

DANIELA LONGO GARGIULO

*ESTUDO DAS CITOCINAS ENVOLVIDAS NO  
AGRAVAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE  
EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS COM  
ALERGIA ALIMENTAR*

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial para obtenção do grau de doutor  
em Biologia Celular.

Orientadora: Denise Carmona Cara Machado

Co-orientador: Mauro Teixeira Martins

**2006**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

---

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neuro Imuno Patologia Experimental (NIPE) do Departamento de Patologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contamos com apoio financeiro da CAPES, CNPq, FAPEMIG, PRPq-UFMG.

## **AGRADECIMENTOS**

*À Deus, que sempre guiou meus passos, me deu dons preciosos e colocou pessoas iluminadas em meu caminho ;*

*Aos meus familiares, pelo incentivo, em especial à minha irmã Paula e ao meu sobrinho Vítor;*

*À professora e amiga Denise Carmona Cara Machado pela amizade de todos estes anos, oportunidade, confiança e ensinamentos transmitidos.*

*Aos colegas do Departamento de Patologia Geral, professores, estagiários e alunos que durante estes quase dez anos fizeram parte de minha vida, em especial ao amigo Wanderson remanescente da “velha guarda”.*

*A Luana e Cláudia, pela enorme ajuda e companherismo.*

*A professora Rosa Arantes, pela amizade, preciosa colaboração e ajuda constante.*

*Ao professor Paulo Marcos Zech Coelho, pelo carinhoso acolhimento, colaboração e preciosos ensinamentos;*

*Ao professor Mauro Teixeira Martins pela orientação e importantes sugestões.*

*Ao professor Wagner Luís Tafuri, pela amizade e apoio.*

*A Janaína Cláudia, pela cumplicidade, parceria, excelente convívio e aprendizado de todos estes anos de amizade. Este trabalho também pertence à você.*

*A Universidade Federal de Minas Gerais em particular ao Departamento de Patologia Geral por ter me abrigado, nutrido e transformado.*

*A todos os monitores do Uni-BH que com muita compreensão e competência me auxiliaram nas atividades docentes e me divertiram com alegre convívio;*

*Aos amigos Gisele, Hermann, Denize e Raphael pela ajuda nos momentos difíceis.*

*Aos novos colegas e professores do Uni-BH e a todos que de alguma maneira contribuíram com este trabalho, meu sincero agradecimento.*

*“Sou a pessoa que aprendeu...  
...que ter uma criança adormecida nos braços  
é um dos momentos mais pacíficos do mundo;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que ser gentil é mais importante do que estar certo;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que eu sempre posso fazer uma oração por alguém  
quando não tenho a força para ajudá-lo de alguma outra forma;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que não importa quanta seriedade a vida exija de você,  
cada um de nós precisa de um amigo brincalhão para se divertir junto;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que algumas vezes tudo o que precisamos é de uma mão para  
segurar e um coração para nos entender;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que os passeios simples com meu pai em volta do quarteirão  
nas noites de verão quando eu era criança fizeram maravilhas  
para mim quando me tornei adulto;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que deveríamos ser gratos a Deus por não nos dar tudo que lhe pedimos;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que dinheiro não compra "classe";*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que são os pequenos acontecimentos diários que tornam a vida  
espetacular;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que debaixo da "casca grossa" existe uma pessoa  
que deseja ser apreciada, compreendida e amada;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que Deus não fez tudo num só dia; o que me faz pensar que eu possa?*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que ignorar os fatos não os altera;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que quando você planeja se nivelar com alguém,  
apenas está permitindo que essa pessoa continue a magoar você;  
Sou a pessoa que aprendeu...  
...que o AMOR, e não o TEMPO, é que cura todas as feridas;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que a maneira mais fácil para eu crescer como pessoa  
é me cercar de gente mais inteligente do que eu;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que cada pessoa que a gente conhece deve ser saudada com um sorriso;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que ninguém é perfeito até que você se apaixone por essa pessoa;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que a vida é dura, mas eu sou mais ainda;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que as oportunidades nunca são perdidas;  
alguém vai aproveitar as que você perdeu.*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que quando o ancoradouro se torna amargo  
a felicidade vai aportar em outro lugar;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que devemos sempre ter palavras doces e gentis  
pois amanhã talvez tenhamos que engoli-las;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que um sorriso é a maneira mais barata de melhorar sua aparência;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que não posso escolher como me sinto,  
mas posso escolher o que fazer a respeito;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que todos querem viver no topo da montanha,  
mas toda felicidade e crescimento ocorrem quando você está escalando-a;*

*Sou a pessoa que aprendeu...  
...que só se deve dar conselho em duas ocasiões:  
quando é pedido ou quando é caso de vida ou morte;*

***Sou a pessoa que aprendeu...  
...que quanto menos tempo tenho, mais coisas consigo fazer."***

**William Shaskeape**

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1:</b> Ciclo de vida do verme trematodeo.....                                           | 10 |
| <b>Figura 2</b> –Desenvolvimento da resposta imune durante a infecção com.....                    | 14 |
| <b>Figura 3</b> –Mensuração da área de granuloma hepático.....                                    | 25 |
| <b>Figura 4</b> -Produção de IL4 no tecido.....                                                   | 30 |
| <b>Figura 5</b> – Produção de IL13 no tecido .....                                                | 32 |
| <b>Figura 6</b> - Produção de IL10 no tecido.....                                                 | 34 |
| <b>Figura 7</b> - Produção de IFN $\gamma$ no tecido.....                                         | 36 |
| <b>Figura 8</b> Produção de TNF $\alpha$ no tecido.....                                           | 38 |
| <b>Figura 9-</b> Avaliação de anticorpos IgG1 e IgE 7 dias após a sensibilização secundária.....  | 40 |
| <b>Figura 10-</b> Avaliação de anticorpos IgG1 e IgE após 56 dias de ingestão de SCO ou não.....  | 42 |
| <b>Figura 11</b> Avaliação Geral.....                                                             | 45 |
| <b>Figura 12-</b> Índice de sobrevivência à infecção pelo <i>S. mansoni</i> .....                 | 47 |
| <b>Figura 13-</b> Avaliação do número de granulomas hepáticos.....                                | 50 |
| <b>Figura 14-</b> Avaliação da área dos granulomas hepáticos.....                                 | 51 |
| <b>Figura 15-</b> Avaliação de anticorpos IgG1 e IgE 7 dias após a sensibilização secundária..... | 53 |
| <b>Figura 16-</b> Avaliação de anticorpos IgG1 e IgE após 56 dias de ingestão de SCO ou não.....  | 55 |
| <b>Figura 17</b> Avaliação Geral.....                                                             | 57 |

