

Fundação Oswaldo Cruz  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães  
Mestrado em Saúde Pública



**ANDRÉIA FERREIRA DE BARROS**

---

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

---

Recife  
2008

**Andréia Ferreira de Barros**

Resposta imune humoral 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 obtenção do grau de  
Mestre em Ciências.

Orientadora: Eridan de Medeiros Coutinho  
Co-orientadora: Yara de Miranda Gomes

Recife  
2008

**Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães**

---

- B268r      Barros, Andréia Ferreira de.  
Resposta imune humoral e patologia hepática de camundongos desnutridos, infectados com *Schistosoma mansoni* / Andréia Ferreira de Barros. — Recife: A. F. de Barros, 2008.  
124 p. : il., tabs., grafs.
- Dissertação (mestrado em saúde pública) — Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2008.  
Orientadora: Eridan de Medeiros Coutinho.  
Co-orientadora: Yara de Miranda Gomes.
1. Esquistossomose mansoni – imunologia. 2. Imunoglobulinas - biossíntese. 3. Fígado - patologia. I. Coutinho, Eridan de Medeiros. II. Gomes, Yara de Miranda. III. Título.

---

CDU 616.995.122

**ANDRÉIA FERREIRA DE BARROS**

**Resposta imune humoral 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 obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em \_\_\_/ \_\_\_/ \_\_\_

**Banca examinadora**

---

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

---

Dra. Sheilla Andrade de Oliveira  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ

---

Dra. Vláudia Maria de Assis Costa  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Fábio Lopes de Melo  
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / FIOCRUZ

---

Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque  
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho:

A razão da minha existência, minha família  
aos meus pais, Cícera Barros e Valdemir Barros  
pelo amor, formação moral e pelo incentivo constante;

aos meus irmãos, Adriana Barros e Dayvson Barros,  
por serem sinônimos de amor e companheirismo;

ao meu noivo, Marcos Roberto,  
pela paciência, lealdade, dedicação e por seu amor;

e a todos os meus amigos,  
por serem sinônimos de dedicação, ajuda e incentivo constante;

à minha orientadora, Dra. Eridan Coutinho, pelo exemplo de profissional, pela  
dedicação e por ter me orientado desde a iniciação científica, oferecendo-me a  
oportunidade de crescer cientificamente.

**Eu posso voar muito mais alto que uma águia, porque vocês são o vento  
sob minha asas!**

Autor desconhecido

## **AGRADECIMENTOS**

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

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

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

Há 2 anos comecei... E agora apresento, com sentimento de alívio como há muito não sentia! Se o desafio foi enorme, as motivações foram grandiosas, somadas às espontâneas generosidades que fizeram possível a transformação de instantâneos momentos de angústia em uma estrada larga, margeada de frutos imensuráveis, repleta de muita esperança e cuja base foi a busca de saberes até alcançar o meu objetivo: a Dissertação.

Aprendi que pesquisa é algo difícil, porém surpreendente. Mas o mais importante foi aprender que o esforço vale a pena! E, por isso, serei sempre uma eterna aprendiz!

Confesso que não foi uma caminhada simples, principalmente pelas intercorrências pessoais de toda ordem, que me atropelaram. Esses percalços, longe de ofuscar o meu trajeto, aumentaram-lhe o brilho. E, em vez de me deterem, impulsionaram-me com mais força.

Eis que chegou o momento de expressar meus sinceros agradecimentos a todos que foram importantes, contribuindo direta ou indiretamente não só no desenvolvimento deste trabalho, mas para o meu crescimento pessoal e profissional.

Porque na vida, nada conquistamos sozinhos. Sempre precisamos de pessoas para alcançar os nossos objetivos!!! Muitas vezes um simples gesto pode contribuir para o nosso sucesso!

Bem sei que corro o risco de não dar conta deste “muitíssimo obrigada” como é merecido, porque será difícil exprimir a minha gratidão a esse movimento de energias e impulsos positivos para a realização desse sonho.

A todos que me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas em inesquecíveis ocasiões, o meu reconhecido e carinhoso muito obrigada!

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

*“Entrega teu caminho ao Senhor;  
confia Nele e Ele tudo fará.”*  
*(Salmo 37; v.5)*



---

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

---

## RESUMO

Esquistossomose mansônica e desnutrição são importantes problemas de saúde pública no Brasil e em outros países do mundo. Embora a má nutrição associada à esquistossomose venha sendo estudada, a literatura é escassa a respeito da resposta imune no hospedeiro desnutrido e infectado pelo *Schistosoma mansoni*. O objetivo do presente trabalho foi investigar o perfil da resposta imune humoral e a patologia hepática em camundongos C57BL/6 desnutridos e infectados pelo *S. mansoni*, comparando-os com camundongos eutróficos submetidos à mesma infecção. Foram estudadas, também, a morfologia hepática, a carga parasitária (parasitos e ovos) e a produção de tecido fibroso hepático. Os estudos histopatológicos e morfológicos revelaram granulomas pequenos e esparsos no parênquima hepático, com ausência de fibrose periportal no grupo desnutrido. Camundongos eutróficos apresentaram uma tendência a desenvolver granulomas maiores, como também desenvolver fibrose hepática periportal (40%). No grupo eutrófico, o peso médio do fígado foi maior, resultado este atribuído ao teor protéico do fígado desses animais, associado à inflamação granulomatosa provocada pela esquistossomose. A esplenomegalia foi relacionada à infecção. O grupo desnutrido apresentou menor quantidade de parasitos que o eutrófico. As curvas ponderais dos grupos desnutridos foram inferiores e estatisticamente significativas em comparação com os grupos eutróficos, guardando relação, sobretudo, com o tipo de dieta consumida. Quanto à produção de tecido fibroso no fígado, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos desnutrido e eutrófico. Os níveis das imunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE detectados no grupo desnutrido foram significativamente menores, quando comparados aos do grupo eutrófico, evidenciando os efeitos negativos da deficiência protéica crônica sobre a capacidade de formação de anticorpos pelo organismo do hospedeiro desnutrido.

Palavras- chaves: Esquistossomose mansônica, Imunoglobulinas e Patologia do fígado.

---

BARROS, Andréia Ferreira de Barros. **Humoral 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

Manson's schistosomiasis and undernutrition are important public health problems in Brazil and other countries in the world. Although the association between the two conditions has been studied in some published papers, there are quite a few reports on the immune response in undernourished infected hosts. The current investigation aimed to study the humoral immune response and the hepatic pathology in undernourished and well-nourished C57BL/6 inbred mice infected with *S. mansoni*. The gross and microscopic liver morphology, the parasite burden (number of parasites and eggs) and the production of fibrous tissue (collagen) in the liver were also studied. Liver histopathology showed small sparse circumoval granulomas in the hepatic parenchyma, but no periportal fibrosis was detected in undernourished mice. Well-nourished animals had larger granulomas and periportal fibrosis was seen in forty percent of the animals. In well-nourished mice the average liver weight reported as percentage of the body weight was higher than for undernourished animals and related to both the liver protein stores and granulomatous inflammation due to schistosomiasis. Spleen enlargement was due to schistosome infection. A smaller number of parasites developed in undernourished mice as compared to well-nourished ones. Undernourished and well-nourished mice showed diverging growth curves, values for the formers being significantly lower. So, growth curves were mainly affected by the type of ingested diet, schistosome infection having but a negligible influence on them. Significant differences in liver collagen formation were not detected between undernourished and well-nourished mice. However, the levels of IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 and IgE were significantly lower in the undernourished group as related to well-nourished controls. So, the negative effects of chronic protein deficiency on the ability of undernourished mice to produce antibodies against schistosome infection have been quite evident.

**Key words:** Schistosomiasis mansoni, immunoglobulin, hepatic pathology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Curvas ponderais de camundongos C57BL/6, desnutridos ou eutróficos, infectados ou não pelo <i>Schistosoma mansoni</i> .	44
<b>Figura 2</b>	Número de pares de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> coletados em camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos infectados.	45
<b>Figura 3</b>	Número de ovos encontrados no fígado total de camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados com <i>S. mansoni</i> .	46
<b>Figura 4</b>	Percentual de mortalidade espontânea observada entre camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados ou não com <i>S. mansoni</i> .	47
<b>Figura 5</b>	Relação percentual entre o peso corporal e os pesos do fígado e baço, respectivamente nos diversos grupos experimentais, em camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados ou não com <i>S. mansoni</i> .	48
<b>Figura 6</b>	Fibrose hepática periportal, em camundongo eutrófico com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> .	49
<b>Figura 7</b>	Fibrose hepática periportal, em camundongo eutrófico com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> .	49
<b>Figura 8</b>	Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido, com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> .	50
<b>Figura 9</b>	Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido, com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> .	51
<b>Figura 10</b>	Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido, com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> .	51
<b>Figura 11</b>	Secção de fígado de camundongo C57BL/6, desnutrido com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> .	52
<b>Figura 12</b>	Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido, com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> .	52
<b>Figura 13</b>	Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido, com 150 dias de infecção pelo <i>S. mansoni</i> .	53

<b>Figura 14</b>	Quantificação do colágeno (hidroxiprolina), em camundongos C57BL/6, desnutridos ou eutróficos infectados com <i>S. mansoni</i> .	54
<b>Figura 15</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) das proteínas do antígeno solúvel de ovo (SEA) corado pelo Coomassie blue.	56
<b>Figura 16</b>	Níveis de anticorpos anti-SEA (antígeno solúvel de ovo) determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados com <i>S. mansoni</i> .	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2, 2'- azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
BH	Belo Horizonte
BSA	Albumina sérica bovina
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
DBR	Dieta Básica Regional
DI	Desnutrido infectado
DNI	Desnutrido não infectado
DO	Densidade óptica
DP	Desvio padrão
EDTA	<i>Ethylene diamine tetracetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EI	Eutrófico infectado
ENI	Eutrófico não infectado
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HCL	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina - eosina
IFN- $\gamma$	Interferon gama
KOH	Hidróxido de Potássio
Nn	Densidade numérica

NUVILAB	Nuvital Nutrientes LTDA
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBSTw	Tampão salina fosfato com Tween 20
PM	Peso molecular
PE	Pernambuco
pH	Potencial hidrogeniônico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SEA	Antígeno solúvel de ovo
TA	Temperatura ambiente
Th	Linfócito T auxiliar
Th0	Linfócito T auxiliary tipo 0
Th1	Linfócito T auxiliary tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliary tipo 2
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
V	Volume dos granulomas
Vv	Densidade de volumétrica

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	14
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b>	15
2.1 Epidemiologia da esquistossomose	15
2.2 A doença	16
2.3 Modelo murino na esquistossomose experimental	18
2.4 Patologia geral e patogênese da esquistossomose mansônica	19
2.4.1 <i>Fibrose hepática</i>	20
2.5 Imunopatologia na esquistossomose	21
2.6 Desnutrição associada à esquistossomose mansonica	24
<b>3 JUSTIFICATIVA</b>	27
<b>4 PERGUNTA CONDUTORA</b>	28
<b>5 OBJETIVOS</b>	29
5.1 Objetivo Geral	29
5.2 Objetivos Específicos	29
<b>6 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	30
6.1 Animais	30
6.2 Infecção	30
6.3 Grupos experimentais	31
6.4 Dietas	31
6.5 Estado nutricional	32
6.6 Sacrifício dos animais	33
6.7 Estudo parasitológico	34
6.7.1 <i>Coleta e quantificação dos vermes</i>	34
6.7.2 <i>Contagem de ovos em amostras de fígado</i>	34
6.8 Estudo morfológico	35
6.8.1 <i>Estudo macroscópico</i>	35
6.8.2 <i>Estudo histopatológico</i>	35
6.9 Mensuração do colágeno hepático	36
6.9.1 <i>Estudo bioquímico</i>	36
6.9.2 <i>Estudo morfométrico</i>	37

6.10 Estudo imunológico	39
6.10.1 <i>Obtenção de antígeno solúvel de ovo (SEA)</i>	39
6.10.2 <i>Avaliação da pureza e integridade do antígeno</i>	40
6.10.3 <i>Obtenção do soro</i>	40
6.10.4 <i>Determinação dos isotípicos das imunoglobulinas G e E</i>	40
6.11 Análise estatística	42
<b>7 RESULTADOS</b>	43
7.1 Estado nutricional	43
7.2 Estudo parasitológico	45
7.2.1 <i>Número de parasitos</i>	45
7.2.2 <i>Quantidade de ovos no fígado</i>	45
7.3 Mortalidade proporcional	46
7.4 Estudo morfológico	47
7.4.1 <i>Dados macroscópicos</i>	47
7.4.2 <i>Estudo histopatológico</i>	48
7.5 Mensuração do colágeno hepático	53
7.5.1 <i>Quantificação bioquímica</i>	53
7.5.2 <i>Quantificação morfométrica</i>	54
7.6 Estudo imunológico	56
7.6.1 <i>Avaliação do perfil protéico do antígeno (SEA)</i>	56
7.6.2 <i>Produção das imunoglobulinas G e E</i>	56
<b>8 DISCUSSÃO</b>	58
<b>9 CONCLUSÕES</b>	66
<b>REFERENCIAS</b>	67
<b>APÊNDICE A</b>	83
<b>APÊNDICE B</b>	114
<b>ANEXO A</b>	124



## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica destaca-se, mundialmente, como uma das parasitoses mais importantes, em virtude da severidade com que suas complexas formas clínicas acometem o hospedeiro na fase crônica da infecção. Essa doença gera um grande problema de saúde pública (MOREL, 2000).

Vários são os co-fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento das formas clínicas da esquistossomose mansônica. Dentre eles, podemos citar carga parasitária, idade do hospedeiro, co-infecções, reinfecções e estado nutricional do hospedeiro (ANDRADE, 2005; SILVA et al., 2004).

Trabalhos experimentais de Coutinho et al. (1997, 2003, 2007) e Couto et al. (2002, 2007), dentre outros, têm ressaltado a importância da má-nutrição do hospedeiro, ao demonstrarem que camundongos desnutridos infectados pelo *Schistosoma mansoni* apresentam características histológicas e fisiopatológicas diferentes de camundongos eutróficos, submetidos às mesmas condições.

Embora o comportamento do modelo murino desnutrido, quando infectado pelo *S. mansoni*, seja conhecido (COUTINHO et al., 1997, 2003, 2007), a literatura é bastante escassa sobre o perfil da resposta imune nesses animais. Por isso, o foco do presente trabalho será estudar a resposta imune humoral, como também a morfologia hepática na fase crônica da doença, a carga parasitária (quantidade de parasitos e de ovos) e o estado nutricional dos animais. O estudo da resposta imune humoral, na fase crônica da esquistossomose em hospedeiros desnutridos, é importante para estabelecimento de futuras estratégias relacionadas ao diagnóstico e tratamento dessa parasitose em populações carentes de áreas endêmicas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Epidemiologia da esquistossomose

A relevância da esquistossomose como problema de saúde pública diz respeito à sua cronicidade, ampla distribuição geográfica e impacto na economia, pelas suas repercussões sobre a atividade produtiva da população infectada (RESENDES; SOUZA ; BARBOSA, 2005). A esquistossomose mansônica acomete mais de 200 milhões de indivíduos no mundo (BINA; PRATA, 2003), dos quais 20 milhões apresentam morbidade grave. Além disso, 15 mil mortes por ano são associadas às seqüelas da infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2002).

O Brasil, apesar dos esforços para seu controle, é o país da América do Sul onde se concentra o maior número de casos registrados, estimando-se que afete 4,6% da população, ou seja, aproximadamente 8.000.000 de indivíduos (KATZ; PEIXOTO, 2000; MASCARINI, 2003; PASSOS; AMARAL, 1998; RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005) sendo a doença encontrada em aproximadamente 19 estados, deixando cerca de 26 milhões de habitantes sob risco de contraí-la (GAZZINELLI et al., 2002).

No Nordeste, onde ocorre a maioria dos casos, a esquistossomose constitui-se como um dos principais problemas médicos, em virtude de suas variadas e graves formas de manifestações clínicas (RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005). Pernambuco é o estado mais afetado do Nordeste, sendo a doença considerada historicamente endêmica na zona rural (COUTINHO et al., 1997). A área endêmica do estado corresponde a 17,5% de sua área total, estimando-se que 62% da população esteja sob risco de se infectar (FAVRE et al., 2001). No censo demográfico de 2000, 60% da população desse estado residia em área endêmica, havendo focos numerosos em Itamaracá, Paulista e Porto de Galinhas (MELO, 2006). Segundo o DATASUS, ocorreram 762 casos confirmados, somente no ano de 2006 (BRASIL, 2007).

Casos humanos de infecção aguda têm sido detectados no litoral pernambucano, onde a doença está sendo introduzida, acometendo em sua maioria, indivíduos jovens

e adultos que visitam essa região e se expõem à infecção, sendo por isso chamada, por alguns autores, de “doença dos viajantes”, ou seja, de indivíduos que nunca foram expostos ao antígeno do parasito (BARBOSA et al., 1998; JESUS et al., 2002; REY, 2001; ROSS et al., 2002).

Assim, o perfil epidemiológico da esquistossomose em Pernambuco tem se modificado. Em áreas rurais, a doença se manifesta predominantemente sob a forma crônica intestinal, incidindo na classe social de baixa renda e tendo como vetor o *Biomphalaria straminea*. No litoral, ela é representada por casos agudos, ocorrendo em pessoas de classes média e alta, sendo o vetor o *Biomphalaria glabrata* (ARAÚJO et al., 2007; BARBOSA et al., 2000).

No Brasil, segundo Ferreira e Silva (2007), a mortalidade por esquistossomose foi reduzida em aproximadamente 62,9% entre os anos de 1980 a 2003. Embora essa redução possa ser um ótimo indicador do sucesso das ações de controle, dados da literatura mostram que a esquistossomose ainda continua sendo um grave problema de saúde pública (KATZ; ALMEIDA, 2003). Alguns estudos regionais mostram uma situação preocupante e ainda longe da erradicação do parasito ou da sua transmissão (CUTRIM; CHIEFFI; DE MORAES et al., 1998), ocasionando sérias conseqüências para o desenvolvimento sócio-econômico do país (FERREIRA; SILVA, 2007; RESENDES; SOUZA; BARBOSA, 2005).

## 2.2 A doença

A história natural da esquistossomose mansônica é dividida em fase aguda e crônica (REY, 2001). Na fase aguda, após a penetração das cercárias, o homem ou outro hospedeiro definitivo podem apresentar dermatite cercariana, provocada pela morte da maioria das cercarias que penetram em sua pele (COURA; AMARAL, 2004). Essa fase caracteriza-se clinicamente por febre elevada, mal estar geral, astenia, urticária, tosse seca, náuseas, vômitos, cefaléia, diarréia, dores musculares e desconforto abdominal (KATZ; ALMEIDA, 2003). Uma grande parte dos indivíduos

infectados, contudo, pode permanecer assintomática, dependendo de vários fatores e, principalmente, da intensidade da infecção (FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2002; PRATA, 1989, 1997). Nas áreas consideradas hiperendêmicas (taxas de infecções > 90%), a fase aguda da doença é rara; nas áreas não endêmicas, essa fase é mais comum e apresenta maior gravidade (BINA; PRATA, 1984; DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; GELFAND, 1964; LAMBERTUCI et al., 2000). Caso não seja diagnosticada e tratada corretamente, a doença pode evoluir para a fase crônica (KATZ; ALMEIDA, 2003).

A fase crônica pode ser dividida, em três formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (BINA, 1981), sendo a forma hepatoesplênica subdividida em compensada e descompensada (REY, 2001).

A forma intestinal é muito comum nas áreas endêmicas (90 a 95%), sendo mais frequentemente encontrada em pacientes cronicamente infectados que, geralmente, são assintomáticos. Na maioria dos casos, os sintomas permanecem discretos enquanto a carga parasitária for baixa e o acúmulo de ovos nos tecidos for pequeno. Nessa forma, as lesões hepáticas são moderadas e os sintomas tais como, perda de apetite, desconforto abdominal, astenia, cólicas intestinais, diarreia e disenteria são geralmente brandos e bastante variáveis, podendo persistir durante anos, pela dificuldade de diagnóstico, além de haver sintomas similares a outros tipos de doença (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; LAMBERTUCCI et al., 2000). À medida que os ovos são arrastados pela circulação e se alojam no fígado, a parasitose se agrava, levando o paciente a desenvolver a forma hepatointestinal. Embora a sintomatologia de ambas as formas seja semelhante, as lesões hepáticas na forma hepatointestinal são mais intensas que na intestinal, com baço e fígado discretamente palpáveis (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994; REY, 2001).

O quadro clínico pode evoluir e o paciente desenvolver a forma hepatoesplênica, que se caracteriza pelo comprometimento e aumento considerável do fígado e baço (DOMINGUES; DOMINGUES, 1994). A forma hepatoesplênica compensada é caracterizada por hepatoesplenomegalia com discreta hipertensão portal. Nessa fase, há pacientes que permanecem na sua forma clínica estacionária ou compensada conservando um bom estado geral, com sintomatologia de pequena intensidade ou

podendo evoluir para a forma mais grave da doença, a hepatoesplênica descompensada, a qual acomete uma porcentagem pequena da população infectada (cerca de 10%), dependendo da área de estudo (ANDRADE; VAN MARCK, 1984). A mortalidade por esquistossomose ocorre, principalmente, nessa forma, sendo suas principais manifestações clínicas ascite, circulação colateral e formação de varizes gastroesofágicas, decorrentes da hipertensão portal ocasionada pela fibrose hepática de Symmers. Quando essas varizes rompem, ocorrem hemorragias digestivas graves, muitas vezes fatais (BRASIL, 2006; PRATA, 1997; REY, 2001).

A transmissão dessa doença ocorre quando os ovos, eliminados com as fezes do hospedeiro, entram em contato com coleções hídricas e, passando a ser estimulados por luz intensa, temperatura adequada e oxigenação da água, eclodem liberando do seu interior o miracídio, uma larva ciliada de vida livre. Estando presente nessas coleções hídricas moluscos da espécie *Biomphalaria glabata*, *Biomphalaria straminea* ou *Biomphalaria tenagophia*, que são hospedeiros intermediários do *S. mansoni*, os miracídios, por quimiotaxia, penetram em suas partes moles auxiliados por enzimas proteolíticas (MELO; COELHO, 2005). Dentro do molusco, os miracídios transformam-se em esporocisto primário e depois em secundário e, utilizando-se dos nutrientes da glândula digestiva desse hospedeiro intermediário, passam a sofrer modificações anatômicas, transformando-se em cercárias. Quando os moluscos são expostos a condições adequadas de luz e temperatura da água, essas cercárias são liberadas (REY, 2001; WARREN, 1966) no meio aquático, deslocando-se ativamente, podendo penetrar em várias espécies de animais que estejam em contato com esse meio desenvolvendo-se, porém, no hospedeiro susceptível, fechando, assim, o ciclo biológico da doença.

### **2.3 Modelo murino na esquistossomose experimental**

Moore et al. (1949) e Stirewalt et al. (1951), investigando a susceptibilidade de vários mamíferos infectados com *S. mansoni*, verificaram que os camundongos

desenvolvem vermes adultos sexualmente maduros e eliminam ovos viáveis do parasito nas fezes. Tendo em vista que estes animais são hospedeiros de baixo custo e de fácil manuseio e manutenção em laboratório, tornaram-se os hospedeiros definitivos mais utilizados em estudos experimentais (CAPRON et al., 1982).

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

Do ponto de vista da patologia, os camundongos apresentam várias semelhanças com a doença humana, inclusive pelo desenvolvimento de lesão hepática semelhante à fibrose periportal do homem (ANDRADE; CHEEVER, 1993; WARREN, 1966).

## **2.4 Patologia geral e patogênese da esquistossomose mansônica**

Na esquistossomose, a patologia da infecção é predominantemente causada pela reação do hospedeiro aos ovos do parasito os quais, depositados pelas fêmeas nos vasos do intestino, são arrastados pela corrente sangüínea como êmbolos e ficam retidos, principalmente, nos finos ramos venosos dos espaços porta do fígado. As secreções eliminadas pelos miracídios funcionam como potente estímulo fibrogênico, agindo diretamente sobre as células que secretam a matriz extracelular (MEC) (ANDRADE, 1991). Começa, assim, a formação dos granulomas esquistossomóticos em torno dos ovos, na tentativa de isolá-los e destruí-los. Todavia, a simultaneidade do processo inflamatório em torno de muitos ovos e a contínua produção dos mesmos leva os nódulos fibróticos antigos a confluírem, formando extensas áreas cicatriciais (ANDRADE, 2005; REY, 2001).

Os granulomas que se acumulam em torno dos ramos intra-hepáticos da veia porta conduzem ao desenvolvimento de um manguito fibroso nessa região, dando origem à fibrose periportal ou “fibrose em haste de cachimbo de barro” (*clay pipestem fibrosis*), descrita pela primeira vez por Symmers em 1904. O acúmulo de granulomas

acompanhado do desenvolvimento do tecido fibroso cicatricial leva ao bloqueio da circulação pré-sinusoidal, que conduz à hipertensão porta, à esplenomegalia, ascite e circulação colateral. O tamanho do baço é aumentado, em parte pela congestão venosa do ramo esplênico e também pela hiperplasia das células do sistema macrofágico-linfocitário, com diferenciação e produção de anticorpos (MAGALHÃES - FILHO; COUTINHO, 1961; REY, 2001).

A fibrose hepática periportal caracteriza, no homem, a esquistossomose em sua forma grave hepatoesplênica, consistindo, macroscopicamente, em processo de fibrose estelar generalizada, acompanhada de graus variáveis de neoformação e dilatação vascular nesse tecido fibroso (BOGLIOLO, 1957).

#### 2. 4.1 *Fibrose hepática*

O tecido conjuntivo hepático, além de células, é formado pela MEC. Essa matriz tem função de preenchimento dos espaços entre as células, de condução dos vasos sanguíneos e linfáticos, além de funções de sustentação e de integração. Os componentes da matriz incluem moléculas que são fundamentais para ancoragem, estimulação e movimentação das células. Na MEC também transitam fatores de crescimento, citocinas, hormônios e moléculas de adesão (BEDOSSA; PARADIS, 2003).

Existem vários tipos celulares que compõem o tecido conjuntivo, mas as células fundamentais são os fibroblastos e, no fígado, as evidências apontam que as células estreladas, ricas em gorduras e vitamina A, também conhecidas como células de Ito e situadas nos espaços de Disse, têm papel importante nesse processo (BARBOSA JR.; PFEIFER; ANDRADE, 1993; GABELE; BRENNER; RIPPE, 2003). Estas células, quando, estimuladas por citocinas fibrogênicas, se desfazem de seus depósitos de gordura e se diferenciam em miofibroblastos e fibroblastos (ANDRADE, 1998).

As células que secretam a MEC são também capazes de secretar enzimas que promovem a degradação da mesma. Estas enzimas, as metaloproteinases, se

encarregam de clivar as moléculas de colágeno, proteoglicanos e elastina (ANDRADE, 1992). Quando alguma causa continuada gera o impedimento da ação degradativa dessas enzimas sobre o excesso da MEC que está sendo formada, ocorre um acúmulo progressivo de colágeno ao longo do tempo. Segundo Andrade (2006), esse impedimento é gerado pelos inibidores tissulares de metaloproteinases (TIMPs). Portanto, na MEC há fatores que influenciam seu aumento (fibrogênese) e outros que conduzem em sentido contrário quando há excesso da mesma (fibrólise) (ANDRADE, 2005).

## 2.5 Imunopatologia na esquistossomose

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

As secreções liberadas pelos ovos do *S. mansoni* são provenientes dos miracídios e compostas por enzimas proteolíticas e complexas frações glicoprotéicas, cujos componentes induzem o aparecimento de anticorpos e de células imunes sensibilizadas. As secreções líticas decorrentes dos ovos são denominadas de SEA (antígeno ovular solúvel) e são responsáveis pela proliferação fibroblástica "in vitro", podendo, também, estimular linfócitos T sensibilizados (ANDRADE, 1999).

O papel biológico das imunoglobulinas na infecção esquistossomótica é bastante complexo e continua sendo estudado. Existem evidências de que as classes e subclasses de anticorpos anti-*Schistosoma* variam com a idade do indivíduo, estado nutricional, intensidade e tempo de infecção, como também com a presença de reinfecções (DUNNE et al., 1998; JASSIM; HASSAN; CATTY, 1987; OLIVEIRA et al., 2004). No início da infecção pelo *S. mansoni*, tanto em humanos quanto em hospedeiros experimentais eutróficos, ocorre a ativação do sistema complemento, inicialmente através da via alternativa e produção de anticorpos específicos das classes



IgE, IgG (IgG1, IgG2, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgG4), IgM, IgA (BOCTOR; PETER, 1990; CAPRON et al., 1982). Na fase crônica da esquistossomose, são descritos altos títulos dos anticorpos IgG1, IgE e IgG4 (AKDIS et al., 1997; SNAPPER; PAUL, 1987).

