A. L. C.; BARRETO, V. S. T. Esquistossomose hepática. In: Matos, A. A; Dantas, W. Conferência de Hepatologia, São Paulo: Fundo Editorial Byk, 2001, p. 391-405.

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

FERREIRA, H. S. et al. A long-term intake of a protein hydrolysate seems to increase the risk of encephalopathy in mice infected with *Schistosoma mansoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 93, p.199-203, 1998.

FERREIRA, H. S. et al. Intestinal protein absorption in malnourished mice acute *Schistosoma mansoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 88, p. 581-587, 1993.

FERREIRA, H. S.; COUTINHO, E. M. Should nutrition be considered as a supplementary measure in schistosomiasis control? Annals of Tropical Medicine and Parasitology, Liverpool, v. 93, p. 437-447, 1999.

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

HAMAGUCHI, Y. et al. Interleukin 4 as an essential factor for in vitro clonal growth of murine connective tissue-type mast cells. Journal of Experimental Medicine, Nova York, v. 165, p. 268-273, 1987.

HENDERSON, G. S. et al. Two distinct pathological syndromes in male CBA/j inbred mice with chronic *Schistosoma mansoni* infections. American Journal of Pathology, Nova York, v. 142, p. 703-714, 1993.

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.

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.

JABARA, H. H. et al. Induction of interleukin-4-dependent IgE synthesis and interleukin- 5-dependent eosinophil differentiation by supernatants of a human helper T-cell clone. Journal of Clinical Immunology, Nova York, v. 8, p. 437-446, 1988.

JAMES, S. L.; COLLEY, D. G. Eosinophil mediated destruction of *Schistosoma mansoni* eggs. J. Reticuloendothel. Soc. v. 20, p. 359-374, 1976.

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

KATZ, A; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38-41, 2003.

MAGALHÃES FILHO, A.; COUTINHO, E. M. Lesões esplênicas iniciais na Esquistossomose mansônica humana. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 2, p. 251-259, 1960.

MOSMANN, T. R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. Immunology Today, Cambridge, v. 17, p. 138-146, 1996.

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, n. 4, p. 405-407, 2002.

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

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, Nova 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.

SCHNACK, F. J. et al. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (< 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 1205-1208, 2003.

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.

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

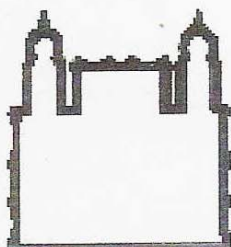
TEODÓSIO, N. R. et al. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. Archives Latinoamericanas de Nutrición, Caracas, v. 40, p. 533-547, 1990.

TSHIKUKA, J. G. et al. Relationship of childhood protein-energy malnutrition and parasite infectious in an urban African setting. Tropical Medicine and International Health, Oxford, v. 2, p. 374-382, 1997.

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

WYNN, T. A. IL-13 effector functions. Annual Review of Immunology, Palo Alto, v. 21, p. 425-56, 2003.

**Anexo A - Certificado de Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA-FIOCRUZ)**



**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.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Octavio Augusto França Presgrave', is written over a faint, circular official stamp.

**Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA
FIOCRUZ**