|                                                                                                   |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 18-</b> Índice de sobrevivência à infecção pelo <i>S. mansoni</i> .....                 | 59 |
| <b>Figura 19-</b> Avaliação do número de granulomas hepáticos.....                                | 62 |
| <b>Figura 20-</b> Avaliação da área dos granulomas hepáticos.....                                 | 63 |
| <b>Figura 21-</b> Avaliação de anticorpos IgG1 e IgE 7 dias após a sensibilização secundária..... | 65 |
| <b>Figura 22-</b> Avaliação de anticorpos IgG1 e IgE após 56 dias de ingestão de SCO ou não.....  | 67 |
| <b>Figura 23</b> Avaliação Geral.....                                                             | 69 |
| <b>Figura 24-</b> Índice de sobrevivência à infecção pelo <i>S. mansoni</i> .....                 | 71 |
| <b>Figura 25-</b> Avaliação do número de granulomas hepáticos.....                                | 74 |
| <b>Figura 26-</b> Avaliação da área dos granulomas hepáticos.....                                 | 75 |
| <b>Figura 27-</b> Avaliação de anticorpos IgG1 e IgE 7 dias após a sensibilização secundária..... | 77 |
| <b>Figura 28-</b> Avaliação de anticorpos IgG1 e IgE após 56 dias de ingestão de SCO ou não.....  | 79 |
| <b>Figura 29</b> Avaliação Geral.....                                                             | 81 |
| <b>Figura 30-</b> Índice de sobrevivência à infecção pelo <i>S. mansoni</i> .....                 | 83 |
| <b>Figura 31-</b> Avaliação do número de granulomas hepáticos.....                                | 86 |
| <b>Figura 32-</b> Avaliação da área dos granulomas hepáticos.....                                 | 87 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                                  |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>Tabela 1:</b> Comparação parasitológica e morfológica entre os grupos selvagens e IL4 <sup>-/-</sup> infectados com <i>S. mansoni</i> alérgicos e não alérgicos.....          | <b>48</b> |
| <b>Tabela 2:</b> Comparação parasitológica e morfológica entre os grupos selvagens e IL10 <sup>-/-</sup> infectados com <i>S. mansoni</i> alérgicos e não alérgicos.....         | <b>60</b> |
| <b>Tabela 3:</b> Comparação parasitológica e morfológica entre os grupos selvagens e IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> infectados com <i>S. mansoni</i> alérgicos e não alérgicos..... | <b>72</b> |
| <b>Tabela 4:</b> Comparação parasitológica e morfológica entre os grupos selvagens e iNOS <sup>-/-</sup> infectados com <i>S. mansoni</i> alérgicos e não alérgicos.....         | <b>84</b> |

## LISTA DE ABREVIATURAS

- $\text{Al(OH)}_3$  = Hidróxido de alumínio
- AV = Altura do vilo
- DO = Densidade óptica
- DTH = Hipersensibilidade do tipo tardia
- ELISA = *Enzyme linked immunosorbent assay*
- $\text{H}_2\text{O}_2$  = Peróxido de hidrogênio
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  = Ácido sulfúrico
- HE = Hematoxilina-Eosina
- $\text{IFN}\gamma$  = Interferon gama
- Ig = Imunoglobulina
- IL = Interleucina
- MHC = Complexo Principal de Histocompatibilidade
- nm = nanômetro
- NO = Óxido nítrico
- OVA = Ovo-albumina, albumina da clara de ovo
- PAF = Fator ativador de plaquetas
- PGD2 = Prostaglandinas
- PBS = Salina tamponada com fosfato
- PCA = Anafilaxia Cutânea Passiva
- SCO = Solução de clara de ovo a 20%
- $\text{TGF-}\beta$  = Fator de crescimento tumoral- $\beta$
- Th1 = Células T *helper* 1
- Th2 = Células T *helper* 2
- $\text{TNF-}\alpha$  = Fator de necrose tumoral alfa

## RESUMO

A alergia alimentar e as infecções parasitárias são desordens clínicas frequentes na infância e com alta prevalência em muitas áreas do mundo. Entretanto, a natureza da resposta imune dessas infecções em pacientes alérgicos não está totalmente esclarecida. O presente estudo procurou avaliar as citocinas presentes nesta relação em modelos experimentais de alergia alimentar e esquistossomose. Essa avaliação foi feita através das dosagens de citocinas por ELISA no fígado, intestino delgado e baço, e através da utilização de animais deficientes para as citocinas IL-4, IL-10 e IFN $\gamma$  e iNOS. A alergia alimentar foi induzida através da sensibilização de camundongos BALB/c com 10  $\mu$ g de ovalbumina em Al(OH) $_3$  no dia 0 e no dia 14. O desafio oral foi feito no dia 21 através da ingestão de solução de clara de ovo 20% (SCO). Após 28 dias da imunização primária, os animais foram infectados subcutaneamente com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni*. Na fase aguda da esquistossomose (sétima semana), foi observado um alto índice de mortalidade nos animais selvagens BALB/c alérgicos (80%) quando comparados com grupos não alérgicos. As citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e TNF $\alpha$  mostraram-se elevadas nos animais alérgicos, mas não o IFN $\gamma$ , que se mostrou diminuído nas três condições: alergia, infecção e infecção mais alergia. Animais IL4 $^{-/-}$  tiveram aumento da mortalidade, porém na condição alérgica houve aumento da sobrevivência e diminuição da área do granuloma hepático. Animais IL-10 $^{-/-}$  não alérgicos também mostraram diminuição da sobrevivência após a infecção e aumento na área granulomatosa. Na condição alérgica, animais infectados aumentaram a sobrevivência e a área granulomatosa. Camundongos IFN $\gamma$  $^{-/-}$ , não apresentaram mortalidade nem alterações morfológicas e parasitológicas na condição alérgica ou não. Os animais iNOS $^{-/-}$  também não apresentaram diferenças na mortalidade, porém tiveram o número e área granulomatosa alterados. Nossos resultados mostraram que o modelo de alergia utilizado foi capaz de desencadear modificações imunológicas que alteraram o curso da infecção. O entendimento de como o hospedeiro faz a decisão de montar as respostas Th2 durante a infecção permanece como uma área obscura e de alta prioridade, pois auxiliará na compreensão de outras patologias.

## ABSTRACT

Food allergy and parasitic infections are very frequent clinical disorders in children and are highly prevalent in many areas of the world; however the nature of the immune response to parasitic infections in allergic patients is not fully understood. Murine experimental models have been used to characterize a dynamic fluctuation in cytokine responses in experimental schistosome infection of mice. The present study examined the relationship between a helminthic infection on a model of food allergy and the role of iNOS and of the interleukins 4, 10 and IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> in the pathological process. First BALB/c mice was sensitized with ovalbumin and challenged with egg white solution, after this, they were infected with 50 *Schistosoma mansoni* cercarie. In the early achute stages of schistosomiasis the allergic mice suffered a high mortality (80%) in contrast to controls (10 to 20%). The cytokines IL-4, IL-10, IL-13 and TNF $\alpha$  were elevated on allergic animals, but IFN $\gamma$  was diminished on the three conditions: allergy, infection and infection with allergy. IL-4<sup>-/-</sup> animals had shown increased mortality, but in the allergic condition there was increased survival and a decrease on the hepatic granuloma area. IL-10<sup>-/-</sup> not allergic animals had shown decreased survival after infection and increasing of the granuloma's area. On the allergic condition, infected animals had increased survival and granuloma's area. IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice did not show mortality neither morphological and parasitological alterations on the allergic or not allergic conditions. iNOS<sup>-/-</sup> animals did not show differences on mortality, but the granuloma's area and number were altered. Our results showed that the allergy model used was able to trigger immunological modifications and alter the infection course. The understanding about how the host makes the decision to mount the Th2 responses during the infection remains an obscure and very important area because it will help other pathologies comprehension.

## SUMÁRIO

|                                                                     |           |
|---------------------------------------------------------------------|-----------|
| <i>I – INTRODUÇÃO.....</i>                                          | <i>1</i>  |
| 1.1 ALERGIA ALIMENTAR .....                                         | 2         |
| 1.2 ESQUISTOSSOMOSE .....                                           | 7         |
| 1.3 O PARADIGMA Th1 E Th2 NAS ALERGIAS E NA ESQUISTOSSOMOSE.....    | 11        |
| <i>II – OBJETIVOS.....</i>                                          | <i>16</i> |
| 2.1 – OBJETIVO GERAL .....                                          | 16        |
| 2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....                                  | 16        |
| <i>III – MATERIAS E MÉTODOS .....</i>                               | <i>18</i> |
| 3.1 ANIMAIS .....                                                   | 18        |
| 3.2 INDUÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR .....                              | 18        |
| 3.3 AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DA ALERGIA ALIMENTAR .....                | 19        |
| 3.4 OBTENÇÃO DO SORO .....                                          | 19        |
| 3.5 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINA IGG1 ANTI-OVA NO SORO.....            | 19        |
| 3.6 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS IGE ANTI-OVA NO SORO.....            | 20        |
| 3.7 AVALIAÇÃO GERAL.....                                            | 21        |
| 3.7.1 Avaliação do peso corpóreo.....                               | 21        |
| 3.7.2 Avaliação do consumo líquido.....                             | 21        |
| 3.7.3 Avaliação do consumo de ração.....                            | 21        |
| 3.8 ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL.....                               | 22        |
| 3.8.1 Parasitas.....                                                | 22        |
| 3.8.2 Obtenção das cercárias.....                                   | 22        |
| 3.8.3 Infecção com as cercárias do <i>Schistosoma mansoni</i> ..... | 22        |
| 3.9 AVALIAÇÃO DA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL.....                  | 23        |
| 3.9.1 Mortalidade e necrópsia .....                                 | 23        |
| 3.9.2 Processamento histológico e coloração.....                    | 23        |
| 3.9.3 Contagem dos granulomas.....                                  | 23        |
| 3.9.4 Mensuração dos granulomas.....                                | 24        |
| 3.9.5 Contagem de ovos nas fezes .....                              | 25        |
| 3.9.6 Perfusão do sistema porta.....                                | 26        |
| 3.10 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS .....                        | 26        |
| 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                      | 27        |
| <i>IV – RESULTADOS .....</i>                                        | <i>29</i> |