A alteração mais importante na imunopatologia da esquistossomose é a reação inflamatória granulomatosa gerada em torno dos ovos depositados pelos parasitos nos tecidos (PEARCE; MACDONALD, 2002; WARREN, 1966). Os granulomas esquistossomóticos representam reações de hipersensibilidade do tipo tardio e caracterizam-se como estruturas focais, pequenas e isoladas, sendo os granulomas mais antigos compostos, principalmente, por fibras colágenas, macrófagos, eosinófilos, linfócitos e plasmócitos (PEARCE; MACDONALD, 2002; WEINSTOCK; BOROS, 1983).

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

A modulação do granuloma é, primariamente, decorrente da resposta imune dependente de células T auxiliares (CD4<sup>+</sup>), que produzem linfocinas dos padrões Th1 e Th2. Na esquistossomose murina, trabalhos têm associado o início da inflamação granulomatosa a uma resposta Th1 de curta duração. Todavia, outros estudos na literatura apontam que as alterações patológicas na esquistossomose são decorrentes de citocinas do tipo Th2 (HOFFMAN; CHEEVER; WYNN, 2000; PEARCE et al., 1992; WYNN et al., 1993). De fato, esta dicotomia Th1/Th2 foi primeiro descrita em estudos com clones de células TCD4<sup>+</sup> murinas, as quais são diferenciadas a depender das citocinas secretadas. O perfil Th1, presente no início da infecção, estimula os mecanismos dependentes de fagócitos e de citotoxicidade celular, que são chamados “pró-inflamatórios” e as suas principais citocinas são IL-2, TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (ABATH et al., 2006). O perfil Th2 tem início com a oviposição e, ao contrário do perfil Th1, estimula a resposta imune humoral, tendo como principais citocinas IL-4, IL-13 e IL-10 (HILKENS et al., 1997; SPELLBERG; EDWARDS JR., 2001).

Tem sido amplamente demonstrado que as interleucinas podem influenciar na seleção de classes e subclasses de imunoglobulinas, produzidas por células B (FINKLEMAN et al., 1990). A citocina IL-4, secretada pelas células Th2, induz as células

B a secretarem IgG1 (SNAPPER; PAUL, 1987) e inibe a secreção de IgG2a, enquanto a IFN- $\gamma$ , citocina do tipo 1, aumenta a produção de IgG2a, mas inibe IgG1 (STEVENS et al., 1988). A produção dos anticorpos IgE e IgG4 depende, inicialmente, de IL-4 ou IL-13 produzidos por células Th2 (AKDIS et al., 1997). A IgG4, por sua vez, compete com a IgE específica na ligação a antígenos do verme nos sítios de ligação de mastócitos, bloqueando, assim, a sua degranulação (STANWORTH; SMITH, 1973). O grau de resistência frente à infecção depende, em parte, do balanço entre dois efeitos antagônicos: a ação protetora de IgE e o efeito bloqueador de IgG4. Tem sido demonstrado na literatura que IgG4 age como um anticorpo bloqueador para a função protetora mediada por IgE (RIHET et al., 1992).

A síntese exacerbada de IgG foi observada em pacientes esquistossomóticos crônicos e estaria associada ao desenvolvimento da fibrose periportal esquistossomótica (GHANEM et al., 1987). Com efeito, depósitos de IgG foram observados nos espaços de Disse, no fígado de pacientes com fibrose de Symmers avançada (GRIMAUD; BOROJEVIC; BRADRAWY, 1977).

Silva et al. (2004) verificaram que, na produção de anticorpos em camundongos BALB/c infectados com *S. mansoni*, ocorre predominância do isotipo IgG1 para ambos os pontos de tempo de infecção estudados (20 e 40 semanas). Todavia, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nos níveis de anticorpos SEA-específicos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE entre camundongos com granulomas isolados e camundongos portadores de fibrose hepática periportal.

Oliveira et al. (2004), trabalhando com camundongos “outbred” desnutridos e infectados pelo *S. mansoni*, observaram que a resposta imune humoral estava preservada. Os animais foram capazes de responder aos estímulos gerados pelos antígenos dos ovos dos parasitos, porém apresentaram níveis inferiores de IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, quando comparados a animais eutróficos, também infectados.

Assim as interações entre citocinas e anticorpos em resposta à presença do *S. mansoni* demonstram a importância das respostas celular e humoral na definição dos mecanismos de resistência e susceptibilidade à infecção e em relação à patologia causada por esse helminto.

## 2.6 Desnutrição associada à esquistossomose mansonica

A importância de um adequado estado nutricional para a saúde do hospedeiro é consenso universal. O Projeto de Controle de Doenças Prioritárias nos Países em Desenvolvimento estima que 32% do número global de doenças em geral poderiam ser evitadas pelo controle da má nutrição. A desnutrição tem contribuído substancialmente para aumentar as taxas de morbidade e mortalidade em países de baixa renda (BLACK et al., 2008).

Geralmente as áreas endêmicas de esquistossomose se sobrepõem às de desnutrição (COUTINHO et al., 1997). Levantamentos clínico-epidemiológicos realizados por Coutinho et al. (1972) em populações de áreas endêmicas de esquistossomose no Nordeste do Brasil, e por outros autores, em outras regiões endêmicas do mundo, permitiram correlacionar a doença ao estado nutricional do indivíduo, mostrando a importância do parasitismo no agravamento da má-nutrição. Do ponto de vista clínico, antropométrico e anátomo-patológico, associações entre o estado nutricional do hospedeiro e certas manifestações da esquistossomose, têm sido relatadas (COUTINHO, 1980, 2004; COUTINHO et al., 1997; PARRAGA et al., 1996), tanto no homem como em hospedeiros experimentais (CHEEVER et al., 2002; COUTINHO; FREITAS; ABATH., 1992; COUTINHO et al.,1997), particularmente na forma grave hepatoesplênica da doença (COUTINHO et al., 1972, 1997).

As repercussões da esquistossomose sobre o estado nutricional e vice-versa vêm sendo estudadas em várias publicações (CHIEFFI, 1992; COUTINHO et al., 1997, 2003, 2007; COUTINHO, 2004; Mc GARVEY et al., 1993; PARRAGA et al., 1996; STEPHENSON, 1993, 1994), embora em algumas delas essa interrelação não tenha sido encontrada (JUSOT; SIMARRO; MUYNCK, 1996; PROIETTI et al., 1992). Resultados às vezes conflitantes publicados na literatura correm por conta de diferenças na metodologia empregada, na utilização de modelos experimentais diferentes e na observação de pacientes com distintas formas clínicas. A continuação desses estudos é importante e recomendável, possibilitando assim, uma melhor compreensão da doença.

Em trabalhos experimentais, Coutinho et al. (1997, 2003, 2007) têm demonstrado que o estado nutricional pode contribuir para alterar o quadro da fibrose esquistossomótica na fase crônica da doença. Através da realização de inquéritos de consumo alimentar em diferentes áreas endêmicas de Pernambuco, foi possível caracterizar uma Dieta Básica Regional (DBR). Essa dieta, composta de quatro tipos fundamentais de alimentos — feijão mulatinho, farinha de mandioca, batata doce roxa, carne de charque (carne seca) — quando administrada a camundongos (COUTINHO; FREITAS; ABATH, 1992) e ratos (TEODÓSIO et al., 1990), consegue induzir a forma marasmática da desnutrição protéico-calórica, semelhante ao que acontece no homem. Segundo a Organização Mundial de Saúde (1973), a desnutrição protéico-calórica é definida como uma condição patológica relacionada com a perda, em várias proporções, de proteínas e calorias.

Experimentos realizados utilizando camundongos infectados com *S. mansoni* por 16 semanas e mantidos nessa dieta multideficiente, não conseguiram reproduzir a fibrose hepática periportal, diferentemente do que ocorreu com camundongos eutróficos, submetidos às mesmas condições (COUTINHO et al., 1997). A mudança de uma dieta deficiente para outra balanceada, também não foi capaz de induzir a lesão no modelo murino desnutrido, assim como a troca da dieta balanceada, por uma deficiente não suprimiu a lesão no modelo murino eutrófico (COUTINHO et al., 2003). Camundongos “outbred” desnutridos, submetidos a uma única ou repetidas infecções com *S. mansoni*, também não foram capazes de desenvolver a fibrose periportal, diferentemente dos eutróficos, onde a lesão apareceu em aproximadamente 40% dos animais (COUTINHO et al., 2007).

Assim, dentre os fatores que influem no desenvolvimento da fibrose periportal (fibrose *pipestem* ou de Symmers), expressão mais grave da patologia hepática na esquistossomose crônica, o fator desnutrição parece ter participação importante. A má-nutrição modifica os mecanismos de defesa do organismo, pois compromete os órgãos hematopoiéticos e linfóides responsáveis pela produção, manutenção e função das células que medeiam esses processos (CHANDRA, 1991). Sendo considerada como um determinante crítico da resposta imune (MEIRA, 1995), seria causa de reações

imunológicas deficientes, podendo estar relacionada com a inibição do desenvolvimento da fibrose “pipestem” do camundongo desnutrido (COUTINHO et al., 1997).

### 3 JUSTIFICATIVA

Embora os fatores imunológicos envolvidos na infecção esquistossomótica estejam sendo bastante estudados nos últimos anos, tanto em seres humanos quanto em hospedeiros experimentais, são ainda escassas as referências na literatura sobre o perfil imunológico do hospedeiro desnutrido esquistossomótico. Estudos mais acurados sobre a imunopatologia do hospedeiro desnutrido infectado pelo *S. mansoni* são necessários, visto que comumente as áreas de desnutrição humana se sobrepõem às áreas endêmicas de esquistossomose mansônica.

Neste contexto, o estudo da resposta imune humoral e das alterações da morfologia hepática na fase crônica da esquistossomose, no modelo experimental murino desnutrido, assume importância como base para investigações posteriores visando o estabelecimento de novas estratégias de diagnóstico, prevenção e tratamento da parasitose em populações humanas de regiões endêmicas.

#### **4 PERGUNTA CONDUTORA**

Existem diferenças entre hospedeiros desnutridos e eutróficos quanto à resposta imune humoral e morfologia hepática, na fase crônica da infecção pelo *S. mansoni* ?

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Geral

Estudar a resposta imune humoral e a morfologia hepática na fase crônica da esquistossomose mansônica, em camundongos C57BL/6 desnutridos e em eutróficos, infectados com *S. mansoni*.

### 5.2 Específicos

- ❧ Identificar a produção dos isotipos de anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e da IgE.
- ❧ Avaliar, através de curvas poderais, o desenvolvimento da desnutrição induzida pela dieta básica regional (DBR).
- ❧ Estudar a morfologia hepática da esquistossomose mansônica.
- ❧ Quantificar, morfométrica e bioquimicamente, a produção de colágeno hepático.
- ❧ Determinar a intensidade da infecção pelo *S. mansoni*, através da contagem dos vermes e de ovos no fígado.



## 6. MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.1 Animais

Camundongos machos, isogênicos, da linhagem C57BL/6, recém desmamados (21 dias), pesando entre 10 a 15g, foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério Experimental da FIOCRUZ-Recife (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM), sob condições padronizadas de temperatura (entre 21 e 22°C) e luminosidade (ciclos de claro/escuro de 12 em 12 horas) e umidade entre 45 a 55%. Os animais foram oriundos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz / MS (Rio de Janeiro). A utilização desses animais no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - FIOCRUZ), sob licença n°L 0028/07, cujo certificado encontra-se como anexo A.

### 6.2 Infecção

Os camundongos foram infectados individualmente com 30 cercárias de *S. mansoni* (cepa LE - Belo Horizonte), oriundas de moluscos *Biomphalaria glabrata* criados no Laboratório de Malacologia do CPqAM - FIOCRUZ. A infecção foi realizada por via percutânea 30 dias após a administração das dietas. Após 60 dias de infecção, todos os animais foram submetidos a exame parasitológico (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934), para comprovar a eficácia da infecção.

### 6.3 Grupos experimentais

Foram formados os seguintes grupos de camundongos: desnutridos infectados (n=35), eutróficos infectados (n=35), desnutridos não infectados (n=15) e eutróficos não infectados (n=15).

Os camundongos dos grupos infectados foram utilizados da seguinte forma: 25 desnutridos e 25 eutróficos foram usados para estudo imunológico. Os vinte camundongos restantes foram divididos em um grupo desnutrido (n=10) e outro eutrófico (n=10), que foram utilizados nos estudos parasitológico, bioquímico, morfométrico, histológico e nutricional. Os grupos desnutrido (n=15) e eutrófico (n=15) não infectados foram utilizados, apenas, como controles para os estudos imunológico, morfológico macroscópico e avaliação do estado nutricional.

### 6.4 Dietas

A desnutrição foi induzida pela administração da dieta básica regional (DBR) essencialmente hipoprotéica (Tabela 1), contendo aproximadamente 7% de proteína (COUTINHO et al., 1997). Os animais eutróficos foram alimentados com Nuvilab, dieta comercial balanceada (Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo, Paraná, Brazil), contendo 22% de proteína. As dietas foram administradas aos animais "ad libitum", em forma de "pellets" (biscoitos).

Tabela 1: COMPOSIÇÃO PERCENTUAL DAS DIETAS (\*)

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

(\*) COUTINHO, E.M. et al., 1997.

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

## 6.5 Estado nutricional

A avaliação do estado nutricional foi realizada através das curvas ponderais obtidas pela determinação semanal da massa corpórea dos camundongos, em balança eletrônica (Petit Balance, modelo mk500-C). Diariamente foram observados o comportamento e aspecto clínico dos animais. Este modo de avaliação simplificada do estado nutricional justifica-se pelo fato dessas dietas terem sido estudadas em trabalhos anteriores, sendo já bastante conhecidas sua composição, preparo e repercussões clínicas e fisiopatológicas (COUTINHO; FREITAS; ABATH, 1992; TEODÓSIO et al., 1990). A mortalidade espontânea dos animais foi registrada a fim de se obter, no final do experimento, a taxa de mortalidade em relação à infecção e ao estado nutricional.

## 6.6 Sacrifício dos Animais

Todos os camundongos foram sacrificados com 180 dias de dieta e 150 de infecção. Exceção foi feita para os camundongos albinos Swiss (que não participaram dos grupos experimentais), sacrificados com 60 dias de infecção e usados, apenas, para obtenção do antígeno solúvel de ovo (SEA). Todos os camundongos do projeto, destinados aos estudos parasitológico, morfológico, bioquímico, morfométrico e imunológico, foram anestesiados por via intraperitoneal com Ketamina (115 mg/Kg) associada à Xilasina (10 mg/Kg), antes do sacrifício. O efeito do anestésico foi avaliado segundo as normas da CEUA-FIOCRUZ. O monitoramento do efeito positivo do anestésico foi realizado pela ausência dos reflexos digital e caudal dos animais.

Os procedimentos efetuados após o sacrifício foram: perfusão do sistema venoso portal, (para coleta e quantificação dos vermes), retirada e pesagem do fígado e baço. Posteriormente, o fígado foi seccionado em três partes: do lobo maior foram retirados um fragmento para histologia (fixado em Bouin) e outro para dosagem de hidroxiprolina (fixado em formol 10%). O restante do fígado foi congelado para contagem de ovos (CHEEVER, 1970). Nos animais destinados à obtenção de soro (estudo imunológico), foi feita apenas a sangria total, por secção do plexo axilar; e no grupo de animais utilizados para obtenção do SEA (GAZZINELLI et al., 1983) apenas o fígado foi retirado. Os camundongos mortos foram congelados e posteriormente recolhidos para serem incinerados, conforme as normas de Biossegurança.

## 6.7 Estudo parasitológico

### 6.7.1 Coleta e quantificação dos vermes

Os camundongos foram perfundidos segundo a técnica de Duvall e De Witt (1967), da seguinte maneira: foi feita, longitudinalmente, uma incisão próxima aos órgãos genitais, com o auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas, indo até a caixa torácica; as vísceras foram expostas e a veia porta seccionada. Foi introduzida uma agulha no ventrículo esquerdo e injetada, através da artéria aorta, uma solução de perfusão composta de 8,5g Cloreto de Sódio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), mais 15g de Citrato de Sódio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ), completando-se com quantidade suficiente de água destilada para 1000mL. Os vermes recuperados foram, inicialmente, acondicionados em cálice de sedimentação, posteriormente separados de acordo com o sexo e quantificados.

### 6.7.2 Contagem de ovos em amostras de fígado

O número total de ovos no fígado foi obtido pela técnica de Cheever (1970), conforme os seguintes procedimentos: (1) fragmentos de fígado de cada camundongo foram colocados em tubos de ensaio individualmente identificados, contendo 60mL de solução de hidróxido de potássio a 4% (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) e acondicionados em estufa de 37°C (Fanem LTDA, modelo 002CD) durante 3h; (2) Após digestão dos fragmentos, obteve-se uma solução de onde foi retirada uma amostra de 1000µL que foi distribuída em câmara de contagem de "Sedgewick Rafter" (Graticules Limited, modelo S50, Tonobridge, England). Nessa amostra foram contados os ovos encontrados com o auxílio de um microscópio ótico (LEICA, modelo Leitz Laborlux, Nussloch, Germany) com objetiva de 10x. A quantidade de ovos presentes nesses

1000 $\mu$ L foi extrapolada para a quantidade total da solução (60mL), objetivando-se obter o número de ovos no fígado total.

## 6.8 Estudo morfológico

### 6.8.1 *Estudo macroscópico*

O fígado e o baço dos camundongos, removidos e pesados, foram examinados macroscopicamente. Os valores obtidos na pesagem serviram para o cálculo da relação percentual entre o peso corporal e os pesos do fígado e baço, respectivamente nos diversos grupos.

### 6.8.2 *Estudo histopatológico*

O fragmento de fígado destinado ao estudo histológico foi fixado em Bouin, com tempo máximo de fixação de seis horas. Depois da fixação, as amostras de cada animal foram lavadas várias vezes em etanol 70% para remoção do ácido pícrico. Essas amostras foram colocadas, individualmente, em cápsulas histológicas, identificadas e desidratadas em cinco banhos de etanol de concentração crescente, na seguinte ordem: etanol 70%, 80%, 90% e dois banhos de 100% (CAAL, São Paulo, SP), em um processador automático de tecidos. Em seguida, os fragmentos foram diafanizados em dois banhos de xilol (CAAL, São Paulo, SP) e inseridos em dois de parafina histológica a 60°C, sendo, ao final, incluídos em parafina, em forma de blocos para microtomia. Os blocos foram cortados com espessura de 5 $\mu$ m em micrótomo rotativo de parafina (LEICA, modelo RM 2125RT, Nussloch, Germany) e os cortes obtidos, corados pela hematoxilina (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) e eosina (Kanto Chemical CO, Inc) para

análise histopatológica; e pelo picrossirius vermelho (Aldrich Chemical Company, Inc), para quantificação do tecido colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLOS; BRENTANI, 1979) e mensuração dos granulomas esquistossomóticos.

## 6.9 Mensuração do colágeno hepático

### 6.9.1 *Estudo bioquímico*

Amostras de fígado, obtidas do lobo maior, pesando entre 100 e 200mg, fixadas em formol a 10%, foram usadas para determinação do colágeno como hidroxiprolina (BERGMAN; LOXLEY, 1963), de acordo com os procedimentos que se seguem: (1) hidrólise: os fragmentos de fígado foram individualmente colocados em tubos de ensaio contendo 5mL de ácido clorídrico (ISO FAR, Rio de Janeiro-RJ) a 6N e incubados a uma temperatura de 110°C em estufa, por 18 horas. Após esse tempo, foram acrescentados 5mL de água destilada às amostras digeridas e, em seguida, foram filtradas; (2) neutralização: obteve-se 2mL de cada amostra filtrada, sendo adicionada a essa alíquota uma gota de fenolftaleína (3,3-bis (4-hydroxyphenyl)-1(3H)-isobenzofuranone) - (SIGMA, St. Louis, MO, USA) a 1%; (3) a cada 2mL do filtrado, acrescentou-se 600µL de solução de hidróxido de sódio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) a 10N; em seguida, adicionou-se 400µL de ácido clorídrico (ISO FAR, Rio de Janeiro, RJ) a 3N e ajustou-se o volume final de cada amostra para 4mL; (4) coloração: foram preparadas quatro amostras de 50, 100, 150 e 200 microlitros de hidroxiprolina (trans-4-HYDROXY-L-PROLINE; SIGMA, St. Louis, MO, USA) a 0,1mM, respectivamente, denominadas de padrão, as quais, a partir desse instante, acompanharam todas as etapas da técnica; (5) de cada amostra neutralizada, obteve-se 200µL, acrescentou-se a cada uma (inclusive ao padrão) 400µL de álcool isopropanol (CAAL, São Paulo, SP) e, posteriormente, foram as mesmas oxidadas com 200µL de solução "A" [N-Chloro-p-toluene-sulfonamide sodium salt, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA] + tampão

citrato acetato) por 4 minutos; (6) foram acrescentados, a cada amostra, 2,5mL da solução "B" (reagente de Erlich [p-Dimethylamino-Benzaldehyde, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA] + ácido perclórico a 60%) + álcool isopropanol (CAAL, São Paulo, SP). (7) As amostras foram deixadas em banho-maria a 60°C, por 25 minutos; (8) Ao final, foram esfriadas e lidas em espectrofotômetro automático (Pharmacia, modelo Ultrospec 3000), em densidade óptica de 558nm. Os resultados da leitura foram corrigidos para intensidade da infecção, dividindo-se a hidroxiprolina hepática total pelo número de ovos de *S. mansoni* no fígado (CHEEVER et al., 1987).

#### 6.9.2 Estudo morfológico

Para esse estudo, dez campos microscópicos por animal foram obtidos aleatoriamente, utilizando-se objetiva de 10x. Foram analisados cortes histológicos de 10 animais dos dois grupos infectados, corados pelo picrosírius vermelho, para mensurar o percentual de tecido fibroso (%), o volume dos granulomas (V) encontrados e as densidades volumétrica (Vv) e numérica (Nn) dos mesmos. A morfometria foi realizada com o auxílio do Sistema de Processamento de Análise de Imagem LEICA QWIN, versão 2.6 MC (Leica Cambridge, Cambridge – England), composto de um microcomputador com o programa de morfometria acima citado e de um microscópio óptico binocular, contendo uma câmara de captura digital (LEICA JVC, modelo TK - C 1380, Pine Brook, NJ, USA). Para obtenção do percentual de tecido fibroso, o tecido colágeno, corado pelo picrosírius em vermelho, foi marcado e quantificado com o auxílio do programa Qwin, obtendo-se, também, a média percentual e erro padrão dos valores mensurados.

Foi medido o diâmetro dos granulomas que continham ovo ou vestígio de casca, encontrados em 10 campos microscópicos aleatórios. Atribuindo-se aos granulomas uma forma esférica, os raios obtidos a partir dos seus diâmetros foram aplicados à fórmula para o cálculo do volume da esfera, obtendo-se, assim, o volume dos granulomas.



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

V = Volume do granuloma

R = Raio da esfera

$\pi = 3,14$

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

Vv = densidade volumétrica do granuloma

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

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

$$Nn = 0,77 \times \sqrt{\frac{N^{1,5}}{Vv^{0,5}}}$$

Nn = densidade numérica dos granulomas

0,77 = constante

N = número de granulomas

Vv = densidade volumétrica dos granulomas

## 6.10 Estudo imunológico

### 6.10.1 Obtenção de antígeno solúvel de ovo (SEA)

O antígeno solúvel de ovo (SEA), obtido como descrito por Gazzinelli et al. (1983), foi preparado no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do CPqAM/ FIOCRUZ. Para sua obtenção, camundongos albinos Swiss foram infectados por via percutânea com aproximadamente 100 cercárias de *S.mansoni*, e perfundidos para retirada dos vermes após 60 dias de infecção. Os fígados foram retirados, fragmentados, embebidos em solução de salina a 1,7% por 24h a 4°C e, posteriormente, colocados em banho-maria por 2h, a 37°C. Terminado esse tempo, os fígados passaram por um processo de trituração (em liquidificador comum) por 5 min e a suspensão formada foi filtrada uma vez em malha de 180µm e uma segunda vez em malha de 130µm. O material filtrado foi distribuído em cálices de sedimentação e decantado durante 2h. O sedimento, resultante da decantação, foi depositado em tubos Falcon de 50mL, submetido a cinco centrifugações 200 x g (Centrífuga Beckman Instruments, modelo TJ-6R) de 5min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 10mL de salina a 1,7%. O sedimento foi macerado manualmente com bastão de vidro, na presença de inibidor de protease (EDTA 1mM em metanol, PMSF 1Mm), resfriado e ultrassonicado (Processador Ultrassônico 500 watts- Cole Parmen, modelo 501) com três ciclos de 20 pulsos (sendo cada pulso de 60s, a uma potência de 25w). Após essa etapa, o material foi ultracentrifugado a  $10^4$  x g por 10 min a 4°C e o sobrenadante submetido a nova ultracentrifugação a  $10^5$  x g por 1h, a 4°C (Ultracentrífuga Beckman Coulter, modelo Optima LE-80K, Palo Alto, Califórnia). A técnica foi finalizada com a diálise do sobrenadante, utilizando-se membrana de celulose com capacidade de reter proteínas de peso molecular a partir de 12.000 kDa, para completa retirada dos sais presentes no antígeno.

### 6.10.2 Avaliação da pureza e integridade do antígeno

O antígeno protéico solúvel de ovo (SEA) foi dosado através do método de Bradford (1976), modificado por Read e Northcote (1981). Para verificação do perfil protéico, foi realizada uma eletroforese em gel de poliacrilamida a uma concentração de 12% sob condições desnaturantes na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS), que é um forte detergente aniônico, e de 2-mercaptoetanol, um agente redutor. Esta técnica permite determinar o número e o tamanho das subunidades de uma proteína (LAEMMLI, 1970). A coloração para proteínas foi feita pelo Comassie Blue.

### 6.10.3 Obtenção do soro

O sangue foi coletado por secção do plexo axilares camundongos, deixado à temperatura ambiente até a sua completa coagulação e centrifugado (Centrífuga: Beckman Instruments, modelo TJ-6R) a 300 x g, a 4°C por 10min. O soro obtido para determinação de níveis de isotipos de anticorpos antígeno-específicos foi aliquoteado e armazenado a -20°C (OLIVEIRA et al., 2004). Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular do Departamento de Imunologia do CPqAM.

### 6.10.4 Determinação do perfil isotípico das imunoglobulinas G e E

A quantificação da produção das imunoglobulinas neste estudo foi realizada em duplicatas, para conferir maior segurança aos resultados obtidos. A reatividade das imunoglobulinas G e E do plasma obtido dos camundongos contra o antígeno de ovo (SEA) de *S. mansoni*. A análise da produção de anticorpos anti-SEA nos soros dos

camundongos foi realizada através do ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indireto, segundo Oliveira et al. (2004), com modificações, tendo sido executado os seguintes procedimentos: (1) sensibilização de placas (Nunc-Immuno Plates, MaxiSorp, 96 poços, Nalge Nunc International Corporation) com os Ags-SEA na concentração de 3µg/mL, os quais foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6, distribuídos 100µL/poço e incubados por 18h a 4°C; (2) lavagem das placas por três vezes com Tampão Salina Fosfato (PBS) a 0,157M, contendo Tween 20 (Tw) a 0,05% (PBS-Tw ; SIGMA, St. Louis, MO, USA); (3) bloqueio das placas com PBS-Tw a 0,05%, contendo 1% BSA (Albumina bovina sérica; SIGMA, St. Louis, MO), durante 2h; (4) nova lavagem das placas por 3 vezes, com PBS/Tw a 0,05%; (5) Ao final da lavagem, 50µL do soro foi diluído em PBS-BSA a 0,1% distribuídos em duplicata nas placas em concentrações de 1:200 para IgG1, IgG2b ; 1:20 para IgG2a , IgG3 e 1:5 para IgE. As placas foram, em seguida, incubadas por 18h a 4°C. Nova lavagem das placas por três vezes, com PBS/Tw a 0,05%; (6) Para detecção dos isotipos: incubação de 50µL de anticorpos biotinilados anti IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE na concentração de 0,5 mg/mL (Pharmingen, San Jose, CA), obtidos de camundongos, em PBS/BSA (0,1%) durante 1h, à temperatura ambiente. Após incubação, foram feitas mais cinco lavagens com PBS-Tw a 0,05% e adicionado às placas (100µL/poço) o conjugado enzimático diluído 1:3000 (estreptoavidina marcada com peroxidase — Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) em PBS-Tw contendo BSA 0,1 %. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1h. Mais cinco lavagens foram realizadas com PBS-Tw a 0,05%. A reação foi revelada pela adição do substrato contendo peróxido de hidrogênio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) e o cromógeno ABTS [(2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], Sigma Chemical, St. (Louis, Mo, USA)] ambos dissolvidos em tampão citrato 0,1M e fosfato de sódio 0,2M pH= 5,5. A reação, foi então, bloqueada com 100µL/poço de ácido cítrico 0,1M (VETEC, Rio de Janeiro, RJ). A leitura dos resultados foi realizada pela mensuração da densidade óptica a 405nm, em um leitor de ELISA automático (Biorad Laboratories, modelo 3550), com a utilização do programa Microplate versão 5.1.