|                                                                                                                                   |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1- DOSAGEM DAS CITOCINAS .....                                                                                                  | 29  |
| 4.2 - AVALIAÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR E ESQUISTOSSOMOSE EM ANIMAIS DEFICIENTES EM IL-4 (IL-4 <sup>-/-</sup> ) .....                | 39  |
| 4.2.1 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA antes da ingestão de SCO a 20%.....                                           | 39  |
| 4.2.2 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA após a ingestão de SCO a 20% .....                                            | 41  |
| 4.2.3 - Avaliação geral .....                                                                                                     | 43  |
| 4.2.4 - Avaliação da infecção experimental.....                                                                                   | 46  |
| 4.3 - AVALIAÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR E ESQUISTOSSOMOSE EM ANIMAIS DEFICIENTES EM IL-10 (IL-10 <sup>-/-</sup> ).....               | 52  |
| 4.3.1 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA antes da ingestão de SCO a 20%.....                                           | 52  |
| 4.3.2 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA após a ingestão de SCO a 20% .....                                            | 54  |
| 4.3.3 - Avaliação geral .....                                                                                                     | 56  |
| 4.3.4 - Avaliação da infecção experimental.....                                                                                   | 58  |
| 4.4 - AVALIAÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR E ESQUISTOSSOMOSE EM ANIMAIS DEFICIENTES EM IFN $\gamma$ (IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> )..... | 64  |
| 4.4.1 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA antes da ingestão de SCO a 20%.....                                           | 64  |
| 4.4.2 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA após a ingestão de SCO a 20% .....                                            | 66  |
| 4.4.3 - Avaliação geral .....                                                                                                     | 68  |
| 4.4.4 - Avaliação da infecção experimental.....                                                                                   | 70  |
| 4.5 - AVALIAÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR E ESQUISTOSSOMOSE EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM iNOS (iNOS <sup>-/-</sup> ) .....            | 76  |
| 4.5.1 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA antes da ingestão de SCO a 20%.....                                           | 76  |
| 4.5.2 -Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA após a ingestão de SCO a 20% .....                                             | 78  |
| 4.5.3 - Avaliação geral .....                                                                                                     | 80  |
| 4.5.4 - Avaliação da infecção experimental.....                                                                                   | 82  |
| V – DISCUSSÃO.....                                                                                                                | 89  |
| 5.1 - Alergia à ovalbumina em camundongos não infectados e infectados com <i>Schistosoma mansoni</i> .....                        | 89  |
| 5.2 - Infecção pelo <i>S.mansoni</i> em camundongos não alérgicos e alérgicos à ovalbumina .....                                  | 93  |
| VI – CONCLUSÕES.....                                                                                                              | 100 |
| VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....                                                                                             | 102 |
| VIII - ANEXOS.....                                                                                                                | 108 |

# ***INTRODUÇÃO***

# **I – INTRODUÇÃO**

## **1.1 ALERGIA ALIMENTAR**

Alergia alimentar é um termo utilizado para denominar uma reação imunológica desencadeada pela ingestão de um alimento, ou aditivo alimentar, afetando alguns indivíduos previamente sensibilizados e não estando relacionada ao efeito fisiológico da substância. Nestes indivíduos, à alergia está relacionada com a presença no soro de imunoglobulinas IgE e IgG1 específicas para os antígenos alimentares.

Cerca de 20% da população dos países ocidentais sofrem de doenças alérgicas (GEHA, 2000). A maior incidência ocorre em crianças. Destas, cerca de 8% têm menos de três anos de idade (SAMPSON *et al.*, 2000).

O mecanismo envolvido na reação de hipersensibilidade imediata do tipo I é relativamente bem conhecido. Esse estado de imunização é caracterizado pelo aumento dos títulos de anticorpos IgG1, IgG4 e principalmente IgE. As reações alérgicas aos alimentos podem afetar vários órgãos: a pele (urticária, angioedema), o trato respiratório (rinite, asma) e trato gastrointestinal (diarréia, vômito, cólica), e o sistema cardiovascular (choque anafilático) (SICHERER, 2002). Os sintomas das alergias alimentares variam dependendo da idade do indivíduo, do alérgeno envolvido e da quantidade de alimento ingerida, entre outros. As reações alérgicas ao alimento ingerido podem aparecer em poucos minutos ou horas após ingestão e pode variar de leve a severo (BURKS, 1998).

Acredita-se que a interação entre o linfócitos B e a célula Th<sub>2</sub> (IL-5, IL-10, IL-13 e, principalmente, IL-4) seja responsável pela troca de isotipo para IgE (ROMAGNANI, 1994). Linhagens de células T específicas a ovalbumina têm sido encontradas em pacientes com alergia ao ovo de galinha. Alguns autores sugerem que tais células, através da secreção de IL-5, poderiam ser as responsáveis pelo infiltrado de eosinófilos nas reações alérgicas (SHIMOJO *et al.*, 1994).

As alergias alimentares são particularmente comuns durante a infância e podem afetar a altura e o peso das crianças que possuem esta patologia (CHRISTIE *et al* 2002). A alergia alimentar na fase infantil tem sido relacionada até mesmo com o desenvolvimento

de colite ulcerativa e doença de Crohn na fase adulta (GLASSMAN *et al.*, 1990), bem como a síndrome de irritabilidade intestinal em algumas crianças (BARAU & DUPONT, 1990).

A susceptibilidade às alergias alimentares é aumentada em crianças e resulta, em parte, de uma imaturidade tanto do sistema imunológico como das barreiras gastrointestinais. Em crianças geneticamente predispostas, a ingestão de antígenos estimula a produção de anticorpos IgE específicos aos antígenos alimentares. Existe uma tendência do quadro clínico da alergia ser normalizadas com a idade (BRADLEY, 1997). Alguns adultos podem perder a sensibilidade alérgica a um alimento se evitarem sua ingestão por um tempo prolongado; em outros, porém, esta alergenidade se eleva (PASTORELLO *et al.*, 1989). As razões desse fenômeno ainda não estão esclarecidas.

Mesmo frente às barreiras protetoras intestinais, os antígenos da dieta podem entrar na mucosa intestinal através das células M situadas nas placas de Peyer. Macrófagos residentes nesta placa fagocitam, processam e apresentam peptídeos unidos à molécula de histocompatibilidade principal (MHC) II para linfócitos T. Estes ativam linfócitos B comprometidos com a síntese de IgA. As células T e B migram, então, das placas de Peyer para os linfonodos mesentéricos; destes, trafegam para o ducto torácico chegando na circulação sangüínea. Da circulação, os linfócitos ativados retornam à mucosa digestiva e passam a residir na lamina própria onde irão secretar mais IgA (HELM & BUURKS, 2000).