### 6.11 Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva para expor os resultados obtidos. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas ou gráficos incluindo, também, o uso de algumas medidas descritivas, tais como mínimo, máximo, média e desvio padrão. Para análise comparativa das variáveis quantitativas, foram aplicados o teste “t” - de Student, o teste de Mann - Whitney ou a Análise de Variância (ANOVA). Para testar os contrastes, foi usado o teste de Levene para verificar a suposição de homogeneidade das variâncias; quando esta foi verificada, utilizou-se o teste de Tukey e quando não, o teste de Tamhane. Para análise das variáveis qualitativas, foi aplicado o teste do Qui-quadrado. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%, utilizando os softwares Excel 2000 (Microsoftwares 2000 - USA) e o SPSS 8.0.

## 7 Resultados

### 7.1 Estado nutricional

Pela análise das curvas ponderais (Figura 1), foi observado paralelismo entre os grupos desnutrido infectado (DI) e desnutrido não infectado (DNI), desde o início do experimento, tornando-se essas curvas sobrepostas a partir da décima quarta semana até a data do sacrifício dos animais. O mesmo ocorreu entre os grupos eutrófico infectado (EI) e eutrófico não infectado (ENI), nos quais se observou paralelismo discreto das curvas nas três primeiras semanas e sobreposição a partir da quarta semana, até o final do experimento. Os animais do grupo eutrófico infectado apresentaram curva ponderal discretamente inferior à dos eutróficos não infectados, o mesmo fato aconteceu entre os grupos desnutrido infectado e não infectado, não sendo encontrada diferença estatística significativa entre eles. No entanto, o grupo DI, quando comparado com o grupo EI, apresentou, durante todo o experimento, desenvolvimento ponderal nitidamente divergente, com valores sempre inferiores e estatisticamente significativos, o mesmo acontecendo entre os grupos DNI e ENI, quando comparados entre si ( $p < 0,001$ ).

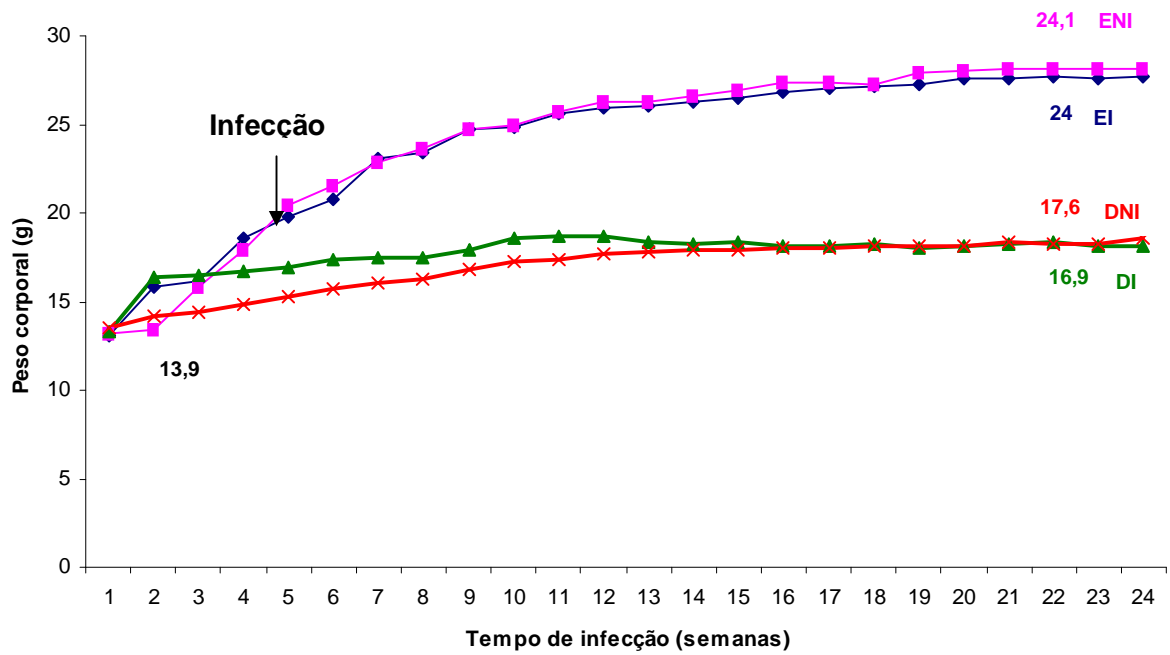


Figura 1 – Curvas ponderais de camundongos C57BL/6, desnutridos ou entróficos, infectados ou não pelo *Schistosoma mansoni*. ( $p < 0,001$ )

## 7. 2 Estudo parasitológico

### 7.2.1 Número de parasitos

A Figura 2 apresenta o número médio de vermes recolhidos do sistema porto-mesentérico de camundongos dos grupos desnutrido infectado e eutrófico infectado. Verificou-se que a carga parasitária do grupo eutrófico foi mais elevada do que a do grupo desnutrido, com diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,01$ ).

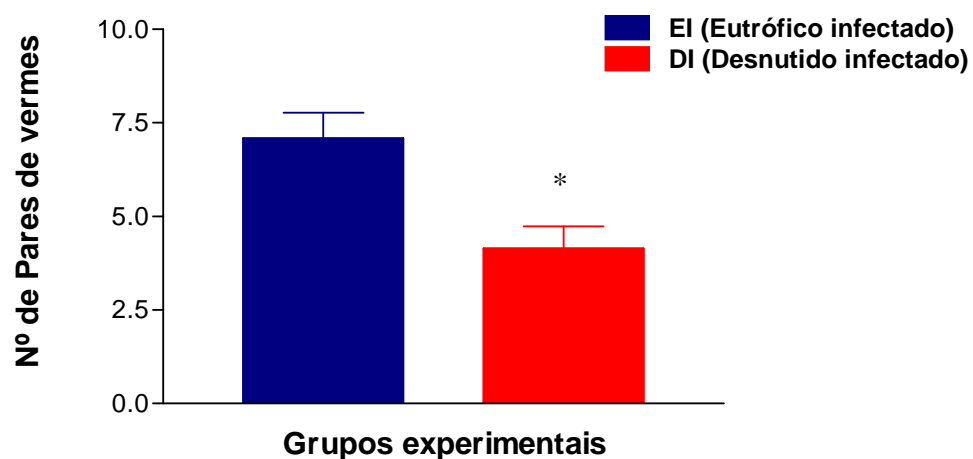


Figura 2 - Número de pares de vermes adultos de *S. mansoni* coletados em camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos infectados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.  
\*  $p = 0,01$ .

### 7.2.2 Quantidade de ovos no fígado

A Figura 3 mostra a quantidade média de ovos de *S. mansoni* encontrada no fígado total dos camundongos infectados. No grupo eutrófico, a quantidade de ovos foi relativamente mais elevada do que a do grupo desnutrido, porém estes resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa.



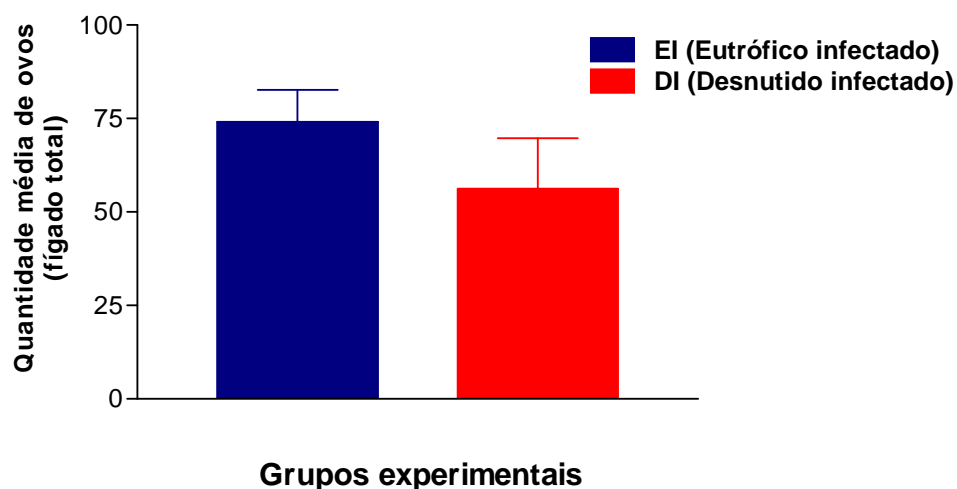


Figura 3 – Número de ovos encontrados no fígado total de camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados com *S. mansoni*. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

### 7.3 Mortalidade proporcional

Durante todo o experimento, a mortalidade espontânea foi mais elevada nos grupos desnutridos em relação aos grupos eutróficos. As taxas de mortalidade espontânea foram de 37,6% para o grupo desnutrido infectado, 18,3% para o grupo desnutrido não infectado, 26,7% para o grupo eutrófico infectado, e 5,5% para o grupo eutrófico não infectado (Figura 4). O percentual de mortalidade diferiu significativamente entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

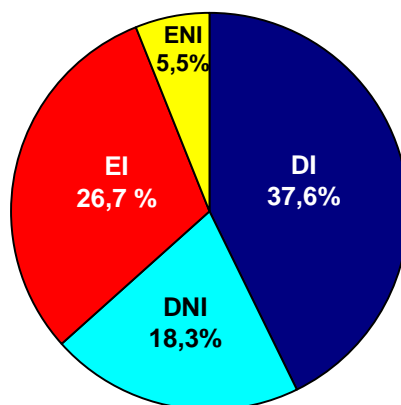


Figura 4 – Percentual de mortalidade espontânea observada entre camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados ou não com *S. mansoni*. EI = eutrófico infectado; DI = desnutrido infectado; ENI = eutrófico não infectado; DNI = desnutrido não infectado. ( $p < 0,05$ ).

## 7.4 Estudo morfológico

### 7.4.1 Dados macroscópicos

A relação percentual entre o peso do fígado e do baço e o peso corporal dos animais dos grupos desnutridos (DI e DNI) e dos grupos eutróficos (EI e ENI), estão representados na Figura 5. Verificou-se que o grupo eutrófico infectado apresentou valores significativamente mais elevados, em relação ao fígado, quando comparado com o grupo eutrófico não infectado ( $p < 0,001$ ), o mesmo acontecendo com os grupos desnutridos ( $p < 0,05$ ). O grupo desnutrido infectado apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo eutrófico infectado ( $p < 0,05$ ). Os grupos eutrófico não infectado e desnutrido não infectado não diferiram entre si.

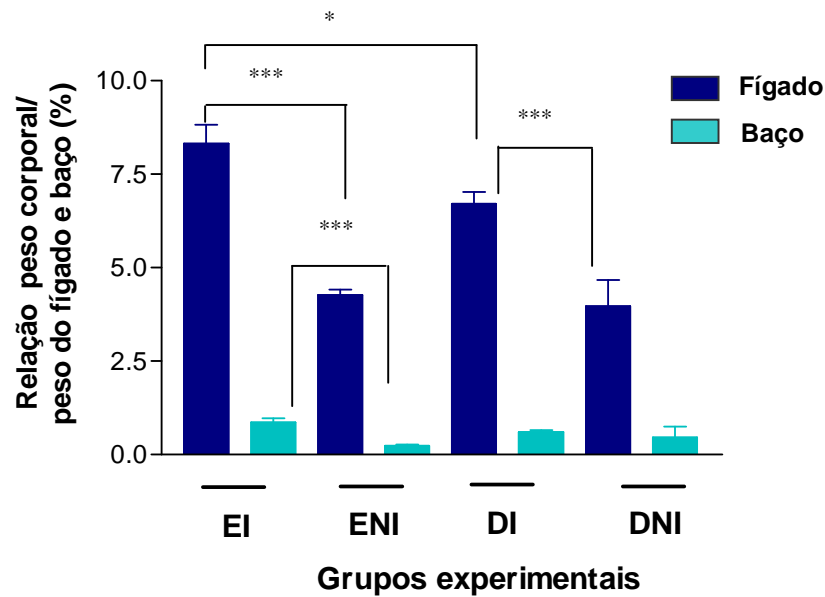


Figura 5 – Relação percentual entre o peso corporal e os pesos do fígado e do baço, respectivamente nos diversos grupos experimentais, em camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados ou não com *S. mansoni*. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão. EI = eutrófico infectado; DI = desnutrido infectado; ENI = eutrófico não infectado; DNI = desnutrido não infectado. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$

#### 4.2 Estudo histopatológico

O estudo histopatológico, no 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 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.

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 coalescência, formando extensos conglomerados. Em quatro dos dez camundongos do grupo eutrófico infectado (40%) foram detectados espaços-porta com intensa deposição de ovos, vascularização aumentada, acentuada

hiperplasia de ductos bilíferos e infiltração inflamatória crônica, caracterizando o desenvolvimento da fibrose hepática periportal murina (Figuras 6 e 7).



Figura 6 - Fibrose hepática periportal em camundongo eutrófico com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. A seta indica a extensa área de fibrose com restos de estruturas granulomatosas, neo-vascularização e infiltração inflamatória crônica (Picosirius vermelho - 100x).

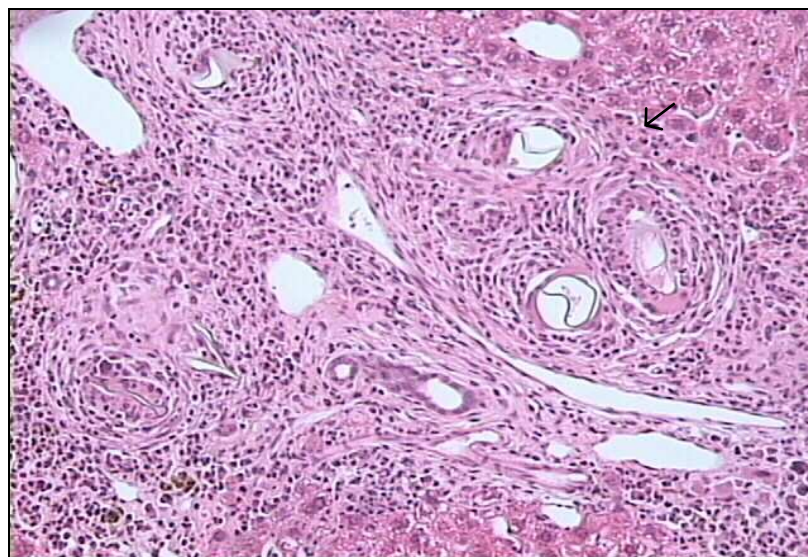


Figura 7 – Fibrose hepática periportal em camundongo eutrófico com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. A seta indica aumento do tecido conjuntivo portal com restos de estruturas granulomatosas periovulares, infiltração inflamatória crônica, hiperplasia de ductos bilíferos e neoformação vascular (Hematoxilina eosina - 200x).

No grupo de camundongos desnutridos, a infecção era de intensidade variável e o parênquima hepático apresentava, em alguns animais, esteatose do tipo periportal. Os granulomas eram menores do que no grupo dos camundongos eutróficos, distribuíam-se esparsamente pelo parênquima, às vezes formando conglomerados, mas em nenhum dos animais foram detectadas imagens sugestivas de fibrose periportal. Abundante pigmento de coloração pardo amarelada e aspecto grumoso (pigmento esquistossomótico) era visto nos espaços-porta e nos sinusoides hepáticos, sobretudo nos animais com maior quantidade de granulomas periovulares. Nesse grupo, muitos granulomas encontravam-se, ainda, em fase exsudativa, com presença de numerosos polimorfonucleares eosinófilos e neutrófilos (Figuras 8, 9, 10, 11, 12 e 13).



Figura 8 – Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. As setas mostram a presença de granulomas periovulares isolados e esparsos, em parênquima hepático de aspecto normal (Picrosirius vermelho - 100x).

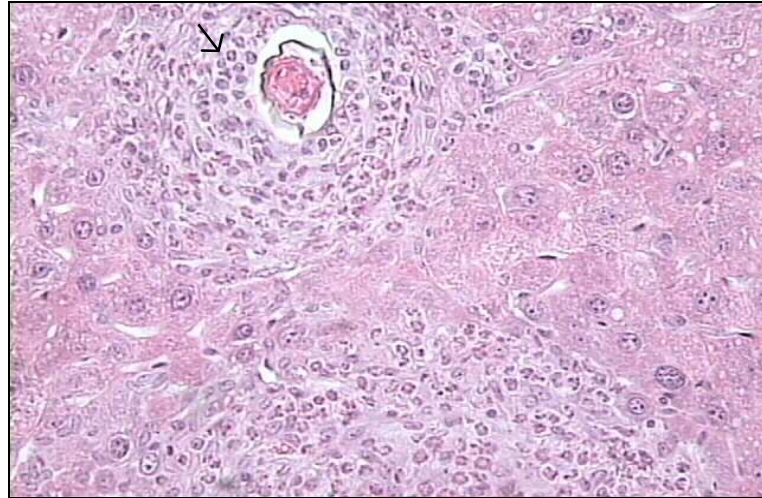


Figura 9 – Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido com 150 dias de infecção. A seta indica persistência de intensa reação eosinofílica na fase crônica, em torno de ovo de *S. mansoni* em degeneração (Hematoxilina eosina - 400x).

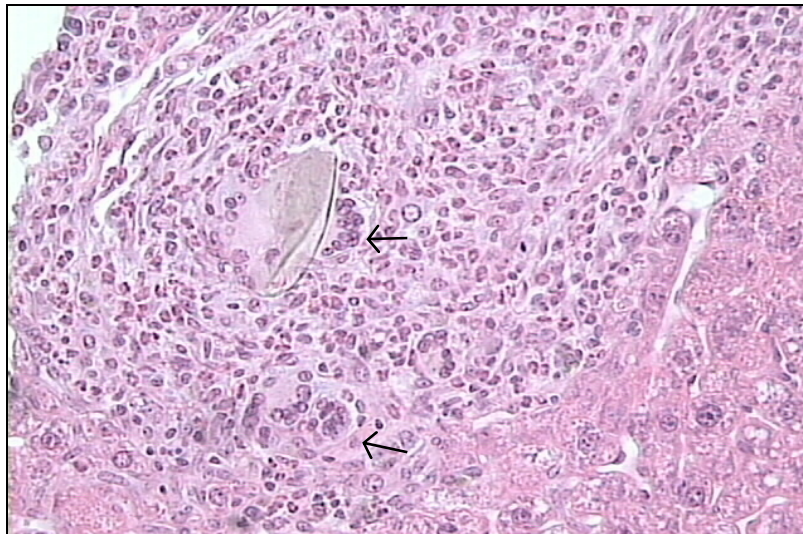


Figura 10 – Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido com 150 dias de infecção. As setas indicam granulomas com grande número de eosinófilos, alguns macrófagos e vários gigantócitos em formação, em torno de resto de ovo de *S. mansoni* invadido por células inflamatórias (Hematoxilina eosina - 400x).

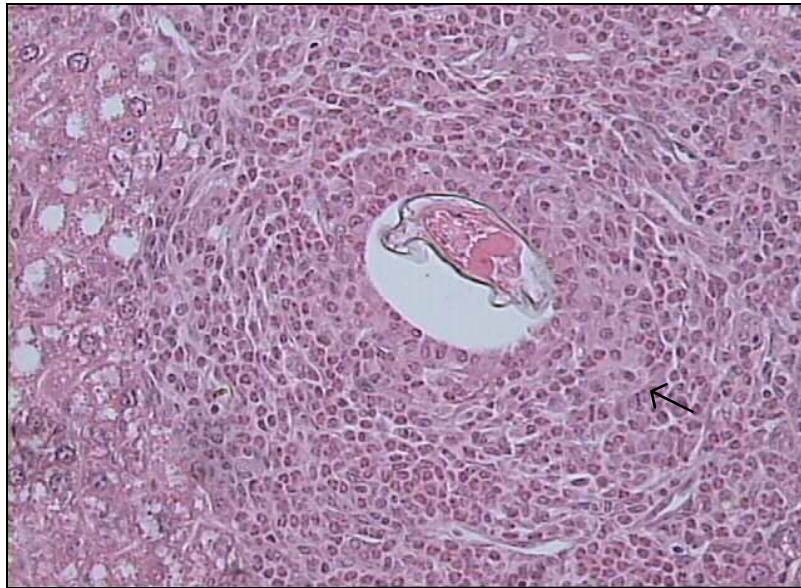


Figura 11 – Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido com 150 dias de infecção. A seta indica presença de eosinófilos e macrófagos circundando ovo de *S. mansoni* em degeneração. Ausência de deposição colágena (Hematoxilina eosina - 400x).

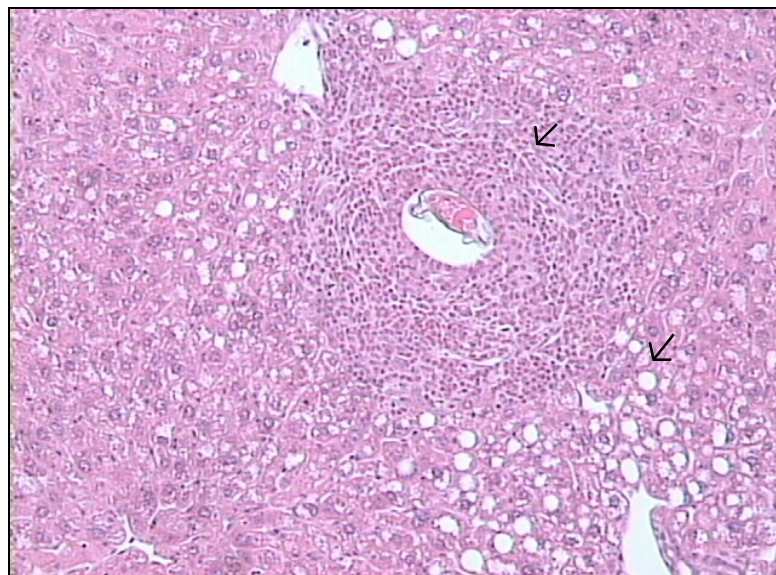


Figura 12 – Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido com 150 dias de infecção. As setas mostram granuloma ainda em fase exsudativa, em torno de ovo de *S. mansoni* em degeneração. Parênquima com metamorfose gordurosa (esteatose) de localização periportal (Hematoxilina eosina - 200x).



Figura 13 – Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido com 150 dias de infecção. As setas indicam conglomerados de granulomas periovulares pequenos, de aspecto produtivo, simulando placa de fibrose em parênquima hepático com atrofia hepatocitária (Hematoxilina eosina - 100x).

## 7.5 Mensuração do colágeno hepático

### 7.5.1 Quantificação bioquímica

A quantidade média de colágeno hepático encontrada no grupo desnutrido infectado, mensurado como hidroxiprolina, foi semelhante à do grupo eutrófico infectado, não apresentando diferença estatisticamente significativa (Figura 14).



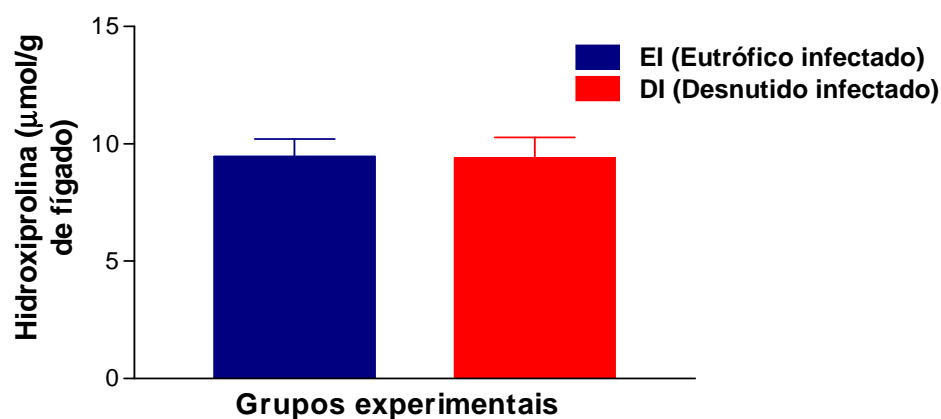


Figura 14 – Quantificação do colágeno (hidroxiprolina) em camundongos C57BL/6, desnutridos ou eutróficos, infectados com *S. mansoni*. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão.

### 7.5.2 Quantificação morfométrica

A Tabela 2 mostra os resultados referentes a percentual de fibrose (%), volume (V), densidade volumétrica (Vv) e densidade numérica (Nn) dos granulomas periovulares, todos obtidos por análise morfométrica computadorizada semi-automática, realizada nos grupos infectados desnutrido e eutrófico.

Tabela 2: Análise morfométrica do tecido hepático

Grupos experimentais	Nº de animais	% Fibrose $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Volume dos granulomas $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Densidade Volumétrica $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Densidade Numérica $\bar{X} \pm \text{EPM}$
Desnutrido Infectado	10	7,99 $\pm$ 1,44	3,22 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 5,57 x 10 <sup>6</sup>	0,01422 $\pm$ 0,004	108,8 $\pm$ 45,574
Eutrófico Infectado	10	8,61 $\pm$ 1,15	3,31 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 4,7 x 10 <sup>6</sup>	0,05954 $\pm$ 0,034	164,76 $\pm$ 97,092

$\bar{X}$  = média EPM = Erro padrão

### **Percentual de tecido fibroso (%)**

O percentual médio de tecido fibroso encontrado no grupo infectado desnutrido foi de  $7,99 \pm 1,44$  e no grupo eutrófico  $8,61 \pm 1,15$ . O grupo desnutrido infectado revelou um menor teor de tecido fibroso em relação ao grupo eutrófico infectado, mas não foi encontrada diferença significativa entre esses grupos.

### **Volume dos granulomas (V)**

O volume médio dos granulomas periovulares foi discretamente mais elevado no grupo eutrófico infectado  $3,31 \times 10^6 \pm 4,57 \times 10^6$  em comparação ao desnutrido infectado  $3,22 \times 10^6 \pm 5,57 \times 10^6$ , mas essa diferença não foi significativa.

### **Densidade volumétrica dos granulomas (Vv)**

O grupo eutrófico infectado apresentou densidade de volume aproximadamente quatro vezes maior  $0,05954 \pm 0,034$ , em relação ao grupo desnutrido infectado  $0,01422 \pm 0,004$ , embora não tenha havido diferença significativa.

### **Densidade numérica dos granulomas (Nn)**

A densidade numérica revelou discreta diferença entre o grupo desnutrido infectado  $108,8 \pm 45,574$  e o grupo eutrófico infectado  $164,76 \pm 97,092$  embora não tenha sido encontrada diferença estatisticamente significativa.

## 6.6 Estudo imunológico

### 6.6.1 Avaliação do perfil protéico do antígeno (SEA)

A Figura 15 mostra a avaliação do perfil protéico e da integridade das proteínas do antígeno solúvel ovular (SEA). Verificou-se que o perfil protéico do SEA apresentou proteínas de vários pesos moleculares, variando de 14,4 kDa a 94 kDa, conforme ilustração abaixo:

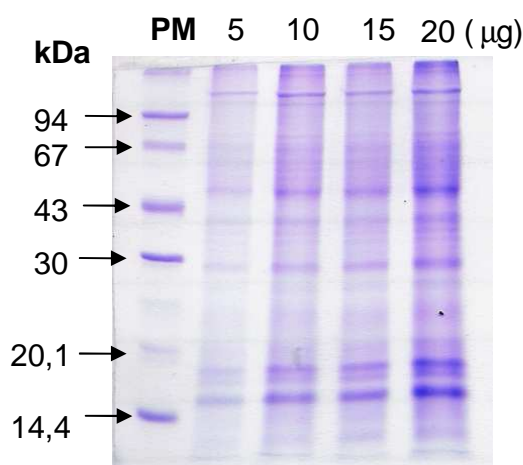


Figura 15 - Eletroforese em gel de poliacrilamida (12%) das proteínas do antígeno solúvel de ovo (SEA) corado pelo Coomassie blue. O SEA foi utilizado em quantidades de 5, 10, 15 e 20 µg. PM = peso molecular

### 6.6.2 Produção das imunoglobulinas G e E

A Figura 16 ilustra a produção de cada isotipo de imunoglobulina estudado. As imunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE, no grupo eutrófico infectado, apresentaram maiores títulos séricos quando comparadas ao grupo desnutrido infectado, com diferença estatisticamente significativa para IgG1, IgG2b, IgG3, IgE ( $p < 0,001$ ) e IgG2a ( $p < 0,005$ ).