Em algumas situações, à interação do antígeno com as células imunológicas irá conduzir a uma produção de IgE. O mecanismo responsável pelo desenvolvimento preferencial desse tipo de resposta imunológica em sujeitos atópicos não está ainda completamente esclarecido. Atenção especial tem sido dada aos possíveis papéis das células apresentadoras de antígenos, ao repertório de células T e citocinas presentes no microambiente durante a apresentação do antígeno (PICCICCI *et al.*, 2000).

Nessas condições, as células B sintetizam IgM específica ao antígeno na primeira exposição ao alérgeno. O peptídeo é então apresentado à célula T CD4<sup>+</sup> específica ao antígeno pela via MHC de classe II. A mudança de IgM para IgE requer interações entre antígeno, células B específicas e células T. As células T ativadas, secretam interleucina IL-4 e expressam o ligante CD 40, que agem sobre as células B, tornando-as plasmócitos

secretores de IgE e produzindo células B de memória. A IgE específica será secretada pelos plasmócitos e se ligarão aos mastócitos. Em um segundo contato com o antígeno, a reação imediata é iniciada. Ocorre o crosslinking de IgE pelo antígeno desencadeando a ativação e desgranulação dos mastócitos. Mediadores pré-formados como a histamina, enzimas e fatores quimiotáticos são liberados, e outros mediadores (prostaglandinas e leucotrienos) são formados. Fatores quimiotáticos são formados, prolongando assim a resposta alérgica (ANDERSON, 1997; FULEIHAN, 1998; SMARTIN *et al.*, 2001).

Esses mediadores atuarão no aumento da produção de muco (trato respiratório e digestivo), na broncoconstrição (trato respiratório) e no desequilíbrio eletrolítico com perda de íons e água, levando a um estado de diarreia e aumento da permeabilidade a macromoléculas, intensificando assim o estímulo antigênico (WASSERMAN, 1983; PLAUT, 1993). Os sintomas podem incluir uma urticária generalizada, dificuldades para respirar, edema na língua ou lábios e até choque anafilático que podem culminar na morte do paciente (BROSTOFF & GAMLIN, 2000).

Somente uns poucos alimentos são capazes de provocar uma reação de hipersensibilidade imediata, mas na teoria, qualquer proteína alimentar é capaz de causar uma reação anafilática. Em crianças, os alimentos mais comumente incriminados são: leite de vaca, ovo de galinha, soja, trigo, amendoim e os menos comuns, peixes, castanhas e crustáceos por serem introduzidos mais tardiamente na dieta (BOCK, 1986). Todavia, a acessibilidade aumentada às frutas frescas e vegetais em todos os países, e a recomendação de nutricionistas para uma dieta mais diversificada e natural têm resultado em um aumento de reações alérgicas a frutas como kiwi, papaia, grãos de gergelim, papoula e canola (SAMPSON, 2000). Indivíduos reativos ao ovo de galinha geralmente são particularmente sensíveis à clara do ovo. A ovo-albumina, ovomucóide e conalbumina são as principais proteínas alergênicas (FOX & FOSTER, 1957).

Modelos animais têm fornecido uma excelente oportunidade para examinar as consequências fisiológicas do desafio agudo com o antígeno e para elucidar os mecanismos básicos envolvidos. Uma característica consistente de todos os estudos experimentais é a especificidade da resposta ao desafio com o antígeno sensibilizador, assim como o aumento da permeabilidade do epitélio intestinal e/ou vascular seguida ao desafio em indivíduos

previamente sensibilizados. Estes dados têm resultado em novas idéias sobre os mecanismos patofisiológicos envolvidos no fenômeno.

Outro fator que parece influenciar no desenvolvimento de alergias é o contato anterior com agentes infecciosos. Pesquisas relacionadas com infecções virais mostram que, se por um lado infecções em estágios recentes da vida reduzem o risco de atopias (LOVIK 1997), por outro lado podem servir como fator de risco para sensibilização alérgica (LEBREC *et al.*, 1996). Essas diferenças de resposta se baseiam principalmente em infecções bacterianas (STOKES *et al.*, 1987), parasitoses extracelulares (JARRET & BAZIN, 1974) e intracelulares (ELSE *et al.*, 1992).

Há uma prevalência considerável de doenças alérgicas nos países desenvolvidos em detrimento aos países em desenvolvimento. (LANCET, 1996). Há também clara diferença na prevalência das alergias entre o meio rural e urbano de cada país. Por exemplo, na Etiópia a asma é mais prevalente em áreas urbanas que nas tribos e mais comum nos residentes das áreas urbanas da Alemanha do que nos residentes das fazendas rurais da Bavária (YEMANEBERHAN *et al.*, 1997).

Fatores ambientais tais como industrialização, aumento da poluição, maior exposição a antígenos domiciliares, mudanças na alimentação e amamentação, colaboram como fatores de risco nestas áreas urbanas (STRACHAN, 1989). Uma hipótese que vem sendo proposta para explicar este fato é que o controle das infecções nestes países industrializados, a melhora das condições de saneamento e higiene, vacinação e utilização de antibióticos podem alterar o sistema imunológico que acaba respondendo inapropriadamente a substâncias inócuas causando assim aumento das alergias. Esta é a tão falada “hipótese da higiene”, onde se propõe que as parasitoses e alergias não co-existem no mesmo hospedeiro por serem ambas acompanhadas por uma forte resposta imune do tipo Th2 (MASTERS & BARRET, 1985).

Existem poucas dúvidas de que a resposta Th2 e seus produtos sejam essenciais para a imunidade anti-nematódeo (BELL, 1996). Com relação às helmintoses, GODFREY (1975) observou-se uma baixa prevalência de asma em populações rurais da Gambia, a despeito de seus elevados níveis de IgE para helmintos. Uma provável explicação para o fenômeno é que a presença de helmintos na infância promove uma ativação crônica, mas compatível com a homeostase, de células Th2, particularmente nas mucosas. A ausência

desse estímulo pode levar a expressões aberrantes da imunidade tipo Th2, que é observada nas condições alérgicas (BELL, 1996).

Estudos realizados no Brasil, por ARAUJO e colaboradores (2000), em áreas rurais endêmicas da esquistossomose, mostraram uma correlação negativa entre reações a testes cutâneos positivos a aero-alérgenos comuns e infecções por *S. mansoni*. No Gabão, área endêmica de doenças parasitárias, principalmente esquistossomose e filariose, crianças apresentaram baixa reatividade a testes cutâneos com aeroalérgenos (YAZDANBAKHSI & VAN DEN BIGGELAAR, 2001). Outros trabalhos mostram que o tratamento anti-helmíntico em crianças de área endêmica, como a Venezuela, foi associado com o aumento da incidência de alergias (LYNCH *et al.*, 1993).

A primeira explicação para essa associação negativa é a “hipótese do bloqueio de IgE”. As desordens clínicas alérgicas requerem um eficiente “cross-linking” com receptores de IgE de alta afinidade nos mastócitos e basófilos (HOLT *et al.*, 1999). Infecções helmínticas são frequentemente associadas com alta produção policlonal de IgE, que não é específica para o antígeno do parasita. Se a IgE não específica satura os receptores nos mastócitos, há o impedimento para a ligação da IgE específica e conseqüente inibição da resposta de hipersensibilidade imediata aos alérgenos.

Em um editorial da Lancet em 1976, foi proposto um tratamento para se prevenir ou tratar as doenças alérgicas fundamentado na indução de altos níveis de IgE inespecífica, através de infecções artificiais com parasitas. Entretanto esta hipótese já está obsoleta e vem sendo substituída pela hiporesponsividade e citocinas anti-inflamatórias.

## 1.2 ESQUISTOSSOMOSE

O *Schistosoma* é um parasita Trematodeo que infecta o homem e outros mamíferos desencadeando a doença denominada esquistossomose causadora de considerável índice de morbidade e mortalidade em todo o mundo (WHO, 2000). Estima-se que mais de 200 milhões de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais estejam infectadas por este parasita. Dessas, 20 milhões sofrem graves consequências e 120 milhões são sintomáticos. Estima-se que cerca de 500-600 milhões de pessoas têm risco de infecção.