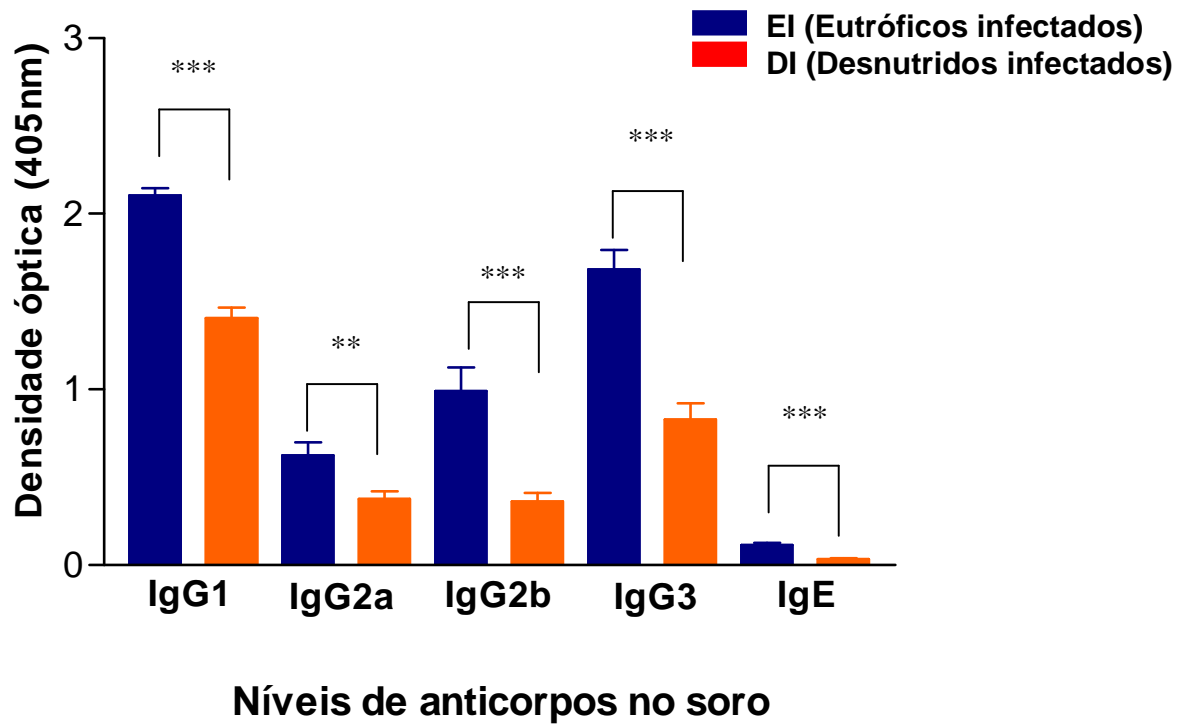


Figura16 – Níveis de anticorpos anti-SEA (antígeno solúvel de ovo) determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados com *S. mansoni*. Os animais desnutridos formaram anticorpos contra o SEA em níveis menores do que os animais eutróficos.

\*\* p < 0,005 e \*\*\* p < 0,001

## 8 DISCUSSÃO

Publicações a respeito do comportamento do sistema imunológico em hospedeiro humanos e experimentais, infectados com *S. mansoni*, baseiam-se, geralmente, no que ocorre em pacientes ou modelos experimentais eutróficos, não levando em conta o papel do estado nutricional. Por isso este trabalho, associando os fatores infecção esquistossomótica e desnutrição, teve como objetivo geral reproduzir situação comum em regiões endêmicas do Brasil e de outros países, numa abordagem mais realística sobre o binômio nutrição / infecção frequentemente encontrado nessas regiões.

A presente investigação permite discutir os aspectos que se seguem, em relação às condições sob as quais os experimentos se desenvolveram.

### 8.1 Estado nutricional

Quanto ao modelo usado para induzir desnutrição calórico-protéica, pode-se dizer que a Dieta Básica Regional (DBR) desempenhou eficientemente seu papel, ao reproduzir, nos camundongos do grupo desnutrido, um quadro de desnutrição do tipo marasmático, confirmando trabalhos anteriores (COUTINHO, 1976; COUTINHO; FEITAS; ABATH, 1992; COUTINHO et al., 1997). Camundongos infectados, alimentados com dieta balanceada, de modo semelhante ao que ocorre no hospedeiro humano infectado bem nutrido, apresentaram aspecto clínico, normal. Camundongos desnutridos, porém, apresentaram eriçamento de pêlos e debilidade corporal, comprovando os efeitos agravantes da desnutrição em relação à parasitose. Além disto, as curvas ponderais observadas entre o grupo desnutrido e o eutrófico (com ou sem infecção), foram nitidamente divergentes e estatisticamente significativas, comprovando que o estado nutricional do hospedeiro, guardou relação com o tipo de dieta consumida

e não com a infecção, confirmando, também, achados anteriores (COUTINHO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2004).

## 8.2 Estudo parasitológico

A significativa redução no número de parasitos obtidos dos animais desnutridos foi, provavelmente, ocasionada pela influência do estado nutricional do hospedeiro (MAGALHÃES et al., 1986). Sabe-se, também, que exemplares de *S. mansoni*, recuperados de camundongos desnutridos apresentam baixa fecundidade e evidentes alterações em suas estruturas interna e externa. Isso ocorre, provavelmente, porque os nutrientes essenciais disponíveis no meio interno do hospedeiro não são suficientes para seu adequado desenvolvimento (NEVES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; 2004). Do mesmo modo, a maior quantidade de vermes recuperados dos animais eutróficos, comprova a influência positiva da dieta balanceada consumida por esses animais (COUTO et al., 2007).

A falta de significância estatística encontrada entre os grupos infectados desnutrido e eutrófico em relação à quantidade de ovos no fígado total, corrobora achados da literatura (ANDRADE; SOUZA; SANTOS, 2000; SILVA et al., 2004). No entanto, há referência a uma discreta redução na quantidade absoluta de ovos no grupo desnutrido, talvez decorrente de um retardo na oviposição dos parasitos, influenciado pelo estado de desnutrição do hospedeiro (COUTO et al., 2002; FERREIRA et al., 1993, 1998; TSHIKUKA et al., 1997).

## 8.3 Mortalidade proporcional

A mortalidade espontânea mais elevada encontrada nos camundongos dos grupos desnutridos pode ser atribuída à carência protéica desses animais

(MAGALHÃES et al., 1986). Do mesmo modo, a menor taxa de mortalidade observada nos grupos eutróficos, certamente guardou relação com a ingestão da dieta balanceada, que ofereceu teor adequado de proteína e outros nutrientes necessários à defesa, desenvolvimento e sobrevivência dos camundongos. A maior taxa de mortalidade dos animais desnutridos infectados em relação aos desnutridos sem infecção indica que a má nutrição associada à esquistossomose mansônica agravou o estado clínico daqueles hospedeiros, confirmando achados de outros autores (COUTO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2004). As condições ambientais de temperatura, umidade e luminosidade, certamente não tiveram influência sobre a mortalidade espontânea dos camundongos, já que se mantiveram, durante todo o experimento, dentro dos padrões recomendados.

## 8.4 Estudo morfológico

### 8.4.1 Macroscopia

As alterações dos pesos do fígado e baço em relação ao peso corporal estão relacionadas com o desenvolvimento do quadro característico da fase avançada da esquistossomose mansônica (hepatoesplenomegalia), tanto nos camundongos desnutridos como nos eutróficos confirmando os achados de Coutinho et al. (2003, 2007) e Coutinho (2004).

A hepatomegalia guardou relação com a infecção pelo *S. mansoni* e também com a ingestão protéica. O aumento das reservas protéicas e a presença dos granulomas e seus constituintes, explicam o maior aumento ponderal verificado no grupo eutrófico infectado. A esplenomegalia está mais intimamente relacionada com a infecção esquistossomótica, em decorrência da congestão passiva crônica e da hiperplasia das células do sistema fagocítico-mononuclear do baço (COUTINHO et al., 2003; MAGALHÃES-FILHO; COUTINHO, 1961).

#### 8.4.2 Histopatologia

A histopatologia revelou algumas diferenças entre as lesões hepáticas esquistossomóticas dos grupos infectados eutrófico e desnutrido. Camundongos eutróficos desenvolveram granulomas maiores e deposição de tecido fibroso mais precocemente do que camundongos desnutridos. A fibrose periportal, todavia, não foi evidenciada em nenhum dos animais desnutridos, confirmando achados já descritos na literatura (COUTINHO et al., 1997, 2003, 2007; COUTINHO, 2004). Fibrose hepática periportal foi detectada em 40% dos camundongos eutróficos, achados estes de acordo com outros autores, que referem que 30 a 50% dos camundongos esquistossomóticos crônicos “inbred” e “outbred” desenvolvem essa lesão (ANDRADE, 1987; ANDRADE; CHEEVER, 1993; WARREN, 1966). O desenvolvimento da fibrose periportal hepática ainda é um assunto bastante complexo, e parecendo ter origem multifatorial (ANDRADE, 2005), uma vez que a literatura demonstra que, além das elevadas cargas parasitárias (CHEEVER, 1968; COURA; CONCEIÇÃO, 1981), outros fatores como genética do hospedeiro, sexo, idade e resposta imune podem estar envolvidos no desenvolvimento dessa lesão (SILVA et al., 2004).

No presente trabalho, a avaliação histopatológica da reação granulomatosa mostrou que camundongos infectados e desnutridos desenvolveram granulomas pequenos e esparsamente distribuídos no parênquima hepático, formando, às vezes, conglomerados (COUTO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2004). Os granulomas dos camundongos eutróficos eram maiores e apresentaram-se ora dispersos, ora agrupados nos espaços–porta e/ou no parênquima hepático, configurando o quadro anátomo-patológico encontrado tanto em camundongos “outbred” Swiss como em “inbred” CBA/J cronicamente infectados (ANDRADE; SILVA; SOUZA, 1997; HENDERSON et al., 1993).

A intensa eosinofilia encontrada nas lesões granulomatosas de animais tanto desnutridos como eutróficos, já se acha registrada na literatura, em camundongos de várias linhagens (CHIARAMONTE et al., 2001; COUTO et al., 2007; RUMBLEY et al., 1999). Embora essas células sejam proeminentes nos granulomas esquistossomóticos,



geradas pelos estímulos de citocinas do tipo Th2 aos ovos do parasito (ABATH et al., 2006; Mc CORMICK et al., 1996), não se sabe qual o seu exato papel na imunopatologia da esquistossomose mansônica (RUMBLEY et al., 1999). Sabe-se, apenas, que os eosinófilos são capazes de destruir os parasitos de *S. mansoni* em presença de anticorpos específicos, através da citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), e que participam na destruição dos ovos depositados nos tecidos do hospedeiro (JAMES; COLLEY, 1976).

A esteatose do tipo periportal, encontrada no grupo alimentado com dieta hipoprotéica, guardou relação com a desnutrição (COUTO et al., 2007; JACOBS; WOOD, 2004).

### **8.5 Estudo bioquímico e morfométrico do colágeno hepático**

A menor deposição de colágeno, observada no grupo desnutrido, através da análise histopatológica, foi, provavelmente, influenciada pelo estado nutricional dos animais (COUTINHO et al., 1997, 2003, 2007; COUTO et al., 2007). A inflamação granulomatosa resultante da infecção pelo *S. mansoni*, com subsequente formação de tecido fibroso, varia, consideravelmente, de indivíduo para indivíduo. Essas alterações ocorrem no modelo murino, onde se verifica que infecções com cargas parasitárias semelhantes, em diferentes linhagens de camundongos, podem provocar doenças de intensidades diferentes (CARVALHO, 2004). A morfometria, apesar de ser apontada na literatura como a técnica mais sensível (BARBOSA JR, 2001), não evidenciou diferença estatística quanto ao percentual de tecido fibroso hepático, volume dos granulomas, densidade volumétrica e numérica, entre os grupos infectados desnutrido ou eutrófico. O percentual de tecido fibroso hepático, mensurado bioquimicamente através da hidroxiprolina, também não revelou diferenças entre os grupos. Possivelmente, a cepa do parasito e a linhagem dos camundongos utilizadas no presente trabalho, explicam essa equivalência e os resultados diferentes dos que se acham publicados na literatura (COUTINHO et al. 2003, 2007; COUTINHO, 2004).

## 8.6 Estudo imunológico

A elevada produção de imunoglobulinas observada nos camundongos infectados eutróficos e desnutridos é semelhante ao que tem sido encontrado em resultados pacientes esquistossomóticos (BOCTOR; PETER, 1990; BUTTERWORTH et al., 1988; CAPRON; CAPRON, 1992; VENDRAME et al., 2001). A detecção de IgG nos espaços de Disse, obtida pela primeira vez em biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo *S. mansoni* por Grimaud; Borojevic; Badrawy (1977), sugere que a presença desses anticorpos próximos aos espaços periportais revela uma possível participação da resposta imune humoral na gênese de certas alterações da morfologia hepática resultantes da infecção esquistossomótica. Esses complexos imunes foram evidenciados tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção, tendo sido possível estabelecer uma correlação quantitativa entre infecção crônica e níveis dos mesmos (SANTORO et al., 1980). Embora essa correlação nem sempre possa ser encontrada (BOUT et al., 1977; HIATT et al., 1980), diversos estudos demonstram que pacientes portadores de hepatomegalia ou hepatoesplenomegalia geralmente apresentam altos índices desses complexos (GHANEM et al., 1987).

Em relação ao comportamento das imunoglobulinas em camundongos infectados pelo *S. mansoni*, o estado nutricional provavelmente influenciou a resposta imune humoral. Dos isotipos avaliados, foi observada uma maior produção nos níveis de imunoglobulina IgG1 tanto no grupo eutrófico quanto no desnutrido, confirmando que o nível elevado desse anticorpo é típico das infecções esquistossomóticas crônicas, tanto em seres humanos (ANTUNES et al., 1971; HILLYER, 1969; KANAMURA et al., 1979) como em camundongos (DEELDLER, 1973; HILLYER; FRICK, 1967; SHER et al., 1977). Os níveis séricos de IgG1, mais elevados nos animais infectados eutróficos, assemelham-se aos descritos por Oliveira et al. (2004), em trabalho realizado com camundongos “outbred” desnutridos e eutróficos. Silva et al. (2004) sugerem que os altos níveis de IgG1 estão relacionados com a fase crônica da infecção e também com a síntese de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), as quais estimulam a produção de anticorpos (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996; BOOM; LIANI; ABBAS,

1998). Experimentos realizados por Silva (2008) evidenciaram níveis elevados e estatisticamente significativos de IL-13, em camundongos eutróficos C57BL/6 quando comparados aos desnutridos na fase crônica da infecção pelo *S. mansoni*. É provável que os níveis elevados de IgG1 encontrados no presente trabalho, em camundongos eutróficos da mesma cepa, estejam relacionados com elevada produção de IL-13, não parecendo guardar relação com a intensidade da infecção (SILVA et al., 2004).

No presente trabalho os níveis séricos de IgE estavam significativamente baixos nos grupos infectados eutrófico e desnutrido, com menores títulos para este último. Vale destacar que esse achado em relação a camundongos C57BL/6 desnutridos, ainda não se acha registrado na literatura. É sabido que o aumento dos níveis de IgE também está relacionado com citocinas do tipo Th2, principalmente, IL-4 e IL-13, que promovem a síntese dessa imunoglobulina (SILVA et al., 2004). Essa resposta Th2 ocorre concomitantemente com a produção de ovos pelos vermes, sugerindo assim uma ligação entre a postura dos ovos e esse tipo de resposta (PEARCE et al., 2002). Os baixos níveis de IgE encontrados no grupo desnutrido, provavelmente, também guardam relação com a baixa concentração de IL-13 referida por Silva (2008) em camundongos também desnutridos.

Segundo El Redi; Ozaki; Kamiya. (1998) e Sher et al. (1983), na infecção primária de camundongos infectados com *S. mansoni*, a IgE só é detectada após a maturação, acasalamento e postura de ovos pelos parasitos. Em tentativa de elevar o nível da IgE policlonal específica para esquistossomo no início e durante o período pré-patente da infecção, El Redi et al. (2001) demonstraram que os níveis de dessa imunoglobulina não influenciaram os resultados na primo infecção murina pelo *S. mansoni*. Esses achados demonstram que a IgE parece não ser essencial nem prejudicial no primeiro contato do camundongo com o parasito. Nos camundongos reinfetados, a hipótese de que IgE confira proteção ainda precisa ser investigada (EL REDI et al., 2001). Todavia, publicações sugerem que ela pode ter relevância na proteção de indivíduos reinfetados pelo *S. mansoni* (CAPRON; DOMBROWICZ; CAPRON, 1999; GOMES et al., 1998, 2002). Portanto, o papel da imunoglobulina E é ainda bastante controverso na literatura, tanto em seres humanos como em diferentes modelos experimentais (EL RIDI; OZAKI; KAMIYA, 1998; SHER et al., 1983).

Os níveis das imunoglobulinas IgG2a e IgG2b foram os mais baixos dentre os isotipos da classe G. Esses baixos níveis, talvez sejam explicados pelo fato de ser atribuída à fase aguda da doença a maior produção desses anticorpos. Esses baixos índices também são referidos por Capron; Rousseaux; Mazingue (1978) e Hoffman; Cheever; Wynn (2000).

A IgG3 também apresentou altos níveis de produção. Dados semelhantes foram encontrados em camundongos “outbred” (OLIVEIRA et al., 2004) e descritos em indivíduos expostos uma única vez ao antígeno, como também, em residentes de áreas endêmicas (SATTI et al., 1996). Os dados apresentados na literatura sugerem que a elevada produção de IgG3 é independente da idade e da intensidade da infecção (NAUS et al., 1999) e que esse isotipo parece estar presente tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença (ISKANDER; AALBERSE, 1981; SHAHEEN et al., 1996).

A menor quantidade de imunoglobulinas observada no grupo desnutrido infectado em relação ao eutrófico infectado pode ser atribuída aos efeitos da desnutrição. A diferença nos níveis de produção das imunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE, mais elevados e estatisticamente significativos para os camundongos do grupo eutrófico, respalda essa conclusão. A redução dos níveis dos anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 em camundongos desnutridos já havia sido observados por Oliveira et al. (2004), em animais “outbred”.

Como base nos achados da presente investigação, pode-se concluir que camundongos isogênicos infectados pelo *S. mansoni* e desnutridos, apresentam resposta imune humoral com os mesmos isotipos encontrados em camundongo eutróficos, porém com níveis significativamente inferiores. Esse perfil quantitativamente diferenciado, detectado entre camundongos desnutridos e eutróficos reflete, provavelmente, a carência protéica crônica, resultante da deficiência nutricional a que esses animais foram submetidos.

## 9 CONCLUSÕES

1- Camundongos isogênicos C57BL/6 desnutridos e infectados com *Schistosoma mansoni* desenvolvem resposta imune humoral com produção dos mesmos isotipos de imunoglobulinas (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE) encontrados em camundongos eutróficos, porém com títulos significativamente inferiores, o que, provavelmente, reflete os efeitos da carência protéica crônica a que foram submetidos.

2- A diferença significativa verificada entre as curvas ponderais dos grupos desnutridos ou eutróficos guardou relação com o tipo de dieta consumida pelos camundongos, não tendo sido observada influência notória da infecção pelo *S. mansoni* sobre as mesmas.

3- Camundongos desnutridos desenvolveram menor carga parasitária, provavelmente em consequência do estado de má-nutrição dos animais.

4 - A equivalência de percentual de tecido fibroso encontrada entre o grupo infectado desnutrido e o eutrófico, ao contrário do que se acha registrado na literatura, pode ser explicado pela utilização de cepa parasitária e linhagem de camundongo diferentes das utilizadas em outras publicações.

5- A elevada mortalidade espontânea encontrada no grupo desnutrido infectado, também pode ser atribuída à carência protéica crônica dos camundongos.

## REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 22, n. 2, p. 85 - 91, 2006.
- ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, Londres, v. 383 n. 6603, p. 787 - 793, 1996.
- AKDIS, C. A. et al. Induction and differential regulation of bee venom phospholipase A2-specific human IgE and IgG4 antibodies in vitro requires allergen-specific and nonspecific activation of T and B cells. **J. Allergy Clin. Immunol.**, St. Louis, v. 99, n. 3, p. 345 - 353, 1997.
- ANDRADE, Z. A. Extracellular matrix and schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 86, p. 61 - 73, 1991.
- ANDRADE, Z. A. Myofibroblasts in schistosomal portal fibrosis of man. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 94, n.1, p. 87 - 93, 1999.
- ANDRADE, Z. A. Patogenia do granuloma esquistossomótico. In: LOPES DE FARIA, J. **Patologia Especial com Aplicações Clínicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 687.
- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 514 - 520, 2005.
- ANDRADE, Z. A.; CHEEVER, A. W. Characterization of the murine model of schistosomal hepatic periportal fibrosis ("pipestem" fibrosis). **Int. J. Exp. Pathol**, Oxford, v. 74, n. 2, p. 195 - 202, 1993.
- ANDRADE, Z. A.; SOUZA, M. M.; SANTOS, A. B. A. Reinfecções e desenvolvimento da fibrose periportal esquistossomótica no modelo murino. **Rev. Soc. Med. Trop.**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 197 - 200, 2000.

- ANDRADE, Z. A. As relações entre o álcool e fibrose hepática. **Arq. Méd. ABC.**, Santo André, supl. 2, p. 17 - 18, 2006.
- ANDRADE, Z. A. et al. Hepatic connective tissue changes in hepatosplenic schistosomiasis. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v. 23, p. 566 - 573, 1992.
- ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of "pipestem" fibrosis of the liver (Experimental observation on murine schistosomiasis). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 325 - 334, 1987.
- ANDRADE, Z. A.; SILVA, L. M.; SOUZA, M. M. Anexperimental approach to the pathogenesis of "pipestem" fibrosis (Symmers fibrosis of the liver). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 699 - 706, 1997.
- ANDRADE, Z. A.; VAN MARCK, E. A. E. Schistosomal glomerular disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 79, n. 4, p. 499 - 506, 1984.
- ANDRADE, Z. A.; WARREN, K. S. - Mild prolonged schistosomiasis in mice: alterations in host response with time and the development of portal fibrosis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 58, p. 53 - 57, 1964.
- ANTUNES L. J. et al . Immunoglobulins in human *Schistosomiasis mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 57, p. 539 - 542, 1971.
- ARAÚJO, K. C. G. M.; RESENDES, A. P. C.; SOUZA - SANTOS, R. Análise espacial dos focos de *Biomphalaria glabrata* e de casos humanos de esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil, no ano 2000. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 2, p. 409 - 417, 2007.
- BARBOSA JR., A. A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. **J. Bras. Patol.**, Brasília, v. 37, p. 197 - 200, 2001.
- BARBOSA JR., A. A.; PFEIFER, U.; ANDRADE, Z. A. Role of fat- storing cells in schistosomal hepatic fibrosis of mice. **Virch. Arch. B. Cell. Pathol.**, Berlin, v. 64, p. 91 - 96, 1993.

BARBOSA, C. S. et al. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Pernambuco. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, p. 337 - 341, 2000.

BARBOSA, C. S. et al. Urban schistosomiasis in Itamaracá Island, Pernambuco, Brazil: Epidemiological factors involved in the recent endemic process. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 265 – 266, 1998.

BEDOSSA, P.; PARADIS, V. Liver extracellular matrix in health and disease. **J. Pathol.**, Edinburgh, v. 200, p. 504 - 515, 2003.

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

BINA, J. C.; PRATA, A. A evolução natural da esquistossomose em uma área endêmica. In: \_\_\_\_\_ **Aspectos peculiares da infecção por *Schistosoma mansoni***. Salvador: Universidade Federal da Bahia, 1984. p. 13 – 33.

BINA, J. C.; PRATA, A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarendi. I – Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 36, n. 2, p. 2111 - 2116, 2003.

BINA, J. C. Influência terapêutica específica na evolução da esquistossomose mansoni. **Rev. Patol. Trop.**, Goiânia, v. 10, p. 221 - 267, 1981.

BOCTOR, F. N.; PETER, J. B. IgG sbclases in human chronic schistosomiasis - over-production of schistosome-specific and non-specific IgG4. **Clin. Exp. Immunol.**, London, v. 82, p. 574 - 578, 1990.

BOGLIOLO, L. The anatomical picture of the liver in hepatosplenic schistosomiasis mansoni. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, Liverpool, v. 51, p. 1 - 14, 1957.

BOOM, W. H.; LIANI, D.; ABBAS, A. K. Heterogeneity of helper/induce T lymphocytes. II Effects of interleukin 4 - and interleukin 2- producing T cell clones on resting B lymphocytes. **J. Exp. Med.**, Nova York, v.167, n. 4, p. 1350 - 1363, 1988.



BOUT, D. et al. Circulation immune complex in schistosomiasis. **Immunology**, Oxford, v. 3, p. 17 - 22, 1977.

BRADFORD, M. M. A. rapid and sensitive method for the quantitation of microgran quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248 - 254, 1976.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa de Controle da Esquistossomose**. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar\\_texto.cfm?idtxt=22072](http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=22072)>. Acesso em: 16 dez. 2006.

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

BUTTERWORTH, A. et al. Immunity in human schistosomiasis mansoni: cross-reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. **Biochimie**, Paris, v. 70, p. 1053 - 1063, 1988.

BLACK, R. et al. Maternal and child undernutrition: global and regional exposures and health consequences. **Lancet**. London, v. 371, p. 243 - 260, 2008.

CAPRON, A. et al. Effector mechanisms of immunity to Schistosomes and their regulation. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v. 61, p. 41 - 66, 1982.

CAPRON, A.; DOMBROWICZ, D.; CAPRON, M. Regulation of immune response in experimental and human schistosomiasis: the limits of an attractive paradigm. **Microbes. Infect.**, Paris, v. 1, p. 485 - 490, 1999.

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

CAPRON, M.; ROUSSEAU, J.; MAZINGUE, C. Rat Mast Cell-Eosinophil Interaction in Antibody-Dependent Eosinophil Cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* Schistosomula. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 121, p. 2518 - 2524, 1978.

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

CHANDRA R. K. Immunocompetence is a sensitive and functional barometer of nutritional status. **Acta Paediatr. Scand.**, Stockholm, n. 374, p. 129 - 132, 1991.

CHEEVER, A. W. et al. Experimental Models of *Schistosoma mansoni* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 917 - 940, 2002.

CHEEVER, A. W. Quantitative post-mortem study of schistosomiasis mansoni in man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 17, p. 38 - 60, 1968.

CHEEVER, A. W. et al. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 37, p. 85 - 97, 1987.

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

CHIARAMONTE, M. G. et al. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 34, n. 2, p. 273 - 282, 2001.

CHIEFFI, P. P. Interrelationship between schistosomiasis and concomitant diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, supl. 4, p. 291 - 296, 1992.

COURA, J. R.; CONCEIÇÃO, M. J. Correlação entre carga parasitária de *S. mansoni* e gravidade das formas clínicas em uma comunidade rural de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 14, p. 93 - 97, 1981.

COURA, J. R.; AMARAL, R. S. Epidemiological and control aspects of schistosomes in Brazilian endemic areas. **Mem. Inst. 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. **Mem. Inst. 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. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 6, 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. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford., v. 78, p. 337 - 342, 1997.

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

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

COUTINHO, E. M. Patobiologia da desnutrição nas doenças parasitárias. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 75, p. 63 - 76, 1980.

COUTINHO, E. M.; FREITAS, L. C. G.; ABATH, F. G. C. The influence of the Regional Basic Diet from northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 25, p. 13 - 20, 1992.

COUTINHO, E. M. **Relações hospedeiro-parasito na esquistossomose mansônica, em função da Dieta Básica Regional 1976**. Tese de Doutorado (Estudo Epidemiológico e Anatomopatológico) - Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1976.

COUTO, J. L. A. et al. Esquistossomose murina associada à desnutrição alterações histopatológicas no fígado, baço e jejuno. **Rev. Patol. Trop.**, Goiania, v. 36, n. 1, p. 54 - 66, 2007.

COUTO, J. L. A. et al. Structural changes in the jejunal mucosa of mice infected with *Schistosoma mansoni*, fed low or high protein diets. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 35, p. 601 - 607, 2002.

- CUTRIM, R. N.; CHIEFFI, P. P.; DE MORAES, J. C. Schistosomiasis mansoni in the "Baixada Ocidental Maranhense", state of Maranhao, Brazil: cross-sectional studies performed in 1987 and 1993. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 40, n. 3, p. 165 - 171, 1998.
- DEELDER, A. M. Immunology of experimental infections with *Schistosoma mansoni* in the swiss mouse and *Fasciola hepatica* in rabbit. **Acta Leiden.**, Leiden, v. 39, p. 100 - 107, 1973.
- DOMINGUES, A. L. C.; DOMINGUES, L. A. W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA, J. **Esquistossomose mansônica**. Recife: Ed. UFPE, 1994. cap. 5, p. 91 – 105.
- DUNNE, D. W. et al. Human antibody responses to *Schistosoma mansoni*: the influence of epitopes shared between different life-cycle stages on the response to the schistosomulum. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 18, n. 1, p.123 - 131, 1998.
- DUVALL, R. H.; DE WITT, W. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 16, p. 483 - 486, 1967.
- EL RIDI, R.; OZAKI, T.; KAMIYA, H. *Schistosoma mansoni* infection in IgE - producing and IgE - deficient mice. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 84, p. 171 - 174, 1998.
- EL RIDI, R. Role of IgE in primary murine *Schistosomiasis mansoni*. **Scand. J. Immunol.**, Baltimore, v. 53, p. 24 - 31, 2001.
- FALLON, P. G. Immunopathology of chistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunol. Today**, Cambridge, v. 21, n. 1, p. 29 - 35, 2000.
- FAVRE, T. C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 34, n. 6, p. 569 - 576, 2001.
- FERREIRA, H. S. et al. Intestinal protein absorption in malnourished mice with acute schistosomiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, p. 581 - 587, 1993.

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*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 199 - 203, 1998.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. **Rev. Patol. Trop.**, Goiania, v. 36, n. 1, p. 67 - 74, 2007.

FINKLEMAN, F. D. et al. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. **An. Rev. Immunol.**, Palo Alto, v. 8, p. 303 - 333, 1990.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Esquistossomose. In\_\_\_\_\_ **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002. p. 275 – 286.

GABELE, E.; BRENNER, D. A.; RIPPE, R. A. Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell. **Front. Biosci.**, Tampa F.L, v. 8, p. 69 - 77, 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. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 130, p. 2891 - 2895, 1983.

GAZZINELLI, M. F. et al. A interdição da doença: uma construção cultural da esquistossomose em área endêmica, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 6, p. 1629 - 1638, 2002.

GELFAND, M. The hypersensitive response of the european to schistosomiasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 67, p. 255 - 256, 1964.

GHANEM, A. M. et al. Circulating immune complex levels in patients with schistosomiasis and complication. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v. 81, n. 5, p. 773 - 777, 1987.

GOMES, Y. M. et al. IgE and IgG4 antibodies in subjects reinfected with *Schistosoma mansoni* in a endemic area of Northeast Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 183 – 184, 1998.

GOMES, Y. M. et al. Antibody isotype responses to egg antigens in human chronic schistosomiasis mansoni before and after treatment. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. supl 1, p. 111 - 112, 2002.

GRIMAUD, J. A.; BOROJEVIC, R.; BRADRAWY, N. E. IgG deposits and Disse's space pathology in human schistosomal liver. **Experientia**, Basel, v. 15, n. 33, p. 1078 - 1079, 1977.

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

HIATT, R. A. et al. Serial observations of circulating immune complexes in patients with acute schistosomiasis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 142, p. 665 - 670, 1980.

HILKENS, C. M. U. et al. Human dendritic cell require exogenous interleukin - 12 inducing factors to direct the development of naïve T helper cells toward the Th1 phenotype. **Blood.**, New York, v. 90, p.1920 - 1926, 1997.

HILLYER, G. V. Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* infections. IV — Human infections. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 25, p. 376 - 381, 1969.

HILLYER, G. V.; FRICK, L. P. Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* infections I — Mouse infections. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 20, p. 321 - 325, 1967.

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. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 164, p. 6406 – 6416, 2000.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, S. L. The sedimentation concentration method in Schistosomiasis mansoni. **J. Public Health Trop. Med.**, New York, v. 9, p. 283 - 291, 1934.

ISKANDER, R.; P. K. AALBERSE, R. C. IgG4 antibodies in Egyptian patients with schistosomiasis. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, Basel, v. 66, p. 200 - 207, 1981.

JACOBS, P.; WOOD, L. Protein-energy malnutrition and kwashiorkor. **Dis. Mon.**, Chicago, v. 50, p. 96 - 106, 2004.

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

JASSIM, A.; HASSAN, K.; CATTY, D. Antibody isotypes in human *Schistosomiasis mansoni*. **Parasite Immunol.**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 627 - 650, 1987.

JESUS, R. A. et al. Clinical and Immunologic Evaluation of 31 Patients with Acute Schistosomiasis mansoni. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 185, p. 98 - 105, 2002.

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

JUSOT, J. F.; SIMARRO, P.; MUYNCK, A. Historical aspects of the risk factors of *Schistosoma intercalatum* Schistosomiasis. **Santé**, Montrouge, v. 6, n. 3, p. 165 - 172, 1996.

KANAMURA, H. Y. et al. Class-specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of *Schistosomiasis mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 28, p. 242 - 248, 1979.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 33, n. 3, p. 303 - 308, 2000.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciênc. Cult.**, São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38 - 43, 2003.

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

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

MAGALHÃES - FILHO, A.; COUTINHO, E. M. Lesões esplênicas iniciais na Esquistossomose mansônica humana. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 2, p. 251 - 259, 1961.

MAGALHÃES, L. A. et al. Esquistossomose mansônica em camundongos experimentalmente subnutridos. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, p. 362 - 368, 1986.

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

Mc CORMICK, M. L. et al. Eosinophils from schistosome-induced hepatic granulomes produce superoxide and hydroxyl radical. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 157, p. 5009 - 5015, 1996.

Mc GARVEY, S. T. et al. Child growth nutritional status and Schistosomiasis japonica in Jiangxi, people's Republic China. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 48, n. 4, p. 547 - 553, 1993.

MEIRA, D. A. Interactions of infection, nutrition, and immunity. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 28, n. 4, p. 315 - 319, 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.

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

MOORE, D. V. et al. A comparison of common laboratory animals as experimental hosts for *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 35, p. 156 - 170, 1949.

MOREL, C. M. Reaching maturity - 25 years of the TDR. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 12, p. 522 - 528, 2000.



NAUS, C. W. A. et al. Development of antibody isotype responses to *Schistosoma mansoni* in an immunologically naïve immigrant population: influence of infection duration, infection intensity, and host age. **Infect. Immun.**, Washington, v. 67, n. 1 p. 3444 - 3451, 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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, p. 1013 - 1016, 2001.

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

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Food and nutrition terminology: Terminology Circular. **World Health Organization**, 1973. p. 165 - 172.

PARRAGA, I. M. et al. Gender differences in growth of school aged children with schistosomiasis and geohelminth infection. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 55, n. 2, p. 150 - 156, 1996.

PASSOS, A. D. C.; AMARAL, R. S. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 31, sup. II, p. 61 - 74, 1998.

PEARCE, E. J. et al. Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. **J. Exp. Med.**, New York, v. 173, p. 159 - 162, 1992.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The Immunobiology of Schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol.**, Londres, v. 2, p. 499 - 511, 2002.

PRATA, A. Esquistossomose mansoni. In: AMATO NETO, V. **Doenças transmissíveis** 3 ed. São Paulo: Sarvier, 1989. p. 383 - 393.

PRATA, A. Esquistossomose mansoni. In: VERONESI R; FOCCACIA, R. **Tratado de Infectologia** São Paulo: Ed. Atheneu, 1997. v. 2, p. 1354 - 1372.

PROIETTI, F. A. et al. Epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection in a low-endemic área in Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 34, n. 5, p. 409 - 419, 1992.

RABELLO, A. et al. Acute human schistosomiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 277 - 290, 1995.

READ, S. M.; NORTHCOTE, D. H. Minimization of variation in the response to different proteins of the Coomassie blue G dye-binding assay for protein. **Anal. Biochem.**, New York, v. 116, p. 53 - 64, 1981.

RESENDES, A. P. C.; SOUZA, S. R.; BARBOSA, C. S. Hospitalization and mortality from mansoni schistosomiasis in the State of Pernambuco, Brazil, 1992/2000. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 5, p. 1392 - 1401, 2005.

REY, L. T. **Epidemiologia e Controle da Esquistossomose nas Américas**. In:\_\_\_\_\_. Parasitologia, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 455 – 479.

RIHET, P. et al. Strong serum inhibition of specific IgE correlated to competing IgG4, revealed by a new methodology in subjects from a *S. mansoni* endemic area. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 22, n. 8, p. 2063 - 2067, 1992.

ROSS, A. G. et al. Schistosomiasis. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 346, p. 1212 - 1220, 2002.

RUMBLEY, C. A. et al. Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 162, n. 2, p. 1003 - 1009, 1999.

SANTORO, F. et al. Circulation antigens, immune complexes and C3d levels in human schistosomiasis: relation with *Schistosoma mansoni* egg output. **Clin. Exp. Immunol.**, London, v. 42, p. 219 - 225, 1980.

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

SHAHEEN, H. K. et al Parasite specific isotype and subclass antibody profiles during acute prepatent human schistosomiasis. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 82, p. 222 – 224, 1996.

SHER, A. et al. Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae IV. Analysis of the role of IgE antibodies and mast cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 131, p. 1460 - 1465, 1983.

SHER, A.; Mc INTYRE, S.; Von LICHTENBERG, F. *Schistosoma mansoni*: Kinetics and class specificity of hypergamaglobulinemia induced during murine infection. **Exp.Parasitol.**, New York, v. 41, p. 415 - 422, 1977.

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

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

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon and cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**, Washington, v. 236, p. 944, 1987.

SPELLBER, B.; EDWARDS JR, J. E. Type 1/ Type 2 immunity in infectious diseases. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v. 32, n. 1.p. 76 - 102, 2001.

STADECKER, M. J. et al. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v. 201, p. 168 - 169, 2004.

STANWORTH, D. R.; SMITH, A. K. Inhibition of reagin-mediated PCA-reactions in baboons by the human IgG 4 sub-class. **Clin. Allergy**, Oxford, v. 3, p. 37 - 41, 1973.

STEPHENSON, L. S. Helminth parasites, a major factor in malnutrition. **World Health Forum**, Switzerland, v. 15, n. 2, p. 169 -172, 1994.

STEPHENSON, L. S. The impact of schistosomiasis on human nutrition. **Parasitology**, London, v. 107, p. 107 - 123, 1993.

STEVENS, T. L. et al. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, London, v. 334, p. 255 - 258, 1988.

STIREWALT, M. A. et al. The relative susceptibilities of the commonly used laboratory mammals to infection by *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 31, p. 57 - 82, 1951.

TEODÓSIO, N. R. et al. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. **Arch. Lat. Amer. Nutr.**, 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. **Trop. Med. Int. Health**, Oxford, v. 2, p. 374 - 382, 1997.

VENDRAME, C. M. V. et al. Evaluation of anti-Schistosoma mansoni IgG antibodies in patients with chronic schistosomiasis mansoni before and after specific treatment. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 3, p. 153 - 159, 2001.

WARREN, K. S. The pathogenesis of "clay-pipestem cirrhosis" in mice with chronic schistosomiasis mansoni, with a note on the longevity of the schistosomes. **Am. J. Pathol.**, New 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. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 30, p. 418 - 422, 1983.

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

### 13- Apêndice A- Artigo em preparação

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

Barros, A. F.<sup>1</sup>; Silva, F.L.<sup>1</sup>; Costa, V.M. A.<sup>2</sup>; Araújo, R.E. <sup>1</sup>; Ramos, R.P.; Oliveira, S.A.<sup>1</sup>; Gomes, Y.M. <sup>1</sup>; Coutinho, E.M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães-CPqAM/FIOCRUZ, Recife-PE

<sup>2</sup>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, Brasil. Fone: (81) 2101-2525/21012581. e-mail: eridan@cpqam.fiocruz.br

#### RESUMO

Esquistossomose mansônica e desnutrição são importantes problemas de saúde pública no Brasil e em outros países do mundo. Embora a má nutrição associada à esquistossomose venha sendo estudada, a literatura é escassa a respeito da resposta imune no hospedeiro desnutrido e infectado pelo *Schistosoma mansoni*. O objetivo do presente trabalho foi investigar o perfil da resposta imune humoral e a patologia hepática em camundongos C57BL/6 desnutridos e infectados pelo *S. mansoni*, comparando-os com camundongos eutróficos submetidos à mesma infecção. Foram estudadas, também, a morfologia hepática, a carga parasitária (parasitos e ovos) e a produção de tecido fibroso hepático. A histopatologia revelou granulomas pequenos e esparsos no parênquima hepático, com ausência de fibrose periportal no grupo desnutrido. Camundongos eutróficos apresentaram não só granulomas maiores, como também desenvolveram fibrose hepática periportal (40%). No grupo eutrófico, o peso médio do fígado foi maior, resultado este atribuído ao teor protéico do fígado desses animais, associado à inflamação granulomatosa provocada pela esquistossomose. A esplenomegalia foi relacionada à infecção. O grupo desnutrido apresentou menor quantidade de parasitos que o eutrófico. As curvas ponderais dos grupos desnutridos foram inferiores e estatisticamente significativas em comparação com os grupos eutróficos, guardando relação, sobretudo, com o tipo de dieta consumida. Quanto à produção de tecido fibroso no fígado, não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos desnutrido e eutrófico. Os níveis das imunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE detectados no grupo desnutrido foram significativamente menores, quando comparados aos do grupo eutrófico, evidenciando os efeitos negativos da

deficiência protéica crônica sobre a capacidade de formação de anticorpos pelo organismo do hospedeiro desnutrido.

Palavras-chaves: Esquistossomose mansônica, Desnutrição, Imunoglobulinas e Patologia hepática.

## INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica destaca-se, mundialmente, como uma das parasitoses mais importantes, em virtude da severidade com que suas complexas formas clínicas acometem o hospedeiro na fase crônica da infecção. Essa doença gera um grande problema de saúde pública (MOREL, 2000).

Vários são os co-fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento das formas clínicas da esquistossomose mansônica. Dentre eles, podemos citar carga parasitária, idade do hospedeiro, co-infecções, reinfecções e estado nutricional do hospedeiro (ANDRADE, 2005; SILVA et al., 2004).

Trabalhos experimentais de Coutinho et al. (1997; 2003; 2007) e Couto et al., (2002; 2007), dentre outros, têm ressaltado a importância da má-nutrição do hospedeiro, ao demonstrarem que camundongos desnutridos infectados pelo *Schistosoma mansoni* apresentam características histológicas e fisiopatológicas diferentes de camundongos eutróficos, submetidos às mesmas condições.

Embora o comportamento do modelo murino desnutrido, quando infectado pelo *S. mansoni*, seja conhecido (COUTINHO et al., 1997; 2003; 2007), a literatura é bastante escassa sobre o perfil da resposta imune nesses animais. Por isso, o foco do presente estudo será estudar a resposta imune humoral, como também a morfologia hepática na fase crônica da doença, a carga parasitária (quantidade de parasitos e de ovos) e o estado nutricional dos animais. O estudo da resposta imune humoral, na fase crônica da esquistossomose em hospedeiros desnutridos, é importante para estabelecimento de futuras estratégias relacionadas ao diagnóstico e tratamento dessa parasitose em populações carentes de áreas endêmicas.

## METODOLOGIA

### Animais

Camundongos machos, isogênicos da linhagem C57BL/6, recém desmamados (21 dias), pesando entre 10 a 15g, foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério Experimental da FIOCRUZ-Recife (Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM), sob condições padronizadas de temperatura e luminosidade e umidade. 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.

### Infecção

Os camundongos foram infectados individualmente com 30 cercárias de *S. mansoni* (cepa LE - Belo Horizonte), oriundas de moluscos *Biomphalaria glabrata* criados no Laboratório de Malacologia do CPqAM - FIOCRUZ. A infecção foi realizada por via percutânea 30 dias após a administração das dietas

### Grupos experimentais

Foram formados os seguintes grupos de camundongos: desnutrido infectado (n=35), eutrófico infectado (n=35), desnutrido não infectado (n=15) e eutrófico não infectado (n=15).

Os animais dos grupos infectados foram utilizados da seguinte forma: camundongos desnutridos (n =25) e camundongos eutróficos (n=25), usados para estudo imunológico. Os infectados restantes, desnutridos (n=10) e eutróficos (n=10), foram utilizados nos estudos parasitológico, bioquímico, morfométrico, histológico e nutricional. Os grupos desnutrido (n=15) e eutrófico (n=15), ambos não infectados, foram utilizados apenas como controles para os estudos imunológico, morfológico macroscópico e avaliação do estado nutricional.

Vinte semanas após a infecção, todos os camundongos do projeto, destinados



aos estudos parasitológico, morfológico, bioquímico, morfométrico e imunológico, foram anestesiados por via intraperitoneal com Ketamina (115 mg/Kg) associada à Xilasina (10mg/Kg), antes do sacrifício.

### **Dieta**

A desnutrição foi induzida pela administração da dieta básica regional (DBR) essencialmente hipoprotéica, contendo aproximadamente 7% de proteína (COUTINHO et al., 1997). Os animais eutróficos foram alimentados com Nuvilab, dieta comercial balanceada (Nuvital Nutrientes Ltda, Colombo, Paraná, Brazil), contendo 22% de proteína. As dietas foram administradas aos animais "ad libitum", em forma de "pellets".

### **Estudo parasitológico**

Os camundongos foram submetidos à perfusão do sistema venoso portal segundo a técnica de Duvall e De Witt (1967), para coleta e quantificação dos parasitos. O número total de ovos foi obtido do tecido hepático digerido em hidróxido de potássio a 4% (CHEEVER, 1970).

### **Estudo morfológico**

Fígado e baço foram removidos, pesados e examinados macroscopicamente. Os valores da pesagem foram utilizados para determinação da relação percentual entre o peso corporal dos camundongos no momento da necropsia e o peso dos referidos órgãos.

Amostras de fígado foram fixadas em Bouin, desidratadas, diafanizadas e incluídas emblocos de parafina. Os blocos foram seccionados e os cortes de 5µm obtidos, corados pela hematoxilina e eosina para análise histopatológica; e pelo picrossirius vermelho, para quantificação do tecido colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLOS; BRENTANI, 1979) e mensuração dos granulomas esquistossomóticos.

### **Estudo morfométrico**

Foram utilizados, aleatoriamente, 10 campos microscópicos do corte histológico corado pelo picro sirius vermelho dos grupos infectados desnutrido e eutrófico para análise morfométrica através do Sistema de Processamento de Análise de Imagem semi-automático LEICA QWIN, versão 2.6 MC (Leica Cambridge, Cambridge – England). Os seguintes parâmetros foram utilizados para mensurar os granulomas foram utilizados: tamanho, volume, densidade volumétrica e numérica (WEIBEL, 1963). Para área de tecido fibroso foi usada a quantificação percentual do tecido selecionado automaticamente.

### **Estudo bioquímico**

A quantificação bioquímica do tecido fibroso foi realizada através da mensuração da quantidade de hidroxiprolina em amostra de 100 a 200mg de tecido hepático por camundongo (BERGMAN; LOXLEY, 1963). Os resultados da leitura foram corrigidos para intensidade da infecção, dividindo-se a hidroxiprolina hepática total pelo número de ovos de *S. mansoni* no fígado (CHEEVER et al., 1987).

### **Preparação do SEA**

O antígeno solúvel de ovo (SEA) foi obtido como descrito por Gazzinelli et al. (1983). Para sua obtenção, camundongos albinos Swiss, infectados por via percutânea com aproximadamente 100 cercárias de *S. mansoni*, foram sacrificados com 8 semanas após a infecção, e os fígados homogeneizados em solução de salina 1,7%. O homogeneizado foi filtrado e centrifugado a 200 x g a 4° C. Após a centrifugação o sedimento foi resuspenso em salina a 1,7%, e adicionado inibidor de protease (EDTA 1m M em metanol, PMSF 1Mm), ultrassonicado por 3 vezes (Processador Ultrassônico 500 watts- Cole Parmen, modelo 501), posteriormente, submetido a duas seções de ultracentrifugação (Ultracentrífuga Beckman Coulter, modelo Optima LE-80K, Palo Alto, Califórnia) a 10<sup>4</sup> x g por 10 min a 4°C e 10<sup>5</sup> x g por 1h, a 4°C respectivamente. A

técnica foi finalizada com a diálise do sobrenadante, utilizando-se membrana de celulose com capacidade de reter proteínas de peso molecular a partir de 12.000 kDa, para completa retirada dos sais presentes no antígeno. 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 Laemmili (1970) e corados pelo Comassie Blue.

### **Estudo imunológico**

A análise da produção de anticorpos anti-SEA nos soros dos camundongos foi realizada através do ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) indireto, segundo Oliveira et al. (2004) com modificações. (1) sensibilização de placas (Nunc-Immuno Plates, MaxiSorp, 96 poços, Nalge Nunc International Corporation) com os Ags-SEA na concentração de 3µg/mL, os quais foram diluídos em tampão carbonato-bicarbonato 0,05M pH 9,6, distribuídos 100µL/poço e incubados por 18 h a 4°C; (2) lavagem das placas por três vezes com Tampão Salina Fosfato (PBS) a 0,157M, contendo Tween 20 (Tw) a 0,05% (PBS-Tw ; SIGMA, St. Louis, MO, USA); (3) bloqueio das placas com PBS-Tw a 0,05%, contendo 1% BSA (Albumina bovina sérica; SIGMA, St. Louis, MO), durante 2h;(4) nova lavagem das placas por 3 vezes com PBS/Tw a 0,05%; (5) 50µL do soro foi diluído em PBS-BSA a 0,1% distribuídos em duplicata nas placas em concentrações de 1:200 para IgG1, IgG2b ;1:20 para IgG2a , IgG3 e 1:5 para IgE. As placas foram, em seguida, incubadas por 18 horas a 4°C. Nova lavagem das placas por três vezes com PBS/Tw a 0,05%; (6) Para detecção dos isotipos: incubação de 50µL de anticorpos biotinizados anti IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE na concentração de 0,5 mg/mL (Pharmingen, San Jose, CA) diluídos em PBS/BSA (0,1%) durante 1h à temperatura ambiente. Após incubação, foram feitas mais cinco lavagens com PBS-Tw a 0,05% e adicionado às placas (100µL/poço) o conjugado enzimático diluído 1:3000 (estreptoavidina marcada com peroxidase — Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) em PBS-Tw contendo BSA 0,1 %. Posteriormente, as placas foram incubadas à temperatura ambiente por 1h. Mais cinco lavagens foram realizadas com PBS-Tw a

0,05%. A reação foi revelada pela adição do substrato contendo peróxido de hidrogênio (VETEC, Rio de Janeiro, RJ) e o cromógeno ABTS [(2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], Sigma Chemical, St. (Louis, Mo, USA)] ambos dissolvidos em tampão citrato 0,1M e fosfato de sódio 0,2M pH = 5,5. A reação, foi então, bloqueada com 100 $\mu$ L/poço de ácido cítrico 0,1M. A leitura dos resultados foi realizada pela mensuração da densidade óptica a 405nm, em um leitor de ELISA automático, com a utilização do programa Microplate versão 5.1.

### **Análise estatística**

Os dados obtidos foram analisados utilizando o teste “t” de Student, ANOVA, e o teste de Mann-Whitney ou Qui-Quadrado. As diferenças foram consideradas significativas com  $p < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

Publicações a respeito do comportamento do sistema imunológico em hospedeiro humanos e experimentais, infectados com *S. mansoni* baseiam-se, geralmente, no que ocorre em pacientes ou modelos experimentais eutróficos, não levando em conta o papel do estado nutricional. Por isso este trabalho, associando os fatores infecção esquistossomótica e desnutrição, teve como objetivo geral reproduzir situação comum em regiões endêmicas do Brasil e de outros países, numa abordagem mais realística sobre o binômio nutrição / infecção frequentemente encontrado nessas regiões.

A presente investigação permite discutir os aspectos que se seguem, em relação às condições sob as quais os experimentos se desenvolveram.

### Estado nutricional

Os animais do grupo DI, quando comparado com o grupo EI, apresentaram, durante todo o experimento, desenvolvimento ponderal nitidamente divergente, com valores sempre inferiores e estatisticamente significativos, o mesmo acontecendo entre os grupos DNI e ENI, quando comparados entre si ( $p < 0,001$ ) (Figura 1). Quanto ao modelo usado para induzir desnutrição calórico-protéica, pode-se dizer que a dieta básica regional (DBR) desempenhou eficientemente seu papel, ao reproduzir, nos camundongos do grupo desnutrido, um quadro de desnutrição do tipo marasmático, confirmando trabalhos anteriores (COUTINHO, 1976; COUTINHO; FREITAS; ABATH, 1992; COUTINHO et al., 1997). Camundongos infectados, alimentados com dieta balanceada, de modo semelhante ao que ocorre no hospedeiro humano infectado bem nutrido, apresentaram aspecto clínico normal. Camundongos desnutridos, porém, apresentaram eriçamento de pêlos e debilidade corporal, comprovando os efeitos agravantes da desnutrição. Além disto, as curvas ponderais observadas entre o grupo desnutrido e o eutrófico (com ou sem infecção), foram nitidamente divergentes e significativas, comprovando que o estado nutricional do hospedeiro guardou relação

com o tipo de dieta consumida e não com a infecção, confirmando, também, achados anteriores (COUTINHO et al. 2003; OLIVEIRA et al., 2004).

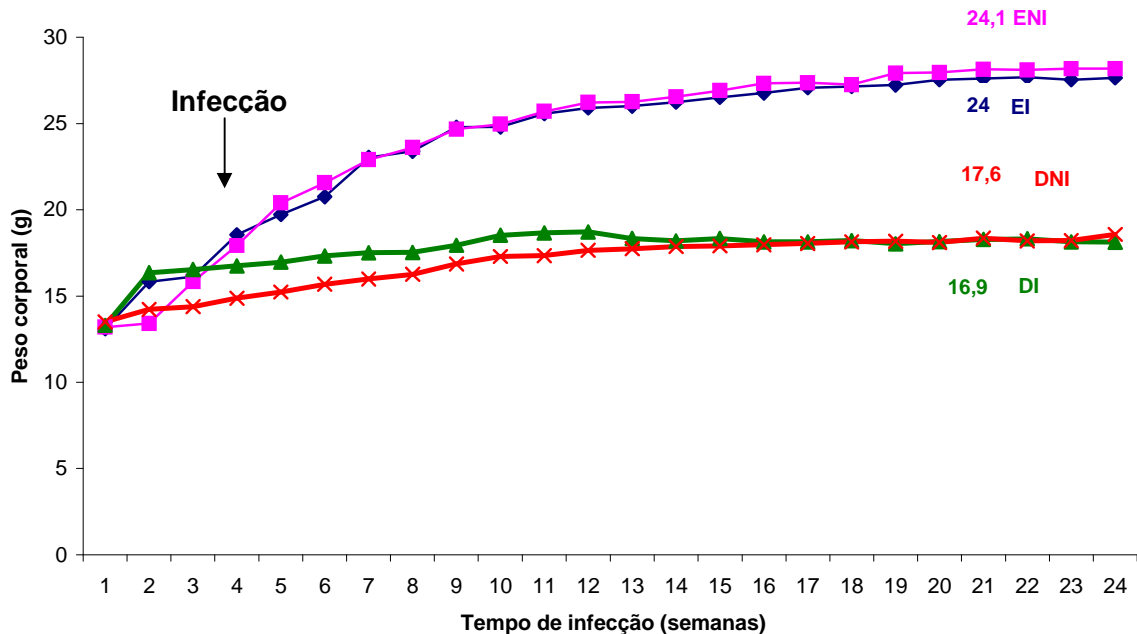


Figura 1 – Curvas ponderais de camundongos C57BL/6, desnutridos ou entróficos, infectados ou não pelo *S. mansoni*.