Das várias espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, destacam-se três: *S. mansoni* (Sambon, 1907), *S. haematobium* (Bilhartz, 1852) e *S. japonicum* (Katsurada, 1904). Dessas, só o *S. mansoni* é encontrado no Brasil.

Entre as espécies de *Schistosoma* que foram trazidas para as Américas, durante o tráfico de escravos e com os imigrantes ocidentais e asiáticos, apenas o *S. mansoni* se instalou no Brasil, seguramente pelo encontro de bons hospedeiros intermediários e pelas condições ambientais semelhantes à região de origem (MELO & COELHO, 1996).

O *Schistosoma mansoni* apresenta um ciclo biológico complexo envolvendo moluscos planorbídeos de água doce (hospedeiros intermediários), nos quais ocorre a reprodução assexuada, e várias espécies de mamíferos incluindo o homem (hospedeiros definitivos), nos quais ocorre a reprodução sexuada. A infecção pelo parasito no hospedeiro intermediário é iniciada com a penetração do miracídio no caramujo aquáticos do gênero *Biomphalaria* (PRESTON, 1910) que são seus hospedeiros intermediários (Figura 1).

A infecção natural do hospedeiro definitivo, dá-se pela penetração ativa das cercárias pela pele. Durante a penetração, as cercárias perdem sua cauda e se transformam em esquistossômulos. Estes permanecem na pele por cerca de dois dias para, posteriormente, alcançando capilares da pele, atingirem os pulmões via coração. Dos pulmões migram, principalmente pelo sistema sangüíneo para o sistema porta hepático, onde se alojam e se transformam em vermes adultos. Nesse ambiente, os vermes acasalam-se e, conseqüentemente, há postura de ovos pelas fêmeas. Alguns ovos rompem a mucosa intestinal, sendo eliminados pelas fezes. Todavia, outros ficam retidos nos tecidos do hospedeiro, sobretudo no intestino e fígado, provocando, ao redor de si,

uma reação inflamatória crônica do tipo granulomatosa que é a base fisiopatológica dessa doença.

Quando ocorrem alterações hemodinâmicas como hipertensão portal devido à fibrose periportal, há anastomoses porto-cava, que permitem que os ovos atinjam qualquer órgão. O fígado e baço aumentam de tamanho em parte dos pacientes infectados (BOROS, 1986 & PRATA, 1991).

A esquistossomose, como doença, apresenta duas fases distintas de evolução: fase aguda e fase crônica. Duas são as formas agudas da esquistossomose mansônica: não-toxêmica, muito mais freqüente, que passa despercebida sem sintomas característicos e a toxêmica, pouco comum, caracterizada pela rica sintomatologia clínica que ocorre duas ou três semanas após a infecção. Em ambas são reconhecidas duas fases evolutivas: pré e pós-postural. A fase pré-postural é provocada pela cercária, esquistossômulos e vermes adultos, comandadas principalmente pela resposta humoral do hospedeiro. A infecção se dá pela penetração ativa da cercária (fase de invasão) na pele ou mucosa, mesmo que estas estejam íntegras. Nessa fase podem ocorrer lesões da pele por cercárias e esquistossômulos, lesões nos vasos linfáticos, linfonodos, pulmões e lesões hepáticas. A fase crônica inicia-se no homem em torno de 120 dias após a infecção podendo atingir qualquer órgão. De acordo com o número de ovos por grama de fezes, podem ser classificadas como leve e moderada. Em estreita relação com a inflamação granulomatosa, desenvolve-se intensa neoformação conjuntiva nos espaço porta causando hipertensão portal e suas conseqüências. A forma intestinal também pode acontecer causando várias patologias, alterações em outros órgãos como esôfago e rins também são comuns nesta fase (PEREIRA & BOGLIOLO., 1993) .

Nas lesões pós-postural, a principal lesão é a reação inflamatória que se forma em torno dos ovos. A reação granulomatosa é uma resposta induzida pelos antígenos secretados pelo miracídio que passam através de poros ultramicroscópicos da casca do ovo e esta é a lesão principal na patogenia da esquistossomose (MOORE *et al.*, 1977).

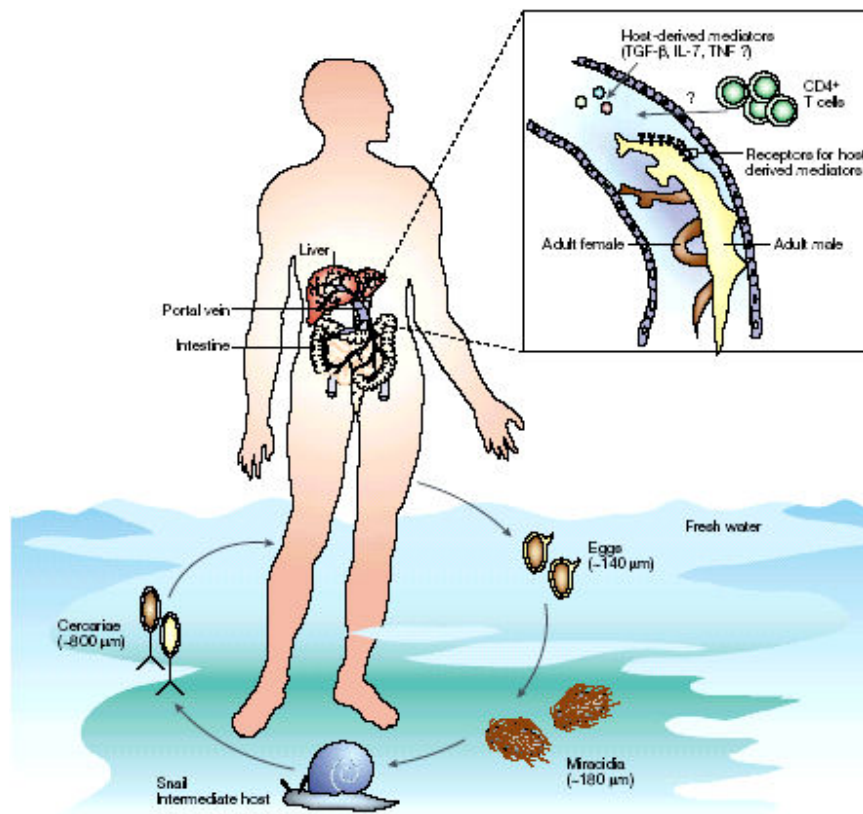
Essa reação de hipersensibilidade tardia tipo granulomatosa tem como função proteger o hospedeiro de produtos tóxicos liberados pelo ovo chamados de antígenos solúveis do ovo (SEA), e restringir o foco antigênico (WILLIAMS & WILLIAMS, 1983). A reação granulomatosa é constituída por macrófagos, eosinófilos, linfócitos, plasmócitos, células gigantes e epitelióides, mastócitos e fibroblastos (SMITH, 1977), entretanto a

constituição celular, a aparência e o tamanho sofrem mudanças com a evolução da doença (SILVA *et al.*, 2000).

A resposta ao ovo do parasita é caracterizada inicialmente com uma exsudação celular constituída de polimorfonucleares (PMN) e macrófagos que se dispõem ao redor dos ovos. Destaca-se, entre os PMN, grande número de eosinófilos. Estes podem aderir à superfície dos ovos. Logo adjacente aos ovos pode ocorrer área de necrose. Posteriormente, os macrófagos vão se transformando em células epitelióides e se organizam de forma concêntrica ao redor do ovo. Concomitantemente, verifica-se o aparecimento de células gigantes multinucleadas. Nesta fase os eosinófilos são vistos em menor densidade e mais espalhados. Há também pequeno número de linfócitos. Finalmente, inicia-se a proliferação de fibroblastos a partir da periferia do granuloma com conseqüente deposição de colágeno em orientação centrípeta relativamente ao ovo. Há progressiva redução da celularidade e, como evento final, tem-se a formação de uma cicatriz fibrosa (PEREIRA & BOGLIOLO, 1993 e de BRITO e FRANCO, 1994).