## Estudo parasitológico

### Número de parasitos e quantidade de ovos

A Figura 2 apresenta o número médio de vermes recolhidos do sistema portomesentérico de camundongos dos grupos desnutrido infectado e eutrófico infectado. Verificou-se que a carga parasitária do grupo eutrófico foi mais elevada do que a do grupo desnutrido, com diferença estatisticamente significativa ( $p=0,01$ ). A Figura 3 mostra a quantidade média de ovos de *S. mansoni* encontrada no fígado total dos camundongos infectados. No grupo eutrófico, a quantidade de ovos foi relativamente mais elevada do que a do grupo desnutrido, porém estes resultados não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

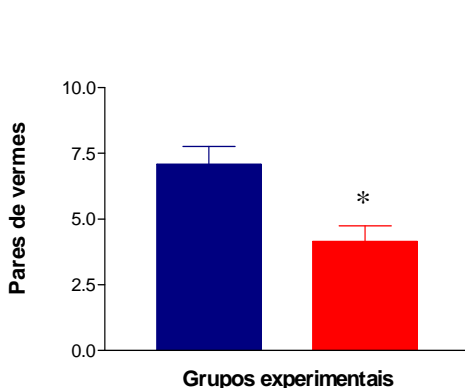


Figura 2 - Número de pares de vermes adultos de *S. mansoni* coletados em camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos infectados. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

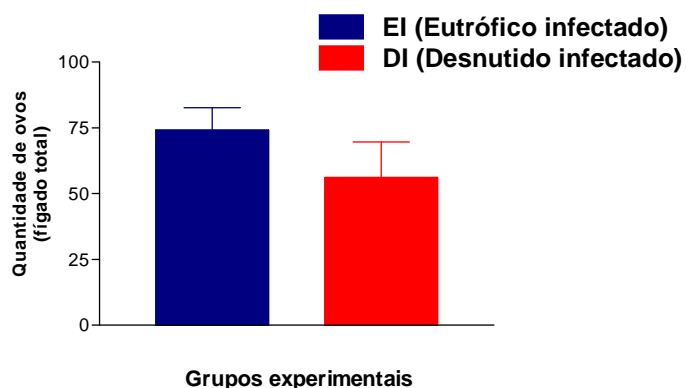


Figura 3 - Número de ovos encontrados no fígado total de camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados com *S. mansoni*. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

A significativa redução no número de parasitos obtidos dos animais desnutridos foi, provavelmente, ocasionada pela influência do estado nutricional do hospedeiro (MAGALHÃES et al., 1986). Sabe-se, também, que exemplares de *S. mansoni*, recuperados de camundongos desnutridos apresentam baixa fecundidade e evidentes alterações em suas estruturas interna e externa. Isso ocorre, provavelmente, porque os nutrientes essenciais disponíveis no meio interno do hospedeiro não são suficientes para seu adequado desenvolvimento (NEVES et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2003; 2004). Do mesmo modo, a maior quantidade de vermes recuperados dos animais eutróficos comprova a influência positiva da dieta balanceada consumida por esses animais (COUTO et al., 2007).

A falta de significância estatística encontrada entre os grupos infectados desnutrido e eutrófico em relação à quantidade de ovos no fígado total corrobora achados da literatura (ANDRADE; SOUZA; SANTOS, 2000; SILVA et al., 2004). No entanto, há referência a uma discreta redução na quantidade absoluta de ovos no grupo desnutrido, talvez decorrente de um retardo na oviposição dos parasitos, influenciado pelo estado de desnutrição do hospedeiro (COUTO et al., 2002; FERREIRA et al., 1993, 1998; TSHIKUKA et al., 1997).

### Mortalidade Proporcional

Durante todo o experimento, a mortalidade espontânea foi mais elevada nos grupos desnutridos em relação aos grupos eutróficos. As taxas de mortalidade espontânea foram de 37,6% para o grupo desnutrido infectado, 18,3% para o grupo desnutrido não infectado, 26,7% para o grupo eutrófico infectado, e 5,5% para o grupo eutrófico não infectado (Figura 4). O percentual de mortalidade diferiu significativamente entre os grupos ( $p < 0,05$ ).

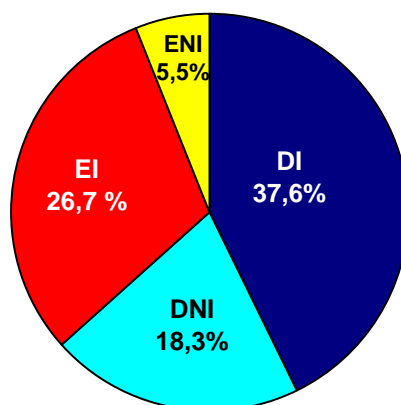


Figura 4 – Percentual de mortalidade espontânea observada entre camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados ou não com *S. mansoni*. EI = eutrófico infectado; ENI = eutrófico não infectado; DI = desnutrido infectado; DNI = desnutrido não infectado.

A mortalidade espontânea mais elevada encontrada nos camundongos dos grupos desnutridos pode ser atribuída à carência protéica desses animais (MAGALHÃES et al., 1986). Do mesmo modo, a menor taxa de mortalidade observada nos grupos eutróficos guardou, certamente, relação com a ingestão da dieta balanceada, que ofereceu teor adequado de proteína e outros nutrientes necessários à defesa, desenvolvimento e sobrevivência dos camundongos. A maior taxa de mortalidade dos animais desnutridos infectados em relação aos desnutridos sem infecção indica que a má nutrição associada à esquistossomose mansônica agravou o estado clínico daqueles hospedeiros, confirmando achados de outros autores (COUTO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2004). As condições ambientais de temperatura, umidade



e luminosidade certamente não tiveram influência sobre a mortalidade espontânea dos camundongos, já que se mantiveram, durante todo o experimento, dentro dos padrões recomendados.

## Estudo morfológico

### Macroscopia

A relação percentual entre o peso do fígado e do baço e o peso corporal dos animais dos grupos experimentais desnutridos (DI e DNI) e dos grupos eutróficos (EI e ENI) estão representados na Figura 5. Verificou-se que o grupo eutrófico infectado apresentou valores significativamente mais elevados em relação ao fígado, quando comparado com o grupo eutrófico não infectado ( $p < 0,001$ ), o mesmo acontecendo com os grupos desnutridos ( $p < 0,05$ ). O grupo desnutrido infectado apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo eutrófico infectado ( $p < 0,05$ ). Os grupos eutrófico não infectado e desnutrido não infectado não diferiram entre si.

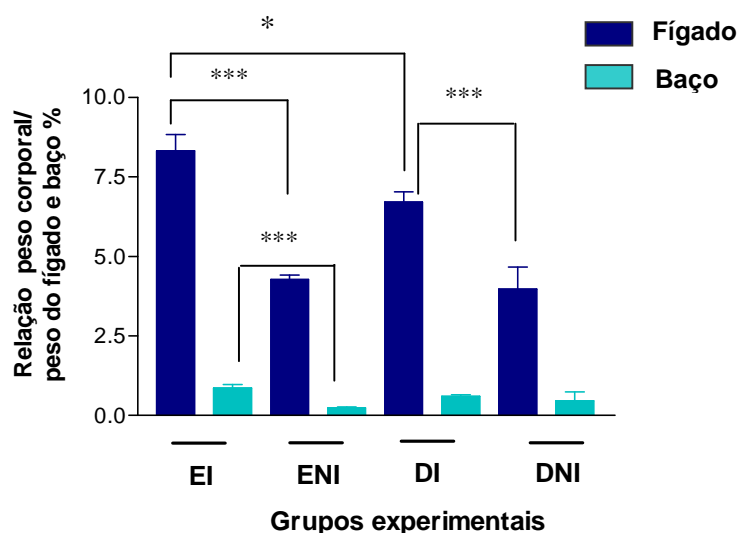


Figura 5 – Relação percentual entre o peso corporal e os pesos do fígado e baço, respectivamente nos diversos grupos experimentais, em camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados ou não com *S. mansoni*. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão. EI = eutrófico infectado; DI = desnutrido infectado; ENI = eutrófico não infectado; DNI = desnutrido não infectado.

As alterações dos pesos do fígado e baço em relação ao peso corporal estão relacionadas com o desenvolvimento do quadro característico da fase avançada da esquistossomose mansônica (hepato-esplenomegalia), tanto nos camundongos desnutridos como nos eutróficos confirmando os achados de Coutinho et al. (2003, 2007) e Coutinho (2004).

A hepatomegalia guardou relação com a infecção pelo *S. mansoni* e também com a ingestão protéica. O aumento das reservas protéicas e a presença dos granulomas e seus constituintes explicam o maior aumento ponderal verificado no grupo eutrófico infectado. A esplenomegalia está mais intimamente relacionada com a infecção esquistossomótica, em decorrência da congestão passiva crônica e da hiperplasia das células do sistema fagocítico-mononuclear do baço (MAGALHÃES-FILHO; COUTINHO, 1961).

### **Histopatologia**

O estudo histopatológico, no 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 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. 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 coalescência, formando extensos conglomerados. Em quatro dos dez camundongos do grupo eutrófico infectado (40%) foram detectados espaços-porta com intensa deposição de ovos, vascularização aumentada, acentuada hiperplasia de ductos bilíferos e infiltração inflamatória crônica, caracterizando o desenvolvimento da fibrose hepática periportal murina (Figuras 6 e 7).

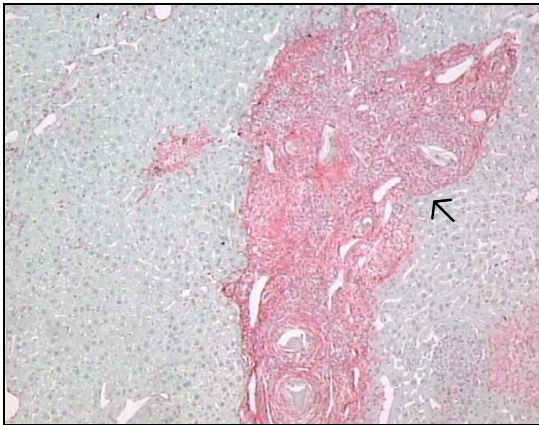


Figura 6 - Fibrose hepática periportal, em camundongo eutrófico com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. A seta indica a extensa área de fibrose com restos de estruturas granulomatosas, neovascularização e infiltração inflamatória crônica (Picrosirius red -100x).

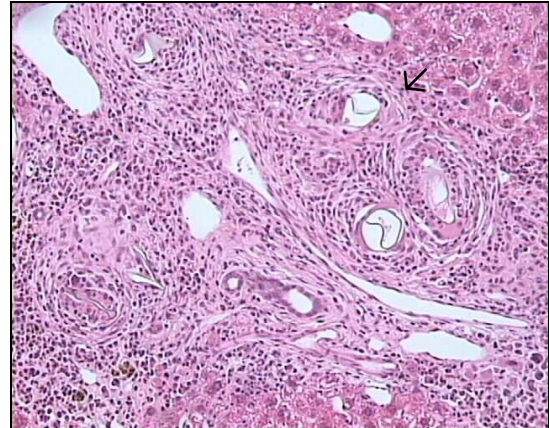


Figura 7- Fibrose hepática periportal, em camundongo eutrófico com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. A seta indica aumento do tecido conjuntivo portal com restos de estruturas granulomatosas periovulares, infiltração inflamatória crônica, hiperplasia de ductos bilíferos e neoformação vascular (Hematoxilina eosina - 200x).

No grupo de camundongos desnutridos, a infecção era de intensidade variável e o parênquima hepático apresentava, em alguns animais, esteatose do tipo periportal. Os granulomas eram menores do que no grupo dos camundongos eutróficos, distribuíam-se esparsamente pelo parênquima, às vezes formando conglomerados, mas em nenhum dos animais foram detectadas imagens sugestivas de fibrose periportal. Abundante pigmento de coloração pardo amarelada e aspecto grumoso (pigmento esquistossomótico) era visto nos espaços-porta e nos sinusoides hepáticos, sobretudo nos animais com maior quantidade de granulomas periovulares. Nesse grupo, muitos granulomas encontravam-se, ainda, em fase exsudativa, com presença de numerosos polimorfonucleares eosinófilos e neutrófilos (Figuras 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13).

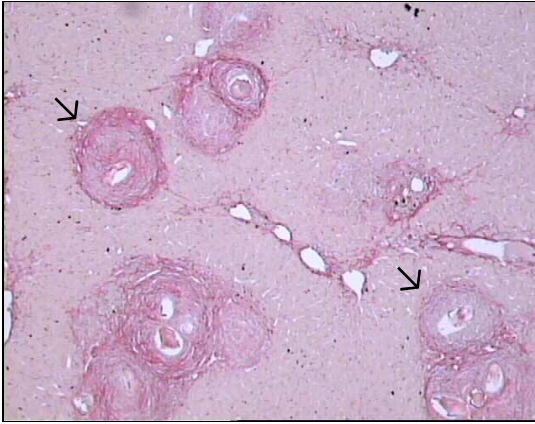


Figura 8- Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido, com 150 dias de infecção pelo *S. mansoni*. As setas mostram a presença de granulomas periovulares isolados e esparsos, em parênquima hepático de aspecto normal (Picosirius red-100x).



Figura 9- Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido, com 150 dias de infecção. A seta indica persistência de intensa reação eosinofílica na fase crônica, em torno de ovo de *S. mansoni* em degeneração (Hematoxilina eosina - 400x).

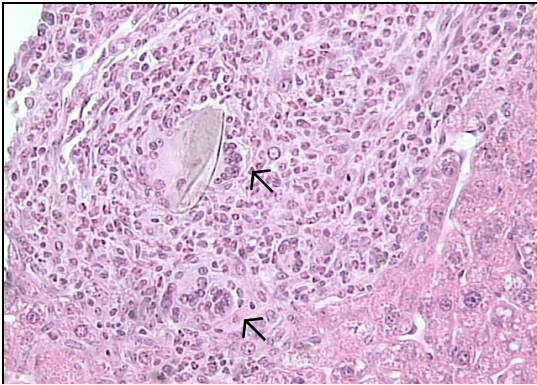


Figura 10 - Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido, com 150 dias de infecção. As setas indicam granulomas com grande número de eosinófilos, alguns macrófagos e vários gigantócitos em formação, em torno de resto de ovo de *S. mansoni* invadido por células inflamatórias (Hematoxilina eosina - 400x).



Figura 11 - Secção de fígado de camundongo C57BL/6, desnutrido com 150 dias de infecção. A seta indica presença de eosinófilos e macrófagos circundando ovo de *S. mansoni* em degeneração. Ausência de deposição colágena (Hematoxilina eosina - 400x).

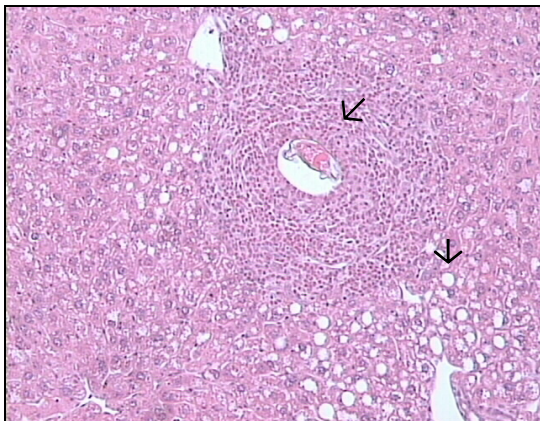


Figura 12 - Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido, com 150 dias de infecção. As setas mostram granuloma ainda em fase exsudativa, em torno de ovo de *S. mansoni* em degeneração. Parênquima com metamorfose gordurosa (esteatose) de localização periportal (Hematoxilina eosina - 200x).

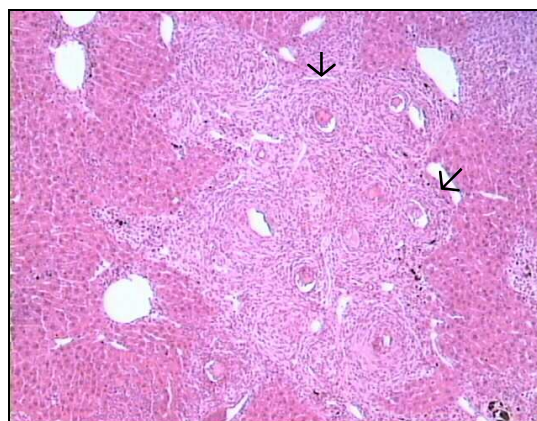


Figura 13 - Secção de fígado de camundongo C57BL/6 desnutrido, com 150 dias de infecção. As setas indicam conglomerados de granulomas periovulares pequenos, de aspecto produtivo, simulando placa de fibrose, em parênquima hepático com atrofia hepatocitária (Hematoxilina eosina - 100x).

A histopatologia revelou algumas diferenças entre as lesões hepáticas esquistossomóticas dos grupos eutrófico e desnutrido. Camundongos eutróficos desenvolveram granulomas maiores e deposição de tecido fibroso mais precocemente do que camundongos desnutridos. Camundongos eutróficos desenvolveram granulomas maiores e deposição de tecido fibroso mais precocemente do que camundongos desnutridos. A fibrose periportal, todavia, não foi evidenciada em nenhum dos animais desnutridos, confirmando achados já descritos na literatura (COUTINHO, 2004; COUTINHO et al., 1997, 2003, 2007). Fibrose hepática periportal foi detectada em 40% dos camundongos eutróficos, achados estes de acordo com outros autores, que referem que 30 a 50% dos camundongos esquistossomóticos crônicos “inbred” e “outbred” desenvolvem essa lesão (ANDRADE, 1987; ANDRADE; CHEEVER, 1993; WARREN, 1966). O desenvolvimento da fibrose periportal hepática ainda é um assunto bastante complexo, parecendo ter origem multifatorial (ANDRADE, 2005), uma vez que a literatura demonstra que, além das elevadas cargas parasitárias (CHEEVER, 1968; COURA; CONCEIÇÃO, 1981), outros fatores como genética do hospedeiro, sexo, idade e resposta imune podem estar envolvidos no desenvolvimento dessa lesão (SILVA et al., 2004).

No presente trabalho, a avaliação histopatológica da reação granulomatosa mostrou que camundongos infectados e desnutridos desenvolveram granulomas pequenos e esparsamente distribuídos no parênquima hepático, formando, às vezes, conglomerados (COUTO et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2004). Os granulomas dos camundongos eutróficos eram maiores e apresentaram-se ora dispersos, ora agrupados nos espaços-porta e/ou no parênquima hepático, configurando o quadro anátomo-patológico encontrado tanto em camundongos “outbred” Swiss como em “inbred” CBA/J cronicamente infectados (ANDRADE; SILVA; SOUZA, 1997; HENDERSON et al., 1993).

A intensa eosinofilia encontrada nas lesões granulomatosas de animais tanto desnutridos como eutróficos já se acha registrada na literatura em camundongos de várias linhagens (COUTO et al., 2007; CHIARAMONTE et al., 2001; RUMBLEY et al., 1999). Embora essas células sejam proeminentes nos granulomas esquistossomóticos, geradas pelos estímulos de citocinas do tipo Th2 aos ovos do parasito (ABATH et al., 2006; Mc CORMICK et al., 1996), não se sabe qual o seu exato papel na imunopatologia da esquistossomose mansônica (RUMBLEY et al., 1999). Sabe-se, apenas, que os eosinófilos são capazes de destruir os parasitos de *S. mansoni* em presença de anticorpos específicos, através da citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), e que participam na destruição dos ovos depositados nos tecidos do hospedeiro (JAMES; COLLEY, 1976).

A esteatose do tipo periportal, encontrada no grupo alimentado com dieta hipoprotéica, guardou relação com a desnutrição (COUTO et al., 2007; JACOBS; WOOD, 2004).

## **Estudo bioquímico e morfométrico do colágeno hepático**

### **Quantificação bioquímica**

A quantidade média de colágeno hepático encontrada no grupo desnutrido infectado, mensurado como hidroxiprolina, foi semelhante à do grupo eutrófico infectado, não apresentando diferença estatisticamente significativa (Figura 4).

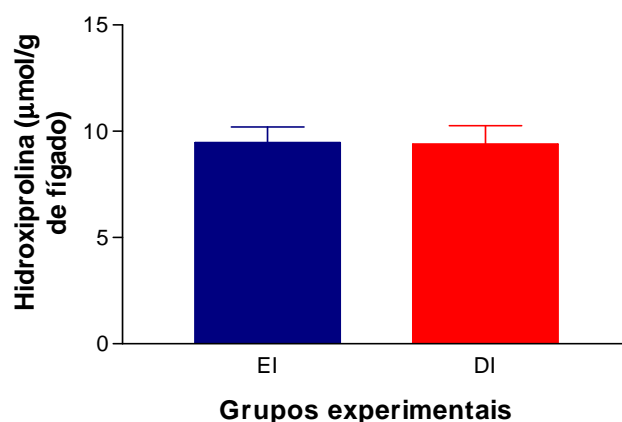


Figura 14 – Quantificação do colágeno (hidroxirolina), em camundongos C57BL/6, desnutridos ou eutróficos infectados com *S. mansoni*. Os resultados são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão.

### Quantificação morfométrica

A Tabela 2 mostra os resultados referentes ao percentual de fibrose (%), volume (V), densidade volumétrica (Vv) e densidade numérica (Nn) dos granulomas periovulares, todos obtidos por análise morfométrica computadorizada semi-automática, realizada nos grupos infectados desnutrido e eutrófico.

Tabela 2: Análise morfométrica do colágeno hepático

Grupos experimentais	Nº. de animais	% Fibrose $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Volume dos granulomas $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Densidade Volumétrica $\bar{X} \pm \text{EPM}$	Densidade Numérica $\bar{X} \pm \text{EPM}$
Desnutrido					
Infectado	10	7,99 $\pm$ 1,44	3,22 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 5,57 x 10 <sup>6</sup>	0,01422 $\pm$ 0,004	108,8 $\pm$ 45,574
Eutrófico					
Infectado	10	8,61 $\pm$ 1,15	3,31 x 10 <sup>6</sup> $\pm$ 4,7 x 10 <sup>6</sup>	0,05954 $\pm$ 0,034	164,76 $\pm$ 97,092

$\bar{X}$  = Média aritmética    EPM = erro padrão

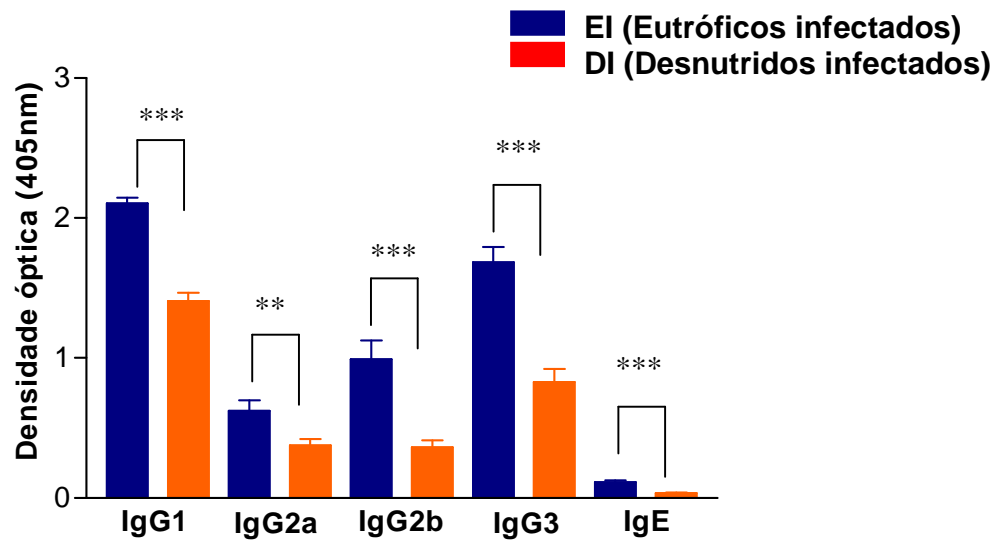
A menor deposição de colágeno, observada no grupo desnutrido, através da análise histopatológica, foi, provavelmente, influenciada pelo estado nutricional dos animais (COUTINHO et al., 1997; 2003; 2007; COUTO et al., 2007). A inflamação granulomatosa resultante da infecção pelo *S. mansoni*, com subsequente formação de

tecido fibroso, varia, consideravelmente, de indivíduo para indivíduo. Essas alterações ocorrem no modelo murino, onde se verifica que infecções com cargas parasitárias semelhantes, em diferentes linhagens de camundongos, podem provocar doenças de intensidades diferentes (CARVALHO, 2004; DAVIS et al., 1981). A morfometria, apesar de ser apontada na literatura como a técnica mais sensível (BARBOSA JR, 2001), não evidenciou diferença significativa quanto ao percentual de tecido fibroso hepático, volume dos granulomas, densidade volumétrica e numérica, entre os grupos infectados desnutrido e eutrófico. O percentual de tecido fibroso hepático, mensurado bioquimicamente através da hidroxiprolina, também não revelou diferenças entre os grupos. Possivelmente, a cepa do parasito e a linhagem dos camundongos utilizadas no presente trabalho, explicam os resultados diferentes dos que se acham publicados na literatura (COUTINHO et al. 2003, 2007; COUTINHO, 2004).

### **Estudo imunológico**

A Figura 16 ilustra a produção de cada isotipo de imunoglobulina estudado. As imunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE, no grupo eutrófico infectado, apresentaram maiores títulos sericos quando comparadas ao grupo desnutrido infectado, com diferença significativa para IgG1, IgG2b, IgG3, IgE ( $p < 0,001$ ) e IgG2a ( $p < 0,005$ ).





### Níveis de anticorpos no soro

Figura 15 - Níveis de anticorpos anti-SEA (antígeno solúvel de ovo) determinados por ELISA, em soros de camundongos C57BL/6 desnutridos ou eutróficos, infectados com *S. mansoni*. Os animais desnutridos formaram anticorpos contra o SEA em níveis menores do que os animais eutróficos.

\*\*  $p < 0,005$  e \*\*\*  $p < 0,001$

A elevada produção de imunoglobulinas observada nos camundongos infectados eutróficos e desnutridos é semelhante ao que tem sido encontrado em resultados pacientes esquistossomóticos (BUTTERWORTH et al., 1988; BOCTOR; PETER, 1990; CAPRON; CAPRON, 1992; VENDRAME et al., 2001). A detecção de IgG nos espaços de Disse, obtida por Grimaud; Borojevic; Badrawy (1977) pela primeira vez em biópsias hepáticas de pacientes infectados pelo *S. mansoni* sugere que a presença desses anticorpos próximos aos espaços periportais revela uma possível participação da resposta imune humoral na gênese de certas alterações da morfologia hepática resultantes da da infecção esquistossomótica. Esses complexos imunes foram evidenciados tanto na fase aguda quanto na fase crônica da infecção, tendo sido possível estabelecer uma correlação quantitativa entre infecção crônica e níveis dos mesmos (SANTORO et al.,1980). Embora essa correlação nem sempre possa ser encontrada (BOUT et al., 1977; HIATT et al., 1980), diversos estudos demonstram que pacientes portadores de hepatomegalia ou hepatoesplenomegalia geralmente apresentam altos índices desses complexos (GHANEM et al.,1987).

Em relação ao comportamento das imunoglobulinas em camundongos infectados pelo *S. mansoni*, o estado nutricional provavelmente influenciou a resposta imune

humoral. Dos isotipos avaliados, foi observada uma maior produção nos níveis de imunoglobulina IgG1 tanto no grupo eutrófico quanto no desnutrido, confirmando que o nível elevado desse anticorpo é típico das infecções esquistossomóticas crônicas, tanto em seres humanos (ANTUNES et al., 1971; HILLYER, 1969; KANAMURA et al., 1979) quanto em camundongos (DEELDLER, 1973; HILLYER; FRICK, 1967; SHER; Mc INTYRE; LICHTENBERG, 1977). Os níveis séricos de IgG1, mais elevados nos animais infectados eutróficos, assemelham-se aos descritos por Oliveira et al. (2004) em trabalho realizado com camundongos “outbred” desnutridos e eutróficos. Silva et al. (2004) sugerem que os altos níveis de IgG1 estão relacionados com a fase crônica da infecção e também com a síntese de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), as quais estimulam a produção de anticorpos (BOOM; LIANI; ABBAS, 1988; ABBAS; MURPHY; SHER, 1996). Experimentos realizados por Silva (2008) evidenciaram níveis elevados e estatisticamente significativos de IL-13 em camundongos eutróficos C57BL/6, quando comparados aos desnutridos. É provável que os níveis elevados de IgG1, encontrados no presente trabalho, em camundongos eutróficos da mesma cepa, estejam relacionados com elevada produção de IL-13, não parecendo guardar relação com a intensidade da infecção (SILVA et al., 2004).

No presente trabalho os níveis séricos de IgE estavam significativamente baixos nos grupos infectados eutrófico e desnutrido, com menores títulos para este último. Vale destacar que esse achado em relação a camundongos C57BL/6 desnutridos ainda não se acha registrado na literatura. É sabido que o aumento dos níveis de IgE também está relacionado com citocinas do tipo Th2, principalmente IL-4 e IL-13, que promovem a síntese dessa imunoglobulina (SILVA et al., 2004). Essa resposta Th2 ocorre concomitantemente com a produção de ovos pelos vermes, sugerindo, assim, uma ligação entre a postura dos ovos e esse tipo de resposta (PEARCE et al. 2002). Os baixos níveis de IgE encontrados no grupo desnutrido, provavelmente, também guardam relação com a baixa concentração de IL-13 referida por Silva (2008) em camundongos também desnutridos.

Segundo El Redi et al. (1998) e Sher et al. (1983), na infecção primária de camundongos infectados com *S. mansoni*, a IgE só é detectada após a maturação, acasalamento e postura de ovos pelos parasitos. Em tentativa de elevar o nível da IgE

policlonal específica para esquistossomo, no início e durante o período pré-patente da infecção, El Redi et al. (2001) demonstraram que os níveis de dessa imunoglobulina não influenciaram os resultados na primo infecção murina pelo *S. mansoni*. Esses achados demonstram que a IgE parece não ser essencial nem prejudicial no primeiro contato do camundongo com o parasito. Nos camundongos reinfetados, a hipótese de que IgE confira proteção ainda precisa ser investigada (El REDI et al., 2001). Todavia, publicações sugerem que ela pode ter relevância na proteção de indivíduos reinfetados pelo *S. mansoni* (CAPRON; DOMBROWICZ; CAPRON, 1999; GOMES et al., 1998; 2002). Portanto, o papel da imunoglobulina E é ainda bastante controverso na literatura, tanto em seres humanos como em diferentes modelos experimentais (EL RIDI; OZAKI; KAMIYA, 1998; SHER et al., 1983).

Os níveis das imunoglobulinas IgG2a e IgG2b foram os mais baixos entre os isotipos da classe G. Esses baixos níveis de anticorpos encontrados na fase crônica, talvez sejam explicados pelo fato de ser atribuída à fase aguda da doença uma maior produção dessas imunoglobulinas. Esses baixos índices também são referidos por Capron; Rousseaux; Mazingue (1978) e Hoffman; Cheever; Wynn (2000).

A IgG3 também apresentou altos níveis de produção. Dados semelhantes foram encontrados em camundongos “outbred” (OLIVEIRA et al., 2004) e descritos em humanos expostos uma única vez ao antígeno, como também, em residentes de áreas endêmicas (SATTI et al., 1996). Os dados apresentados na literatura sugerem que a elevada produção de IgG3 é independente da idade e da intensidade da infecção (NAUS et a., 1999) e que esse isotipo parece estar presente tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença (ISKANDER; AALBERSE, 1981; SHAHEEN et al., 1996).

A menor quantidade de imunoglobulinas observada no grupo desnutrido infectado em relação ao eutrófico infectado pode ser atribuída aos efeitos da desnutrição. A diferença nos níveis de produção das imunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE, mais elevados e estatisticamente significativos para os camundongos do grupo eutrófico, respalda essa conclusão. A redução dos níveis dos anticorpos IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 em camundongos desnutridos já havia sido observados por Oliveira et al. (2004), em animais “outbred”.

Como base nos achados da presente investigação, pode-se concluir que camundongos isogênicos infectados pelo *S. mansoni* e desnutridos, apresentam resposta imune humoral com os mesmos isotipos encontrados em camundongo eutróficos, porém com níveis significativamente inferiores. Esse perfil quantitativamente diferenciado, detectado entre camundongos desnutridos e eutróficos reflete, provavelmente, a carência protéica crônica, resultante da deficiência nutricional a que esses animais foram submetidos.

## **Agradecimentos**

Agradecemos, principalmente, a Guiliana Schirato e a Cláudia Lopes pela grandiosa assistência e colaboração durante a realização desse trabalho, prestadas no Biotério do CPqAM. Agradecemos, também, à Dra. Silvia Montenegro, Virginia Lorena e a Joelma Souza, pela fundamental colaboração.

## REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends Parasitol.**, Oxford, v. 22 n. 2, p. 85 - 91, 2006.
- ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M. ;SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. **Nature**, Londres, v. 383 n. 6603, p. 787-793,1996.
- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 38, n. 6, p. 514 - 520, 2005.
- ANDRADE, Z. A.; CHEEVER, A. W. Charecterization of the murine modelo f schistosomal hepática periportal fibrosis ("pipestem" fibrosis). **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 74, n. 2, p. 195 - 202, 1993.
- ANDRADE, Z. A.; SOUZA, M. M.; SANTOS, A. B. A. Reinfecções e desenvolvimento da fibrose periportal esquistossomótica no modelo murino. **Rev. Soc. Med. Trop.**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 197-200, 2000.
- ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of "pipestem" fibrosis of the liver(Experimental observation on murine schistosomiasis). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 3, p. 325 - 334, 1987.
- ANDRADE, Z. A.; SILVA, L. M.; SOUZA, M. M. Anexperimental approach to the pathogenesis of "pipestem" fibrosis (Symmers fibrosis of the liver). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 5, p. 699 - 706, 1997.
- ANTUNES, L. J. et al. Immunoglobulins in human *Schistosomiasis mansoni*. **J. Parasitol.**,v. 57, p. 539 - 542, 1971.
- BARBOSA, JR. A. A. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. **J. Bras. Patol.**, localv.37, p.197-200, 2001.
- BERGMAN, I.; LOXLEY, R. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. **Anal. Chem.**, Washington, v. 35, p. 1961 - 1965, 1963.
- BOCTOR, F. N.; PETER, J. B. et al. IgG subclasses in human chronic schistosomiasis: over-production of schistosome-specific and non- specific IgG4. **Clin. Exp. Immunol.**, London, v. 82, p. 574 - 578, 1990.

- BOOM, W. H.; LIANI, D.; ABBAS, A. K. Heterogeneity of helper/induce T lymphocytes. II Effects of interleukin 4 - and interleukin 2- producing T cell clones on resting B lymphocytes. **J. Exp. Med.**, Nova York, v. 167, n. 4, p. 1350 - 1363, 1988.
- BOUT, D. et al. Circulation immune complex in schistosomiasis. *Immunology*, Oxford, v. 3, p. 17 - 22, 1977.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Annal. Biochem.**, Orlando, v. 72, p. 248 - 254, 1976.
- BUTTERWORTH, A. et al. Immunity in human schistosomiasis mansoni: cross-reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. *Biochimie*, Paris, v. 70, p. 1053 - 1063, 1988.
- CAPRON, A. et al. Effector mechanisms of immunity to Schistosomes and their regulation. **Immunol. Rev.**, Copenhagen, v. 61, p. 41 - 66, 1982.
- CAPRON, A.; DOMBROWICZ, D.; CAPRON, M. Regulation of immune response in experimental and human schistosomiasis: the limits of an attractive paradigm. **Microbes. Infect.**, Paris, v. 1, p. 485 - 490, 1999.
- CAPRON, M.; CAPRON, A. Effector functions of eosinophils in schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 87, Supl. IV, 167 - 170, 1992.
- CAPRON, M.; ROUSSEAU, J.; MAZINGUE, C. Rat Mast Cell-Eosinophil Interaction in Antibody-Dependent Eosinophil Cytotoxicity to *Schistosoma mansoni* Schistosomula. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 121, p. 2518 - 2524, 1978.
- CARVALHO, S.L. **Fibrose e outras lesões hepáticas em camundongos isogênicos ("inbred") desnutridos e eutróficos, infectados com *Schistosoma mansoni***. 2004. Dissertação (Mestrado em Anatomia Patológica) – Departamento de Anatomia Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.
- CHEEVER, A. W. Quantitative post-mortem study of schistosomiasis mansoni in man. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 17, p. 38 - 60, 1968.
- CHEEVER, A. W. et al. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 37, p. 85 - 97, 1987.
- CHEEVER, A. W. Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. **Bull. World Health Organ.**, Genebra, v. 43, p. 601 - 603, 1970.
- CHIARAMONTE, M. G. et al. Studies of murine schistosomiasis reveal interleukin-13 blockade as a treatment for established and progressive liver fibrosis. **Hepatology**, Baltimore, v. 34, n. 2, p. 273 - 282, 2001.

- COURA, J.R.; CONCEIÇÃO, M. J. Correlação entre carga parasitária de *S. mansoni* e gravidade das formas clínicas em uma comunidade rural de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 14, p. 93 - 97, 1981.
- COUTINHO, E. M. et al. Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. **Mem. Inst. 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. **Int. J. Exp. Pathol.**, Oxford, v. 78, p. 337 - 342, 1997.
- COUTINHO, E. M. et al. Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice. **Acta Trop.**, Basel, v. 101, p. 15 - 24, 2007.
- COUTINHO, E. M. Malnutrition and Hepatic Fibrosis in Murine Schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 85 - 92, 2004.
- COUTINHO, E. M.; FREITAS, L. C. G.; ABATH, F. G. C. The influence of the Regional Basic Diet from northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 25, p. 13 - 20, 1992.
- COUTINHO, E. M. **Relações hospedeiro-parasito na esquistossomose mansônica, em função da Dieta Básica Regional 1976**. Tese de Doutorado (Estudo Epidemiológico e Anatomopatológico). Tese de Doutorado, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1976.
- COUTO, J. L. A. et al. Esquistossomose murina associada à desnutrição alterações histopatológicas no fígado, baço e jejuno. **Rev. Patologia Trop.**, Goiania, v. 36, n. 1, p. 54 - 66, 2007.
- COUTO, J. L. A. et al. Structural changes in the jejunal mucosa of mice infected with *Schistosoma mansoni*, fed low or high protein diets. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Brasília, v. 35, p. 601 - 607, 2002.
- DEELDER, A. M. Immunology of experimental infections with *Schistosoma mansoni* in the swiss mouse and *Fasciola hepatica* in rabbit. **Acta Leiden.**, Leiden, v. 39, p. 100 - 107, 1973.
- DUVALL, R.H.; DE WITT, W. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 16, p. 483 - 486, 1967.
- EL RIDI, R.; OZAKI T.; KAMIYA, H. *Schistosoma mansoni* infection in IgE-producing and IgE-deficient mice. **J. Parasitol.**, Lawrence, v. 84, p. 171 - 174, 1998.



EL RIDI, R. Role of IgE in primary murine *Schistosomiasis mansoni*. **Scand. J. Immunol.**, Baltimore, v. 53, p. 24 - 31, 2001.

FERREIRA, H. S. et al. Intestinal protein absorption in malnourished mice with acute schistosomiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 88, p. 581 - 587, 1993.

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*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 99 - 203, 1998.

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. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 130, p. 2891 - 2895, 1983.

GHANEM, A. M. et al. Circulating immune complex levels in patients with schistosomiasis and complication. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, London, v.81,n.5, p. 773 - 777, 1987.

GOMES, Y. M. et al. IgE and IgG4 antibodies in subjects reinfected with *Schistosoma mansoni* in a endemic area of Northeast Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 93, p. 183 - 184, 1998.

GOMES, Y. M. et al. Antibody isotype responses to egg antigens in human chronic schistosomiasis mansoni before and after treatment. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. Supl 1, p. 111 - 112, 2002.

GRIMAUD, J. A.; BOROJEVIC, R.; BRADRAWY, N. E. IgG deposits and Disse's space pathology in human schistosomal liver. **Experientia**, Basel, v.15, n. 33 - 38, p. 1078 - 1079, 1977.

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

HIATT, R. A. et al. Serial observations of circulating immune complexes in patients with acute schistosomiasis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v.142, p.665 - 670, 1980.

HILLYER, G. V. Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* infections. IV - Human infections. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 25, p. 376 - 381, 1969.

HILLYER, G. V.; FRICK, L. P. Immunoprecipitins in *Schistosoma mansoni* infections I — Mouse infections. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 20, p. 321 - 325, 1967.

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. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 164, p. 6406 - 6416, 2000.

ISKANDER, R., P. K.; AALBERSE, R. C. IgG4 antibodies in Egyptian patients with schistosomiasis. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, Basel, v. 66, p. 200 – 207, 1981.

JACOBS, P.; WOOD, L. Protein-energy malnutrition and kwashiorkor. **Dis. Mon.**, Chicago, v. 50, p. 96 - 106, 2004.

JAMES, S. L.; COLLEY, D. G. Eosinophil mediated destruction of *Schistosoma masoni* eggs. **J. Reticuloendothel. Soc.**, Winston-Salem, 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. **Histochem. J.**, Londres, v. 11, p. 447 - 455, 1979.

KANAMURA, H. Y. et al. Class-specific antibodies and fluorescent staining patterns in acute and chronic forms of *Schistosomiasis mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v. 28, p. 242 - 248, 1978.

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

MAGALHÃES FILHO, A.; COUTINHO, E. M. Lesões esplênicas iniciais na Esquistossomose mansônica humana. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 2, p. 251 - 259, 1961.

MAGALHÃES, L. A. et al., Esquistossomose mansônica em camundongos experimentalmente subnutridos. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v. 20, p. 362 - 368, 1986.

Mc CORMICK, M. L. et al. Eosinophils from schistosome-induced hepatic granulomas produce superoxide and hydroxyl radical. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 157, p. 5009 - 5015, 1996.

MOREL, C. M. Reaching maturity - 25 years of the TDR. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 12, p. 522 - 528, 2000.

NAUS, C. W. A. et al. Development of antibody isotype responses to *Schistosoma masoni* in an immunologically naïve immigrant population: influence of infection duration, infection intensity, and host age. **Infect. Immun.**, Washington, v. 67, n. 1 p. 3444 - 3451, 1999.

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

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

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

RUMBLEY, C. A. et al., Activated eosinophils are the major source of Th2-associated cytokines in the schistosome granuloma. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 162, n. 2, p. 1003 - 1009, 1999.

SANTORO, F. et al. Circulation antigens, immune complexes and C3d levels in human schistosomiasis: relation with *Schistosoma mansoni* egg output. **Clin. Exp. Immunol.**, London, v. 42, p. 219 - 225, 1980.

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

SHAHEEN, H. K. et al Parasite specific isotype and subclass antibody profiles during acute prepatent human schistosomiasis. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 82, p. 222 - 224, 1996.

SHER, A. et al. Mechanisms of protective immunity against *Schistosoma mansoni* infection in mice vaccinated with irradiated cercariae IV. Analysis of the role of IgE antibodies and mast cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 131, p. 1460 - 1465, 1983.

SHER, A.; Mc INTYRE, S.; Von LICHTENBERG, F. *Schistosoma mansoni*: Kinetics and class specificity of hypergamaglobulinemia induced during murine infection. **Exp. Parasitol.**, New York, v. 41, p. 415 - 422, 1977.

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

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

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

VENDRAME, C. M. V. et al. Evaluation of anti-*Schistosoma mansoni* IgG antibodies in patients with chronic schistosomiasis mansoni before and after specific treatment. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v. 43, n. 3, p.153 – 159, 2001.

WARREN, K. S. The pathogenesis of "clay-pipestem cirrhosis" in mice with chronic schistosomiasis mansoni, with a note on the longevity of the schistosomes. **Am. J. Pathol.**, New 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.

## 12- Apêndice B-Artigo publicado

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

Acta Tropica 101 (2007) 15–24

---



---

**ACTA  
TROPICA**


---



---

[www.elsevier.com/locate/actatropica](http://www.elsevier.com/locate/actatropica)

## Repeated infections with *Schistosoma mansoni* and liver fibrosis in undernourished mice

Eridan M. Coutinho<sup>a,\*</sup>, Fabiana L. Silva<sup>a</sup>, Andreia F. Barros<sup>a</sup>, Roni E. Araújo<sup>a</sup>,  
Sheilla A. Oliveira<sup>a</sup>, Carlos F. Luna<sup>a</sup>, Aryon A. Barbosa Jr.<sup>b</sup>, Zilton A. Andrade<sup>b</sup>

<sup>a</sup> *Laboratory of Immunopathology, Department of Immunology, Aggeu Magalhães Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, Recife, PE, CEP 50670-420, Brazil*

<sup>b</sup> *Laboratory of Experimental Pathology, Gonçalo Moniz Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Rua Waldemar Falcão, 121 Brotas, Salvador, BA, CEP 40295-001, Brazil*

Received 20 September 2005; received in revised form 16 March 2006; accepted 28 March 2006

Available online 27 December 2006

### Abstract

The mouse model of schistosomal periportal fibrosis (Symmers' "pipestem" fibrosis), that develops in 30–50% of the infected animals, is not reproduced in undernourished mice. Host nutritional status is likely to be a variable that may influence the outcome and progression of infection, since it interferes with the dynamics of connective tissue changes occurring in chronic hepatic schistosomiasis. Re-infections increase the occurrence of periportal liver fibrosis in well-nourished animals, but it is not known how undernourished mice would behave being repeatedly re-infected. So, 21-day-old male albino Swiss mice were individually exposed to 30 cercariae (percutaneous route) of the BH strain of *Schistosoma mansoni*, 4 weeks after being on a low-protein diet. Control animals were fed on a commercial balanced chow for mice. The nutritional status was evaluated by body weight gain and measurement of food intake. Mice were divided into four groups: A1 (undernourished, single infected), A2 (well-nourished, single infected), B1 (undernourished, re-infected), B2 (well-nourished, re-infected). The primary infection was performed 4 weeks after ingesting the respective diet. Re-infections started 45 days later, with exposure to 15 cercariae, at 15 day intervals. Mice were sacrificed 18 weeks after the primary exposure. The livers were submitted to morphological (gross and microscopic pathology), morphometric (percentage of fibrosis; granuloma size; volume and numerical densities) by using semi-automatic morphometry, and biochemical (quantification of collagen as hydroxyproline) studies. Worm burdens and hepatic egg counting were also recorded. Values for body weight gains were always lower in undernourished mice, the effects of re-infection being minimal on this regard. Liver and spleen weights were higher in well-nourished mice (either single infected or re-infected) and mainly related to the type of ingested diet. A greater number of re-infected well-nourished mice developed periportal fibrosis, but undernourished re-infected animals did not reproduce this lesion. The percentage of fibrosis and hepatic collagen content were higher in well-nourished mice, but differences between single infected and re-infected groups were not statistically significant.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Schistosomiasis; Liver fibrosis; Re-infections; Malnutrition

### 1. Introduction

Hepatic periportal "pipestem" fibrosis (Symmers, 1904) is the hallmark of hepatosplenic schistosomiasis. Factors related either to the host (immunological

\* Corresponding author. Tel.: +55 81 21012582; fax: +55 81 34532449.

E-mail address: [eridan@cpqam.fiocruz.br](mailto:eridan@cpqam.fiocruz.br) (E.M. Coutinho).

response, nutritional status, age, etc.) or to the parasite (strain, intensity of infection, number of re-infections with homologous or heterologous strains) have been investigated.

Henderson et al. (1993) reported that inbred male CBA/J mice chronically infected with *Schistosoma mansoni* develop two distinct syndromes that imitate the intestinal and the hepatosplenic clinical forms of the human disease, both pathologically and immunologically. However, Silva et al. (2004) reported that the two histological aspects seen in chronic schistosomiasis of the mouse (scattered granulomas, periportal fibrosis) had similar immunological profiles in BALB/c mice.

Well-nourished albino Swiss mice submitted to relatively mild (one to two worm pairs) and prolonged infections with *S. mansoni* (16 weeks or more) develop a lesion that mimics human Symmers' fibrosis (Warren, 1966) as a consequence of a massive and continuous deposition of eggs along the dilated intra-hepatic venous portal branches (Andrade, 1987) in a certain percentage of chronically infected mice (Andrade and Cheever, 1993). However, mice maintained under the same conditions and fed a low-protein diet completely failed to develop such "pipestem"-like portal lesion (Coutinho et al., 1997).

Epidemiological and clinical data taken from human populations in endemic areas suggest that re-infections represent an important risk factor for the development of severe hepatosplenic disease (Coura et al., 1974; Coura, 1975). Successful reproduction of periportal liver fibrosis in the chimpanzee monkey model was only obtained after repeated infections (von Lichtenberg and Sadun, 1968). On the other hand, "pipestem" fibrosis of the liver develops more frequently in mice submitted to repeated infections than in controls with single *S. mansoni* infection (Santos et al., 2000).

Experimental trials on the role of leptin in the pathogenesis of hepatic fibrosis were recently reported by Potter and Mezey (2002) and Potter et al. (2003). This hormone, expressed and secreted by adipocytes and also detected in liver activated stellate cells after culture, proved to be a potentiating but not an essential factor for the development of liver fibrosis produced by *S. mansoni* and carbon tetrachloride administration in mice.

As part of serial studies that are being carried out in our laboratories on the role of nutrition as an additional risk factor in the pathogenesis of schistosomal fibrosis of the liver, this investigation inquires whether "pipestem" fibrosis develops in undernourished mice submitted to repeated *S. mansoni* cercarial exposures.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male albino Swiss mice (21 days old), weighing 11–15 g, were kept in individual wire bottom cages. They were raised and maintained at the animal facilities of Aggeu Magalhães Research Center (FIOCRUZ). Water and food were provided "ad libitum". Mice were maintained in a temperature- and light-controlled environment (23 °C). All animals received human care in compliance with the guidelines of the Animal Care and Use Committee of the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz).

### 2.2. Infection

Each mouse was exposed to 30 cercariae (percutaneous route) of the BH strain (Belo Horizonte, Brazil) of *S. mansoni* 4 weeks after the experimental diet intake, according to the respective group. The cercariae were obtained from laboratory raised and infected *Biomphalaria glabrata*. Infection lasted 18 weeks and the effects of diet intake were followed for 22 weeks.

### 2.3. Diets

Undernutrition was induced by feeding mice with a multideficient and essentially low-protein natural diet (7–8% protein), planned to simulate that usually ingested by low-income individuals living in endemic areas of Manson's schistosomiasis in Northeast Brazil (Coutinho et al., 1997) and is thus referred to as regional basic diet (RBD). Control diet (NUVILAB) was a pelleted commercial balanced chow for mice (Nuvital Nutrientes Ltd., Colombo, PR, Brazil), with 22% protein content.

### 2.4. Evaluation of nutritional status

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

### 2.5. Experimental design

Animals were divided into the following groups, each one containing 10 mice:

- A1: undernourished, single infection;
- A2: well-nourished (normal feeding), single infection;

- B1: undernourished, re-infected;
- B2: well-nourished (normal feeding), re-infected.

The animals were first infected 4 weeks after ingesting their respective diets. In groups B1 and B2, re-infections started 45 days after the primary infection (5 re-infections with 15 cercariae per mouse, at 15 day intervals). Mice were sacrificed by cervical dislocation thirty days after the last re-infection. All animals, including those with single infections, were sacrificed 18 weeks after the primary exposure.

### 2.6. Morphological studies

The livers were removed, rinsed with PBS (phosphate buffered saline), weighed, and divided into several portions. One sample was placed in Bouin's fixative and/or in buffered (pH 7.4) 10% formaldehyde for histologic examination. Tissue was embedded in paraffin and the 5  $\mu\text{m}$  thick sections obtained were stained with hematoxylin–eosin and picosirius-red method for collagen (Junqueira et al., 1979). A portion of the liver was placed in 4% potassium hydroxide for egg counting (Cheever, 1968, 1970) and another sample was frozen at  $-70^\circ\text{C}$  for further biochemical quantification of collagen as hydroxyproline.

Spleens were also removed and weighed for gross studies.

### 2.7. Morphometry

Randomly sampled 5  $\mu\text{m}$ -thick liver histological sections stained with picosirius-red for collagen, were examined by semiautomatic morphometry using the LEICA QWIN Plus (2.8) Image Processing and Analysis System (Leica Cambridge, Cambridge, England) attached to a JVC TK 1380 digital camera. For morphometric measurements a total sectional area of 4.9  $\text{mm}^2$  per animal was evaluated. All granulomas around schistosome eggs or egg shells were included. A spherical shape and normal size distribution were assumed. The following parameters were calculated for the granulomas: size, volume density ( $V_v$ ), and numerical density ( $N_n$ ). The granuloma volume density was calculated as the quotient of the total granuloma profile area to the total sectional area studied per animal. The number of granulomas per unit volume of liver was assessed by applying the Weibel's (1969) formula. The sectional area of the red stained fibrous tissue was directly measured and calculated as a percentage of the total area examined, as previously described (Barbosa Jr., 2001; Coutinho et al., 2003).

### 2.8. Biochemical study

From each animal, a liver sample was frozen at  $-70^\circ\text{C}$  for determination of collagen, measured as hydroxyproline by the Bergman and Loxley's (1963) spectrophotometric method B. Values for hepatic collagen were expressed in micromoles of hydroxyproline per gram of liver and corrected for intensity of infection by dividing the hydroxyproline content in the whole liver by the number of eggs per liver, results being expressed for 10,000s (Cheever, 1986).

### 2.9. Parasitological study

Worms recovered after perfusion of the portal system (Duvall and DeWitt, 1967) were counted and separated by sex. Quantification of the number of eggs in the liver tissue was performed after digestion in 4% potassium hydroxide (Cheever, 1968, 1970).

### 2.10. Statistical analysis

Data are presented as mean  $\pm$  S.E.M. Statistical significance was assessed by Student's *t*-test (when appropriate), one-way ANOVA with Tukey's and Tamhane's post hoc tests and the non-parametric Mann–Whitney's test (SPSS v.8 – Statistical Package for Social Sciences Inc., USA; and EXCEL – Microsoft, USA). Values of  $p < 0.05$  were taken to be significant.

## 3. Results

### 3.1. Nutritional status

Undernourished and well-nourished infected mice showed diverging growth curves, higher values having been detected for well-nourished animals. Undernourished mice did not show ascending values, as the controls (A2 and B2) but a slight weight gain could be noticed at the beginning of the experiment, followed by a tendency to a progressive losing of weight until sacrifice. Effects of re-infection upon body weight gain were minimal and not dependent on the nutritional status of the mice, as can be seen in Fig. 1.

Measurements on food intake started during the first week of the trial over the total 22 weeks period, showing good correlation with body weight values.

### 3.2. Morphological studies

#### 3.2.1. Gross pathology

The liver and spleen/body weight ratios from undernourished mice were always lower than those from

18

E.M. Coutinho et al. / Acta Tropica 101 (2007) 15–24

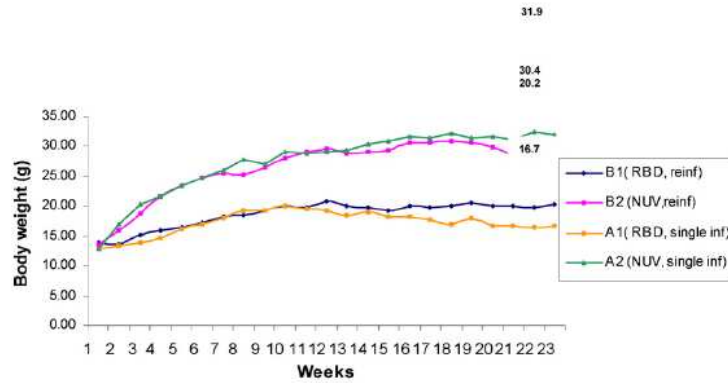


Fig. 1. Body weight of undernourished and well-nourished mice submitted to single and/or repeated infections with *Schistosoma mansoni*. Points on the curve represent the arithmetic mean of the group at each week of the trial. Numerical values on the growth curves refer to final mean body weight for each group. A1: undernourished mice, single infection; A2: well-nourished mice, single infection; B1: undernourished mice, re-infected five times; B2: well-nourished mice, re-infected five times.

their counterparts (well-nourished controls). Concerning liver weights, significant results were detected between undernourished and well-nourished mice, in both conditions of single infections or repeated infections, as well as between single infected and re-infected well-nourished animals. Undernourished mice, however, behave similarly either when single-infected or re-infected. Regarding spleen weights, a significant result was achieved between single-infected undernourished (A1) and well-nourished (A2) mice (Fig. 2).