A esquistossomose é a infecção helmíntica humana que apresenta melhor reprodutibilidade da doença no modelo murino (GRYCH *et al.*, 1991). O camundongo (*Mus musculus*) tem sido intensivamente e extensivamente usado em vários estudos tais como no desenvolvimento de drogas esquistossomicidas, em estudos biológicos, bioquímicos, patológicos e imunológicos da interação parasita hospedeiro. Este animal é um excelente modelo experimental pois reproduz alguns aspectos patológicos da esquistossomose humana e permite estudos sobre regulação imunológica (WARREN *et al.*, 1958, DE WITT *et al.*, 1959, ANDRADE *et al.*, 1987; WYNN *et al.*, 1998). A infecção experimental pelo *S. mansoni* em camundongos, embora variando bastante em função de linhagens diferentes (HERNANDEZ *et al.*, 1997), segue um padrão evolutivo relativamente uniforme e amplamente semelhante ao que ocorre em humanos (WARREN, 1961 e WARREN *et al.*, 1965). A formação dos granulomas coincide com o início da postura de ovos, ou seja, cerca de 5-6 semanas após a infecção.

Estima-se que 7 a 8 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *S. mansoni* no Brasil, que é considerado hoje um dos maiores focos endêmicos (WHO, 2000).



**Figura 1: Ciclo de vida do verme trematodeo *Schistosoma mansoni*.** (PEARCE & MACDONALD, 2002).

O parasita infecta o hospedeiro definitivo, o homem, através da penetração ativa das cercárias através da pele. Os vermes adultos se alojam nas veias mesentéricas e quando atingem a maturidade sexual se acasalam liberando ovos. Estes podem atingir qualquer órgão, porém a maior parte fica presa no lúmen intestinal podendo ser conduzida ao fígado. Parte dos ovos é eliminada com as fezes e alcançando as águas e sob influência da luz e temperatura, eclodem dando origem à forma larval ciliada denominada miracídio. Esta tem pouco mais de 8 horas para encontrar e penetrar em um caramujo do gênero *Biomphalaria* que lhe servirá de hospedeiro intermediário.

### 1.3 O PARADIGMA Th1 E Th2 NAS ALERGIAS E NA ESQUISTOSSOMOSE

As citocinas representam um papel importante na diversidade funcional da resposta imune, podendo gerar efeitos sinérgicos ou antagônicos em diferentes situações. De acordo com os padrões de citocinas produzidas, os linfócitos T têm sido classificados em dois tipos: Th1 ou Th2 (MOSMANN & COFFMAN, 1989).

As células Th1 e Th2 desenvolvem-se de células T CD4<sup>+</sup> tendo uma mesma célula T precursora (Th0). Já é conhecido que, com o encontro do antígeno, as células T virgens podem se diferenciar ao longo de duas vias para se tornarem células T *helper* do tipo 1 (Th1) ou 2 (Th2), que diferem quanto ao perfil de citocinas secretadas.

Na resposta do tipo Th2 as células secretam citocinas que promovem inflamação alérgica mediada por uma eosinofilia (dependente de IL-5) e IgE (dependente de IL-4 e IL-13), assim como IL-10 que tem um amplo efeito anti-inflamatório e anti-alérgico; enquanto que na resposta tipo Th1 as células, secretam IFN- $\gamma$ , que junto com IL-12 promovem a diferenciação das células Th0 para a via Th1 (TRINCHIERI, 1995). Esta via inibe as ações de citocinas derivadas de células Th2: IL-4, IL-5, IL-13, IL-12 e IL-2, (MOORE *et al.*, 2001).

Os fatores que determinam a diferenciação da resposta Th1 ou Th2 relacionam-se às características do antígeno (tipo, dose, exposição natural), do hospedeiro (fatores genéticos, idade, histórias prévias de infecções), do ambiente (adjuvantes naturais) e das citocinas presentes durante a apresentação do antígeno (ABBAS *et al.*, 1996).

Um dos mecanismos propostos para explicar as diferentes respostas encontradas na relação parasita hospedeiro está relacionado a este paradigma Th1/Th2. Alguns patógenos estimulam preferencialmente uma resposta Th1, outros uma resposta Th2 (SCOTT, 1991; PEARCE, *et al.* 1995) e em algumas infecções parasitárias como na causada pelo *S. mansoni*, esta resposta depende do estágio de vida do parasita.

O *Schistosoma* é um parasita que exemplifica a complexidade de um patógeno que parasita o homem e desenvolve uma resposta imune celular complexa. Durante a infecção murina pelo *S. mansoni*, há uma alteração dinâmica na prevalência das respostas Th1(IL-2 e IFN $\gamma$ ) e Th2 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13) (Figura 2).

Durante as primeiras semanas da infecção há uma predominância da resposta Th1 (GRZYCH *et al.*, 1991; PEARCE *et al.*, 1995). Neste estágio inicial da infecção, a resposta Th1 é refletida por aumento de IFN $\gamma$  produzidos por células CD4 e CD8 no baço e linfonodos linfáticos de camundongos infectados (FALLON *et al.*, 1998). Coincidindo com o início da oviposição do parasita (4 – 5 semanas de infecção), a resposta Th2 superpõe a resposta Th1 inicial (GRZYCH *et al.*, 1991). A predominância da resposta Th2 em torno da 7-8 semanas de infecção está associada a uma regulação da resposta Th1 que é refletida em uma diminuição de células CD4 e CD8 (FALLON *et al.*, 1998).

Já nas alergias, a diferenciação de células T virgens para o fenótipo Th2 parece ser dependente de certas citocinas presentes nos estágios iniciais da resposta imune (HAAS, 1999). Estudos têm mostrado que as células T do sangue periférico respondem ao alérgeno *in vitro* produzindo citocinas do tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-13, e não por citocinas do tipo Th1, como IFN- $\gamma$  e IL-12 (SCOTT *et al.*, 1991); (MOSMANN, *et al.*, 1989); (ROMAGNANI, 1994); (KAY, 2000).

Animais modificados geneticamente (knockouts) têm sido muito úteis na investigação do papel das citocinas nas respostas imunes e inflamatórias. Estes animais são especialmente úteis na investigação de genes que não podem ser facilmente inibidos por anticorpos ou outros meios, é o caso de diversas quimiocinas, citocinas e seus respectivos receptores.

A interleucina-4 (IL-4) tem um papel importante em várias áreas da biologia das células T, incluindo o desenvolvimento da resposta Th2 (KOPF *et al.*, 1993) e também são importantes por bloquear o mecanismo Th1 mediado por IFN $\gamma$ , tal como a indução de iNOS (BOGDAN, *et al.*, 1994).

A infecção pelo *S. mansoni* em animais deficientes para IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) causou uma falha no desenvolvimento de uma resposta Th2 e a produção de elevados níveis de mediadores inflamatórios, tais como IFN $\gamma$  e NO, desenvolvendo severa caqueccia e morte por não conseguir formar granulomas adequados (FALLON *et al.*, 2002). Nesses animais há um aumento na produção de NO em esplenócitos cultivados que foi correlacionada a uma maior severidade da doença (BRUNET *et al.*, 1997). Outra característica na infecção de camundongos IL-4<sup>-/-</sup> é a falha desses animais no desenvolvimento da esplenomegalia, condição característica da infecção nos animais selvagens (VASCONCELOS *et al.*, 2001).