3.2.2. Histopathology

Histologic examination showed only scattered small periportal granulomas (Fig. 3A) in undernourished single-infected mice (A1 group) and a mild non-specific reactionary hepatitis (mononuclear and polymorphonuclear eosinophils in some portal spaces and around central veins). Among well-nourished single infected mice (group A2), granulomas were larger (Fig. 3B), scattered distributed or grouped, delimited by thick collagen fibers (Fig. 3C). In this group only one animal developed the “pipestem”-like lesion, but in re-infected mice (group B2) 4 out of 16 animals showed portal concentration of periportal granulomas, associated with fibrotic expansion, development of thin fibrous tracts connecting portal spaces, and vascular neofor- mation, reproducing the histologic picture of murine “pipestem”-like fibrosis (Fig. 3D and E). In three additional animals a mixed histologic picture was detected (scattered circumoval granulomas and “pipestem”-like fibrosis). So, periportal fibrosis occurred in approximately 44% of the mice in group B2. Single infected and

clear eosinophils in some portal spaces and around central veins). Among well-nourished single infected mice (group A2), granulomas were larger (Fig. 3B), scattered distributed or grouped, delimited by thick collagen fibers (Fig. 3C). In this group only one animal developed the “pipestem”-like lesion, but in re-infected mice (group B2) 4 out of 16 animals showed portal concentration of periportal granulomas, associated with fibrotic expansion, development of thin fibrous tracts connecting portal spaces, and vascular neofor- mation, reproducing the histologic picture of murine “pipestem”-like fibrosis (Fig. 3D and E). In three additional animals a mixed histologic picture was detected (scattered circumoval granulomas and “pipestem”-like fibrosis). So, periportal fibrosis occurred in approximately 44% of the mice in group B2. Single infected and

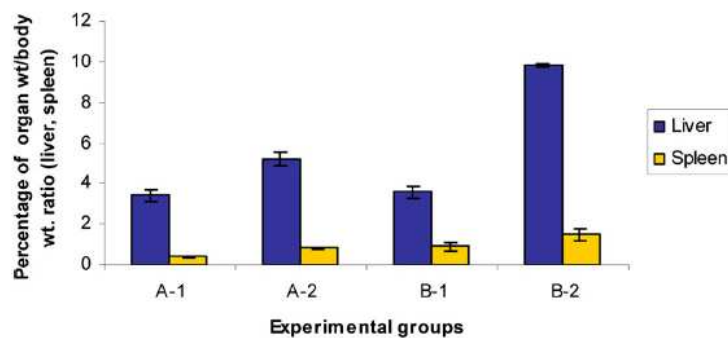


Fig. 2. Organomegaly (liver, spleen) in undernourished and well-nourished mice submitted to single and/or repeated infections with *S. mansoni*. A1: undernourished mice, single infection; A2: well-nourished mice, single infection; B1: undernourished mice, re-infected five times; B2: well-nourished mice, re-infected five times.



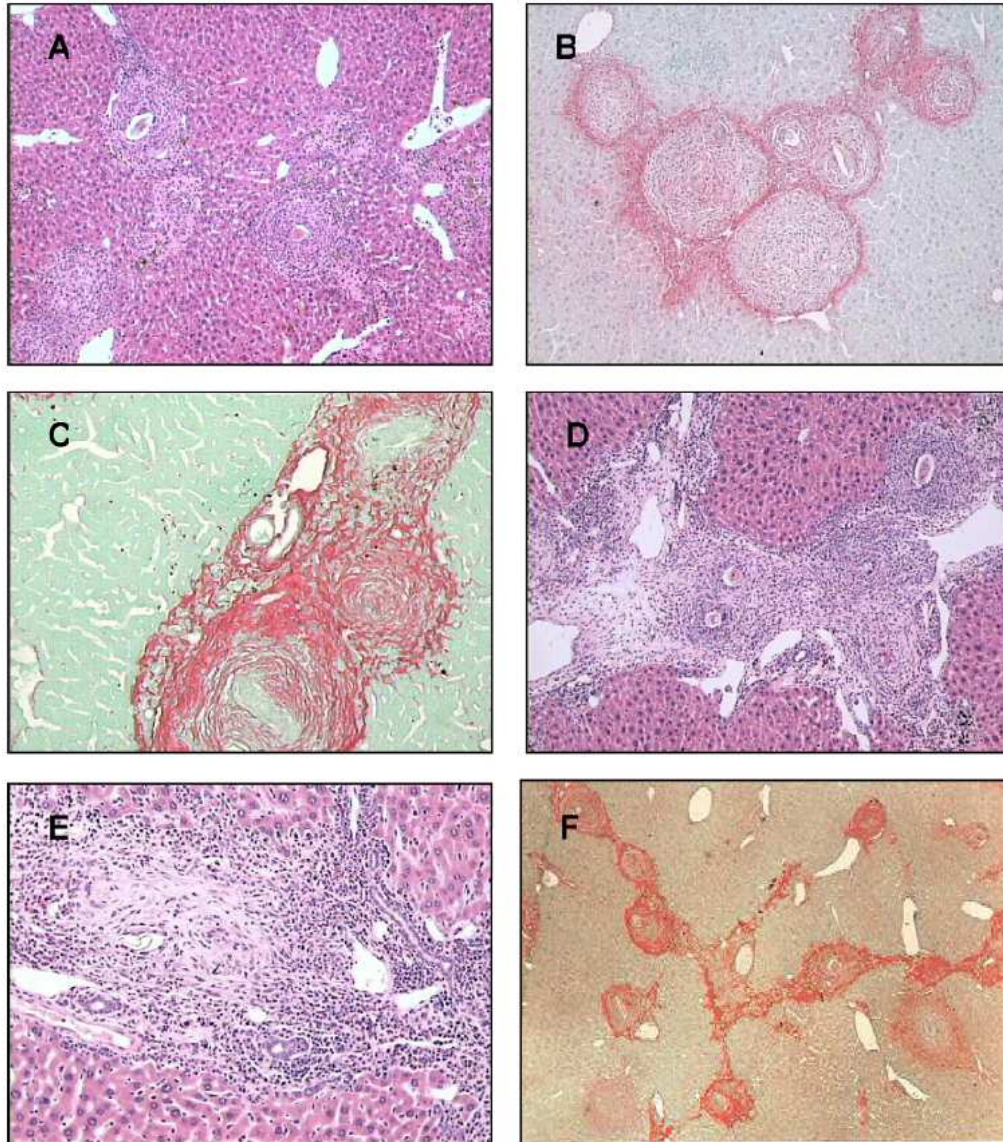


Fig. 3. Liver histopathology in single infected and re-infected mice: (A) scattered small periovular granulomas of the exudative type around degenerated eggs of *S. mansoni* (single infected undernourished mouse), hematoxylin and eosin 100 $\times$ ; (B) enlarged fibrotic granulomas around eggs of *S. mansoni* (single-infected well-nourished mouse), picosirius-red 100 $\times$ ; (C) circumoval granulomas with deposition of dense collagen (single-infected well-nourished mouse), picosirius-red 200 $\times$ ; (D) "pipestem" murine fibrosis in a re-infected well-nourished mouse (enlarged portal space with inflammatory infiltrate, periovular granulomas and vascular neoformation), hematoxylin and eosin 100 $\times$ ; (E) higher magnification of a fibrotic plaque in "pipestem"-like murine liver fibrosis (re-infected well-nourished mouse), hematoxylin and eosin 200 $\times$ ; (F) fibrous strands connecting scattered circumoval granulomas (re-infected undernourished mouse), picosirius-red 100 $\times$ .

re-infected undernourished mice, however, did not show "pipestem"-like fibrosis, although thin fibrous strands could eventually be seen from one portal-space to the other (Fig. 3F).

### 3.3. Morphometric analysis

In each group (except in group A1 with 9 mice), ten random mice were submitted to morphometric analy-

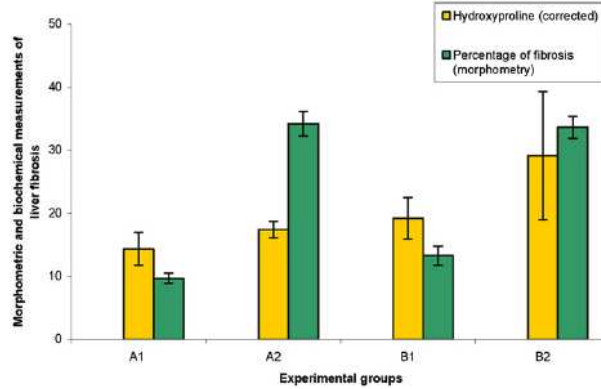


Fig. 4. Morphometric and biochemical evaluations of total liver fibrosis in undernourished and well-nourished mice with a single and/or multiple infections with *S. mansoni*. Values for hepatic collagen were initially determined as micromoles per gram of liver and then corrected for intensity of infection by dividing the hydroxyproline content in the whole liver by the number of eggs in the whole liver, results being expressed for 10,000s (Cheever, 1986). A1: undernourished mice, single infection; A2: well-nourished mice, single infection; B1: undernourished mice, re-infected five times; B2: well-nourished mice, re-infected five times.

sis. Liver fibrosis measured as percentage of the hepatic tissue was markedly lower in single undernourished mice, with a slight but not significant increase seen in re-infected undernourished animals. A significant difference was noted between single-infected undernourished

and well-nourished animals ( $p=0.001$ ). Differences between well-nourished single infected and re-infected mice, as well as between undernourished single infected and re-infected animals were not statistically significant (Fig. 4). Granuloma size was significantly higher

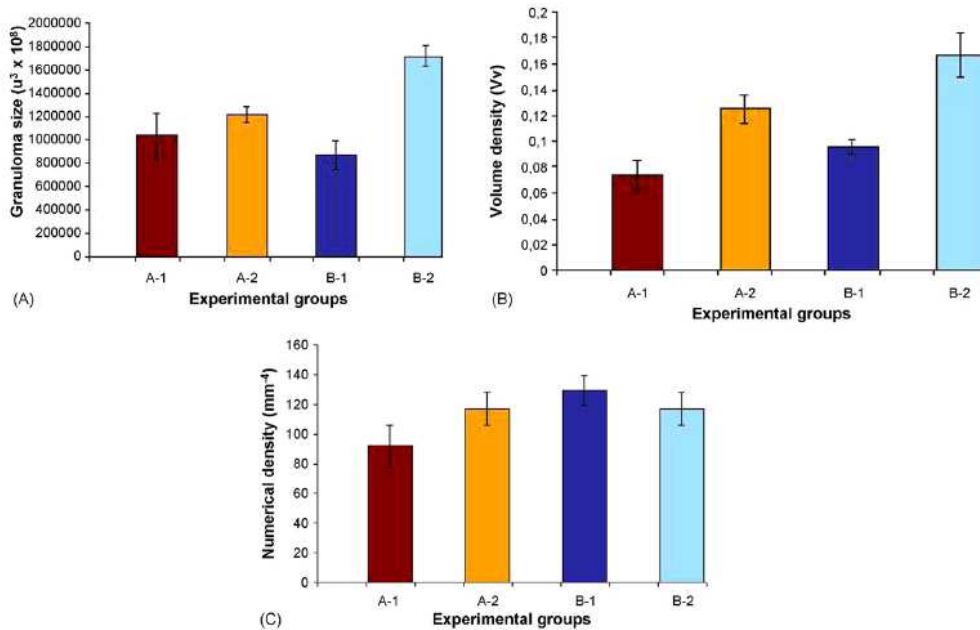


Fig. 5. Morphometric parameters (A, granuloma size; B, volume density; C, numerical density of circumoval granulomas) in the liver of undernourished and well-nourished mice submitted to single and/or repeated infections with *S. mansoni*. A1: undernourished mice, single infection; A2: well-nourished mice, single infection; B1: undernourished mice, re-infected five times; B2: well-nourished mice, re-infected five times.

in re-infected well-nourished mice, when compared to single infected well-nourished and single or re-infected undernourished animals. Volume density ( $V_v$ ) showed marked differences between undernourished and well-nourished mice, either single-infected or re-infected, with higher values for the re-infected well-nourished animals. Numerical density ( $N_n$ ), however, did not differ significantly among the groups (Fig. 5A–C).

3.4. Biochemical study

Hydroxyproline levels were lower in undernourished mice, either single-infected or re-infected as compared to well-nourished controls. A significant difference was found between re-infected undernourished (B1) and well-nourished mice (B2) regarding collagen (hydroxyproline) content, with higher values for the last group. However, hydroxyproline content in the whole liver did not differ significantly between single-infected and re-infected groups. Regarding total liver fibrosis (Fig. 4), biochemical data showed good correlation with morphometric measurements.

3.5. Parasitological data

Total worm burdens appear in Fig. 6. Statistical differences were detected between single-infected and re-infected undernourished mice, as well as between single-infected undernourished and well-nourished animals.

Egg burdens calculated for the whole liver after tissue digestion showed highest values for re-infected mice (Fig. 6). Significant differences were also found between groups A1 (single-infected, undernourished) and A2 (single-infected, well-nourished), higher values for the

latter; as well as between groups A1 (single-infected, undernourished) and B1 (re-infected, undernourished).

4. Discussion

Hepatic fibrosis, regardless of its cause, is a response to chronic liver injury, including that provoked by infection with *S. mansoni*. It is characterized by an increase in extracellular matrix constituents that collectively form the hepatic scar (Friedman, 1993). This scar consists of fibril forming collagens (Types I and III), as well as matrix glycoconjugates, including proteoglycans, fibronectin, and hyaluronic acid (Rojkind et al., 1979; Gressner and Bachem, 1990; Bissel, 1990). Current knowledge indicate that the fibrogenic cascade is initiated in the subendothelial space of Disse (Grimaud and Borojevic, 1977) and that the hepatic lipocyte (perisinusoidal or Ito cell) is the principal effector. In infected mice treated with Vitamin A, this cell was found in large numbers as a constituent of periportal granulomas and within areas of septal fibrosis (Barbosa Jr. et al., 1993).

In *S. mansoni* chronically infected mice, hepatic fibrosis is mainly associated with the circumoval granulomas (Dunn et al., 1977), although portal collagen deposition not associated with granulomas may be also present (Cheever, 1965). Normal mouse livers contain approximately 0.6mg of collagen per gm wet liver, whereas the *S. mansoni*-infected mouse livers contain about 10.3 mg/g wet liver, that represents a 17.6-fold increase (Wu et al., 1982). In the mouse model, repeated infections usually elicit experimental “pipestem”-like or periportal liver fibrosis in well-nourished animals and Santos et al. (2000), based on histological observations, reported the appearance of the lesion in 69.2% of re-infected mice versus 11.1% in single infected animals.

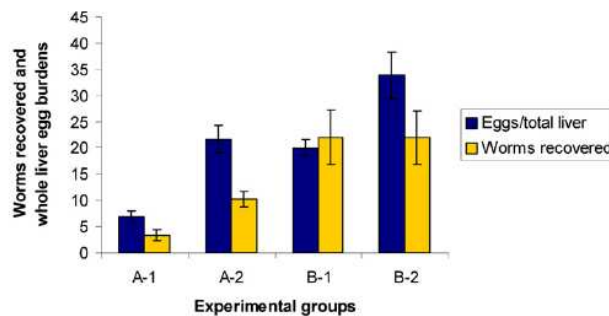


Fig. 6. Worm burden and liver tissue egg load, in undernourished and well-nourished mice submitted to single and repeated infections with *S. mansoni*. Values showed for egg columns must be multiplied by 1000. A1: undernourished mice, single infection; A2: well-nourished mice, single infection; B1: undernourished mice, re-infected five times; B2: well-nourished mice, re-infected five times.

Since in previous investigations undernourished Swiss mice submitted to mild and prolonged infections and fed on a low-protein diet were unable to reproduce liver “pipestem” fibrosis (Coutinho et al., 1997), repeated infections were performed attempting to reproduce the lesion in this experimental host. Shifting from a deficient to a balanced diet and vice-versa were not able to induce the lesion in undernourished mice (Coutinho et al., 2003), as previously tried.

In the present experiment, undernourished mice did not develop “pipestem” fibrosis, although an increased number of well-nourished re-infected control mice (44%) developed the lesion on histological examination. However, differences regarding collagen (hydroxyproline) concentration in the liver, detected by two different methods (morphometric and biochemical), were not significant when single infected and re-infected well-nourished mice were compared. The lack of association between occurrence of periportal fibrosis and higher levels of hydroxyproline in the liver of single infected BALB/c mice was reported by Silva et al. (2004).

The amount of collagen was always reduced in undernourished mice as compared to well-nourished animals, suggesting interference of the host nutritional status on the connective tissue changes of hepatic schistosomiasis in this animal model (Coutinho et al., 2003). It is known that dynamic deposition, accumulation and turnover of granuloma-associated matrix proteins occurs throughout experimental infection (Newport and Colley, 1993) and some still unclear factors and mechanisms may alter the total amount of liver fibrous tissue under different circumstances. Decreased total liver fibrosis in undernourished infected mice may result from an impaired mechanism of repair, a lower antigen load or a low production of pro-fibrotic cytokines, due to a low protein synthesis in a low-protein fed host (Oliveira et al., 2004).

In the present investigation the apparent lack of correlation between histological findings and morphometric/biochemical measurements of liver collagen in re-infected control mice is not surprising. In the chronic phase, most granulomas are immunologically modulated, reduced in size and their collagen content is not so abundant. Animals with overt periportal fibrosis usually display focal concentrations of collagen in enlarged portal spaces and less numerous scattered egg granulomas and so values detected by randomized morphometry could elicit misleading results. In effect, morphometric and biochemical measurements yielded similar results although not paralleling the histological findings regarding the occurrence of fibrosis.

Well-nourished and undernourished mice showed diverging growth curves, but the effects of re-infection

upon host nutritional status in terms of body weight gain were minimal, variations being ascribed to the type of ingested diet.

Body, liver, and spleen weights seem to vary among different mouse strains and according to Fanning et al. (1981), more than one gene appears to be involved in the inheritance of the propensity to develop severe disease. In the present trial, organomegaly in undernourished mice was always lower than in well-nourished controls, when submitted either to single or repeated infections. Liver weights were most related to the nutritional status of the mice, but the number of infections (single, repeated) may influence more directly the degree of splenomegaly. Regarding granuloma volume and hepatic fibrosis, differences have been found among some inbred strains of well-nourished mice (Dunn et al., 1980), those strains with the largest granulomas usually showing most hepatic fibrosis. According to Cheever et al. (1987), the regulation of both granuloma size and hepatic fibrosis is complex, involving genes both outside and within the major histocompatibility complex, and is at least partly independent one another (Cheever, 1997). Previous experiment from our laboratories also showed the importance of the genetic background in the pathogenesis of periportal fibrosis since 4 out of 21 inbred undernourished C57BL/10 mice developed “pipestem” fibrosis when accidentally infected with a different parasite strain not usually employed in routine infection of mice in past experiments (Coutinho, 2004).

As expected, worm burdens were higher in well-nourished single infected mice. However, the amount of worms recovered from undernourished re-infected animals (group B1) did not differ significantly from that seen in well-nourished re-infected controls (group B2). So, it is likely that differences in liver pathology observed between the two groups were conditioned by the host response due to its nutritional status. Values concerning egg counts in hepatic tissue were presented for the whole liver, since difference in liver weight between undernourished mice and well-nourished controls could lead to misleading interpretation if data per gram of liver were used.

In this paper, attempts to induce periportal fibrosis in undernourished infected mice by repeated infections were not successful. Further investigations could focus, for instance, on the characteristics of the parasite strain to be used in mice infections, as well as on a deeper insight regarding immune response and immunoregulation in undernourished mice. A dysregulation of fibrogenic cytokine production may account for why undernourished mice do not develop “pipestem” fibrosis. According to Wyler (1992), the failure to spontaneously

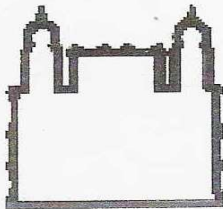
down-regulate anti-schistosomal T-cell hypersensitivity and the resultant fibrogenic cytokine production may be an essential feature of those hosts who progress to severe liver fibrosis.

## References

- Andrade, Z.A., 1987. Pathogenesis of "pipestem" fibrosis of the liver (experimental observation on murine schistosomiasis). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 325–334.
- Andrade, Z.A., Cheever, A.W., 1993. Characterization of the murine model of schistosomal hepatic periportal fibrosis ("pipestem" fibrosis). *Int. J. Exp. Pathol.* 74, 195–202.
- Barbosa Jr., A.A., 2001. Morphological computer-assisted quantitative estimation of stained fibrous tissue in liver sections: applications in diagnosis and experimental research. *J. Bras. Patol.* 37, 197–200.
- Barbosa Jr., A.A., Pfeifer, U., Andrade, Z.A., 1993. Role of fat-storing cells in schistosomal hepatic fibrosis of mice. *Virchows Arch. B: Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 64, 91–96.
- Bergman, I., Loxley, R., 1963. Two improved and simplified methods for the spectrophotometric determination of hydroxyproline. *Anal. Biochem.* 35, 1961–1965.
- Bissel, D.M., 1990. Cell–matrix interaction and hepatic fibrosis. *Prog. Liver Dis.* 9, 143–155.
- Cheever, A.W., 1965. A comparative study of *Schistosoma mansoni* infections in mice, gerbils, multimammate rats, and hamsters II Qualitative pathological differences. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14, 229–238.
- Cheever, A.W., 1968. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion technique for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull. WHO* 39, 328–331.
- Cheever, A.W., 1970. Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. *Bull. WHO* 43, 601–603.
- Cheever, A.W., 1986. The intensity of experimental schistosome infections modulates hepatic pathology. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 35, 124–133.
- Cheever, A.W., 1997. Differential regulation of granuloma size and hepatic fibrosis in schistosome infections. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 92, 689–692.
- Cheever, A.W., Duvall, R.H., Hallack Jr., T.A., Minker, R.G., Malley, J.D., Malley, K.G., 1987. Variation of hepatic fibrosis and granuloma size among mouse strains infected with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37, 85–97.
- Coura, J.R., 1975. Follow up of patients with schistosomiasis living in non-endemic area in Brazil. *Bras. Med.* 2, 45–47.
- Coura, J.R., Wanke, B., Figueiredo, N., Argento, C.A., 1974. Evolutionary pattern of schistosomiasis and life-span of *Schistosoma mansoni* in patients living in non-endemic area of Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 8, 193–198.
- Coutinho, E.M., 1980. Patobiologia da desnutrição nas doenças parasitárias. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 75, 63–76.
- Coutinho, E.M., 2004. Malnutrition and hepatic fibrosis in murine schistosomiasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 99 (Suppl. I), 85–92.
- Coutinho, E.M., Barros, A.F., Barbosa Jr., A., Oliveira, S.A., Silva, L.M., Araújo, R.E., Andrade, Z.A., 2003. Host nutritional status as a contributory factor to the remodeling of schistosomal hepatic fibrosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98, 919–925.
- Coutinho, E.M., Freitas, L.P.C.G., Abath, F.G.C., 1992. The influence of the regional basic diet from Northeast Brazil on health and nutritional conditions of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 25, 13–20.
- Coutinho, E.M., Souza, M.M., Silva, L.M., Cavalcanti, C.L., Araújo, R.E., Barbosa Jr., A.A., Cheever, A.W., Andrade, Z.A., 1997. Pathogenesis of schistosomal "pipestem" fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of "pipestem" fibrosis in mice. *Int. J. Exp. Pathol.* 78, 337–341.
- Dunn, M.A., Cheever, A.W., Dean, D.A., Duvall, R.H., Kelley, E.P., 1980. Diminished liver fibrosis in murine schistosomiasis in an inbred mouse strain. *Clin. Res.* 28, 274A (Abstract).
- Dunn, M.A., Rojkind, M., Warren, K.S., Hait, P.K., Rifas, L., Seifter, S., 1977. Liver collagen synthesis in murine schistosomiasis. *J. Clin. Invest.* 59, 666–674.
- Duvall, R.H., DeWitt, W.B., 1967. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16, 483–486.
- Fanning, M.M., Peters, P.A., Davis, R.S., Kazura, J.W., Mahmoud, A.A.F., 1981. Immunopathology of murine infection with *Schistosoma mansoni*: relationship of genetic background to hepatosplenic disease and modulation. *J. Infect. Dis.* 144, 148–153.
- Friedman, S.L., 1993. The cellular basis of hepatic fibrosis. Mechanisms and treatment strategies. *N. Engl. J. Med.* 328, 1828–1835.
- Gressner, A.M., Bachem, M.G., 1990. Cellular sources of noncollagenous matrix proteins: role of fat-storing cells in fibrogenesis. *Semin. Liver Dis.* 10, 30–46.
- Grimaud, J.A., Borojevic, R., 1977. Chronic human *Schistosomiasis mansoni*: pathology of the Disse's space. *Lab. Investigation* 36, 268–273.
- Henderson, G.S., Nix, N.A., Montesano, M.A., Gold, D., Freeman Jr., G.L., McCurley, T.L., Colley, D.G., 1993. Two distinct pathological syndromes in male CBA/J inbred mice with chronic *Schistosoma mansoni* infections. *Am. J. Pathol.* 142, 703–713.
- Junqueira, L.C.U., Bignolas, G., Brentani, R., 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. *Histochem. J.* 11, 447–455.
- Newport, G.R., Colley, D.G., 1993. Schistosomiasis. In: Warren, K.S. (Ed.), *Immunology and Molecular Biology of Parasitic Infections*, 3rd ed. Blackwell Science Publication, Boston, pp. 387–437.
- Oliveira, S.A., Silva, L.M., Barbosa Jr., A.A., Ribeiro-dos-Santos, R., Coutinho, E.M., Andrade, Z.A., Soares, M.B.P., 2004. Decreased humoral and pathologic responses in undernourished mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.* 93, 30–35.
- Potter, J.J., Mezey, E., 2002. Leptin deficiency reduces but does not eliminate the development of hepatic fibrosis in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Liver* 22, 173–177.
- Potter, J.J., Rennie-Tankesley, L., Mezey, E., 2003. Influence of leptin in the development of hepatic fibrosis produced in mice by *Schistosoma mansoni* infection and by chronic carbon tetrachloride administration. *J. Hepatol.* 38, 281–288.
- Rojkind, M., Giambone, M.-A., Biempica, L., 1979. Collagen types in normal and cirrhotic liver. *Gastroenterology* 76, 710–719.
- Santos, A.B.A., Souza, M.M., Andrade, Z.A., 2000. Reinfecções e desenvolvimento da fibrose periportal esquistossomótica no modelo murino. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 33, 197–200.
- Silva, L.M., Oliveira, S.A., Ribeiro-dos-Santos, R., Andrade, Z.A., Soares, M.B.P., 2004. Comparison of immune response of *Schistosoma mansoni*-infected mice with distinct chronic forms of the disease. *Acta Trop.* 9, 189–196.
- Symmers, W.St.C., 1904. Note on a new form of liver cirrhosis due to the presence of the ova of *Bilharzia haematobia*. *J. Pathol. Bacteriol.* 9, 237–239.

- Teodósio, N.R., Lago, E.S., Romani, S.A.M., Guedes, R.C.A., 1990. A regional basic diet from Northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch. Lat. Am. Nutr.* 40, 533–547.
- von Lichtenberg, L., Sadun, E.H., 1968. Experimental production of bilharzial "pipestem" fibrosis in the chimpanzee. *Exp. Parasitol.* 22, 264–278.
- Warren, K.S., 1966. The pathogenesis of clay pipestem cirrhosis in mice with chronic *Schistosomiasis mansoni*, with a note on the longevity of the schistosomes. *Am. J. Pathol.* 49, 479–489.
- Weibel, E.R., 1969. Stereological principles for morphometry in electron microscopic cytology. *Int. Rev. Cytol.* 26, 235–302.
- Wu, C.H., Giambrone, M.-A., Howard, D.J., Rojkind, M., Wu, G.Y., 1982. The nature of the collagen in hepatic fibrosis in advanced murine *Schistosomiasis*. *Hepatology* 2, 366–371.
- Wyler, D.J., 1992. Molecular and cellular basis of hepatic fibrogenesis in experimental *Schistosomiasis mansoni* infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 87 (Suppl. IV), 117–125.

## Anexo A: Certificado de aprovação da Comissão de Ética no uso de Animais



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

# CERTIFICADO

**C**ertificamos que o protocolo intitulado “Resposta imune humoral e celular na esquitossomose mansônica crônica do camundongo desnutrido e suas relações com a fibrogênese hepática” sob a responsabilidade de Dra. Eridan de Medeiros Coutinho, foi licenciado pelo nº L-0028/07 e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi APROVADO pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-FIOCRUZ). Na presente formatação, este programa está licenciado e tem validade até 30 de agosto de 2011.

Rio de Janeiro, 30 de agosto de 2007.

Octavio Augusto França Presgrave  
Coordenador da CEUA  
FIOCRUZ