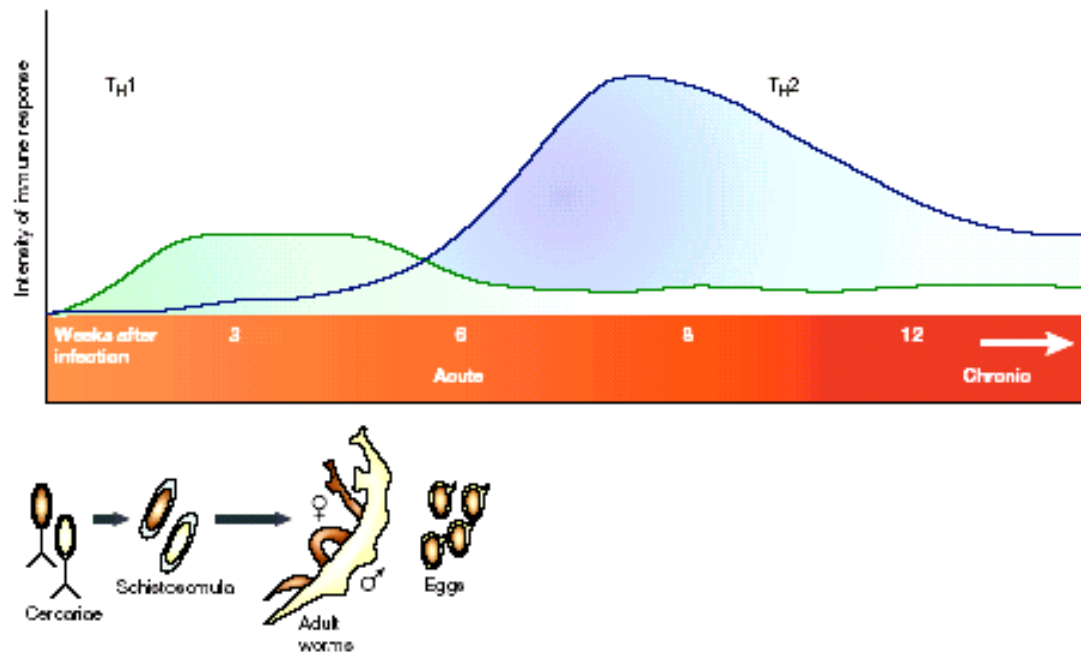
Camundongos tratados com aminoguanidina, um inibidor seletivo de iNOS, exibem caqueccia e exacerbada patologia hepática sugerindo que o NO limita os danos hepáticos quando este é exposto ao ovo do parasita (BRUNET *et al.*, 1999).

Camundongos deficientes em IL-10 mantêm um perfil Th1 durante toda a infecção levando a um aumento da morbidade e da mortalidade durante a fase aguda da infecção (WYNN *et al.*, 1998) e pode resultar em uma patologia hepática granulomatosa mais severa. O aumento da produção de IL-10, tanto em animais quanto em humanos têm sido correlacionados com diminuição da suscetibilidade de atopias e auto-imunidade durante a schistosomíase.

Dados de experimentos realizados durante o nosso mestrado, mostraram que animais BALB/c alérgicos têm uma resposta modificada à infecção experimental pelo *S. mansoni*, marcada por uma prematura e drástica mortalidade na sétima semana de infecção, onde ocorre a transição da predominância do tipo de resposta Th1 para Th2, que coincide com o início da oviposição parasitária. Outra interferência observada nestes animais foi o tamanho da reação inflamatória granulomatosa contra o ovo do parasita no fígado que se mostrou significativamente menor neste grupo (GARGIULO, 2002).

SALDANHA em 2002, também mostrou modificações na relação parasita hospedeiro em animais alérgicos infectados com *Leishmania major*. Estes animais tiveram um desenvolvimento menor da lesão, bem como uma maior produção de NO por macrófagos peritoneais frente a este parasita.

Nos dois casos, a alergia interferiu na relação parasita hospedeiro. Neste trabalho, procuramos estudar, com base no balanço das citocinas Th1/Th2, os mecanismos envolvidos na mudança do hospedeiro alérgico frente ao *Schistosoma mansoni*.



**Figura 2** Desenvolvimento da resposta imune durante a infecção com *Schistosoma mansoni*. (PEARCE & MACDONALD, 2002) A resposta imune possui três fases distintas. Nas primeiras 3-5 semanas após a infecção, o parasita imaturo induz uma resposta dominante do tipo Th1. Com a maturação do parasita (5-6 semanas) a resposta do tipo Th1 começa a decair e se inicia uma forte resposta do tipo Th2. Esta resposta é induzida primeiramente pelos antígenos dos ovos do parasita (cerca de 300 por dia). A partir da sétima semana há uma diminuição progressiva da resposta TH2 com a formação granulomatosa que inicialmente protege o hospedeiro mas com a substituição fribrotica gera uma forte hepatotoxicidade.

## ***OBJETIVOS***

## II – OBJETIVOS

### 2.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel das citocinas no mecanismo modulatório da infecção experimental por *Schistosoma mansoni* em camundongos com alergia alimentar.

### 2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Investigar o tipo de resposta imunológica durante a infecção pelo *Schistosoma mansoni* em BALB/c infectados alérgicos e respectivos controles, através da dosagem de citocinas IL-4 , IFN $\gamma$  e IL-10 no intestino e fígado na sétima semana pós-infecção que justifiquem a mortalidade precoce e a diferença no recrutamento celular nos granulomas destes animais.
- Avaliar o papel das citocinas no modelo da alergia alimentar através dos seguintes parâmetros: emagrecimento e produção de IgE e IgG1 anti-ovalbunina no soro em animais selvagens BALB/c e C57BL6 e em camundongos deficientes para IL-4, IFN $\gamma$ , IL-10 e iNOS;
- Avaliar a modulação da infecção experimental por *Schistosoma mansoni* em camundongos submetidos previamente a um processo de alergia alimentar experimental e seus respectivos controles apenas infectados que interfira na mortalidade, número e tamanho dos granulomas hepáticos e intestinais, número de parasitas e ovos excretados nas fezes em animais selvagens BALB/c e C57BL6 e em camundongos deficientes para IL-4 , IFN $\gamma$ , IL-10 e iNOS .

## ***METODOLOGIA***

### **III – MATERIAS E MÉTODOS**

#### **3.1 ANIMAIS**

Foram utilizados camundongos fêmeas e machos, jovens, das linhagens BALB/C selvagens e deficientes para a citocina IL-4 e IL-12, e camundongos C57BL/6 selvagens e deficientes em IFN $\gamma$ , IL-10 e iNOS. Os animais deficientes foram obtidos através de matrizes mantidas sob responsabilidade da Prof<sup>a</sup> Leda Quércia Vieira, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais das linhagens selvagens serão fornecidos pelo CEBIO. Todos os animais são mantidos em estantes climatizadas no Biotério do Departamento de Patologia Geral. Antes de cada experimento os camundongos passaram por protocolo de vermifugação, via oral, com solução de Ivermectina 1% (CHEMITEC, Brasil) por sete dias consecutivos. Ao final de todos os experimentos, a eutanásia é feita através de deslocamento cervical em animais anestesiados com xilazina e quetamina. Os procedimentos realizados estão de acordo com os estabelecidos pelo CETEA (Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG).

Os camundongos foram divididos em quatro grupos: controle, alérgico, infectado e infectado alérgico. Para a investigação da participação de citocinas na reação alérgica, foram usados 5 animais em cada grupo experimental (controle e alérgico) das linhagens BALB/c, C57BL/6, IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>, IL-10<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup> e IL-4<sup>-/-</sup>, perfazendo um total de 70 animais. Para o estudo da interferência da alergia na infecção experimental por *S. mansoni* foram usadas as mesmas linhagens supracitadas, porém contendo 10 animais por grupo, perfazendo um total de 140 animais.

#### **3.2 INDUÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR**

A indução da alergia alimentar foi realizada através da injeção de ovalbumina OVA (10 $\mu$ g) adsorvida em hidróxido de alumínio Al(OH)<sub>3</sub> (1 mg) via sub-cutânea. Os animais receberam uma segunda imunização 14 dias depois e tiveram como única fonte líquida

solução de água contendo clara de ovo a 20% do sétimo dia após a segunda imunização até o final do experimento.

### **3.3 AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA DA ALERGIA ALIMENTAR**

A dosagem foi feita através do teste de E.L.I.S.A. (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) para os anticorpos IgG1 anti-OVA e IgE anti-OVA.

### **3.4 OBTENÇÃO DO SORO**

Sangrias foram feitas através dos vasos retroorbitais e axilar em animais anestesiados com uma mistura de Xilazina (10mg/kg) e Ketamina (100mg/Kg). Após coagulação, o sangue obtido foi centrifugado por 10 minutos a 900G e o soro congelado para dosagem de imunoglobulinas anti-OVA.

### **3.5 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINA IgG1 ANTI-OVA NO SORO**

A dosagem de IgG1 foi feita através do teste de ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), que, resumidamente, segue a metodologia descrita a seguir: microplacas de poliestireno (Nunc, Roskilde, Denmark) foram incubadas *overnight* (4°C), com 2 µg de OVA diluídos em 100 µl por poço de tampão carbonato concentrada pH=9,6 (*Coating Buffer*). Após 18 horas, as placas foram lavadas duas vezes com salina fisiológica contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA Chemical Co., St Louis, MO, USA – solução salina tween) e incubadas, por uma hora, com 200 µl de solução de caseína a 25% em PBS (PBS-caseína), por poço, para bloqueio, à temperatura ambiente. A solução de bloqueio foi desprezada e as placas incubadas, por 1 hora, com 100µl por poço de seis diluições seriadas dos soros a serem testados, iniciando com a diluição 1:100 (fator de diluição seriada = 0,5, diluições 1:100 a 1:12800). As placas foram lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas por 1 hora (37°C) com 100µl, por poço de uma solução com anticorpos de cabra anti-IgG1 de camundongo (*Goat anti-mouse IgG1*, (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA), diluídos a 1:20000. As placas foram novamente lavadas com salina-Tween e incubadas por 1 hora (37°C) com anticorpos de coelho anti-

IgG de cabra conjugados com peroxidase (*Rabbit anti-goat IgG – HRP*, Southern Biothecnology Associates, Birmingham, AL, USA). As placas foram novamente lavadas seis vezes com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 100 µl por poço de tampão citrato (pH=5,0) contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ortofenileno-diamino (OPD). Após 20 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 20µl por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2%. Em todas as placas foi corrido um controle positivo padrão (*pool* de soros de animais imunes), um controle negativo (*pool* de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). A densidade óptica foi obtida em Leitor de ELISA com filtro de 490 nm. Os resultados foram amostrados em unidades arbitrárias (U.A.) da melhor diluição das amostras (3600) usando o soro controle positivo como sendo 1000 unidades.

### **3.6 DOSAGEM DE IMUNOGLOBULINAS IgE ANTI-OVA NO SORO**

Microplacas de poliestireno serão incubadas a 4°C, com antígeno IgE de rato anti-camundongo na concentração de 1:250 diluídos em 50µl de tampão carbonato pH 9.6, por poço, durante uma noite. Posteriormente, as placas serão lavadas com salina-Tween e incubadas por 1 hora com 200µl de solução caseína a 0,25% em PBS, por poço, para bloqueio à temperatura ambiente. A solução será desprezada e as placas incubadas por 2 horas com 50µl por poço de soro total dos animais a serem testados. As placas serão lavadas com solução salina-Tween e incubadas por 1 hora à temperatura ambiente com 1µl de OVA-Biotina em 50µl de PBS-caseína, por poço. As placas serão novamente lavadas com salina-Tween e incubadas, no escuro, com 50µl por poço de estreptoavidina-peroxidase na concentração de 1:6000 por 45 minutos à temperatura ambiente. As placas serão lavadas com salina-Tween e incubadas, protegidas da luz, por 15 minutos à temperatura ambiente com 100µl, por poço, de tampão citrato pH=5.0 contendo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e ortofenileno-diamino (OPD). As reações serão interrompidas, após 15 minutos, pela adição de 20µl por poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N. Em todas as placas será corrido um controle positivo padrão (*pool* de soros de animais imunes), um controle negativo (*pool* de soros de animais normais), além de um controle da própria placa (branco). A densidade óptica será obtida em

Leitor de ELISA com filtro de 490 nm. Os resultados foram amostrados em unidades arbitrárias (U.A.) a partir do padrão positivo considerado como 1000 unidades.

### **3.7 AVALIAÇÃO GERAL**

#### **3.7.1 Avaliação do peso corpóreo**

Todos os animais foram pesados individualmente, uma vez por semana, em balança digital, a fim de se avaliar a variação do peso corporal ao longo de todo o experimento. O peso corporal final de cada grupo foi obtido através da média dos pesos.

#### **3.7.2 Avaliação do consumo líquido**

As mamadeiras contendo água ou clara de ovo a 20% foram pesadas e trocadas diariamente, a fim de se avaliar o consumo líquido diário de cada grupo.

#### **3.7.3 Avaliação do consumo de ração**

Todos os grupos receberam ração "*ad libitum*" ao longo de todo experimento. Para controle do consumo, a ração foi pesada antes e depois de ser colocada nas gaiolas, a partir da imunização primária (1ª semana). Esta pesagem foi realizada com balança digital.

### **3.8 ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL**

#### **3.8.1 Parasitas**

Em todos os experimentos foi utilizada a linhagem L.E. de *Schistosoma mansoni*, isolada de um paciente de Belo Horizonte e mantida durante mais de 30 anos por passagens sucessivas entre hamsters (*Mesocricetus auratus*) e caramujos *Biomphalaria glabrata* nos laboratórios do Grupo Interdepartamental de Estudos sobre Esquistossomose (GIDE), situado no Instituto de Ciências Biológicas (ICB), UFMG.

#### **3.8.2 Obtenção das cercárias**

Para a emergência das cercárias, os planorbídeos infectados foram colocados em um béquer contendo água sem cloro e expostos à iluminação artificial indireta durante duas horas. Após este período, os caramujos foram retirados do béquer e as cercárias concentradas, segundo técnica de Pellegrino & Macedo (1955). As cercárias foram contadas e ajustado o número de cercárias desejadas no volume do inóculo (0,5 ml).

#### **3.8.3 Infecção com as cercárias do *Schistosoma mansoni***

Todos os grupos foram infectados sete dias após o desafio, através da inoculação sub-cutânea de 0,5 ml da suspensão aquosa, diretamente no dorso dos camundongos, com auxílio da seringa (BD CornWall de 2 cc e agulha 20 x 10), contendo cerca de 50 cercárias. Os grupos que continham 20 animais, foram divididos em dois grupos de 10 animais. Um grupo foi mantido para se observar a mortalidade e o outro para ser sacrificado e analisado.

### **3.9 AVALIAÇÃO DA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL**

#### **3.9.1 Mortalidade e necrópsia**

Os animais eram observados diariamente e o número de mortos era anotado a fim de se fazer uma curva da mortalidade natural pelo parasita, nos quatro grupos experimentais que continham 10 animais cada. Paralelamente, outros dois grupos contendo 10 animais cada, após sete semanas da infecção sub-cutânea, foram sacrificados e necropsiados, sendo coletados o fígado, baço e intestino delgado para análise histopatológica.

#### **3.9.2 Processamento histológico e coloração**

Os fígados obtidos dos animais infectados foram seccionados em três fragmentos em porções previamente padronizadas e representativas do órgão. O intestino delgado foi lavado com salina fisiológica, aberto com o auxílio de tesoura cirúrgica e enrolado em toda sua extensão na forma de "rocambole". Os baços foram seccionados em dois fragmentos. O material foi fixado em formol tamponado a 10%. Posteriormente os cortes foram processados em histotécnico automatizado, que desidratou o material em soluções sucessivas de álcoois (70 a 100° GL), clarificou os tecidos com xilol e incluiu as peças em parafina. Os blocos assim obtidos foram seccionados em cortes de 4 µm de espessura, realizados em micrótomo (American Optical). Posteriormente os cortes histológicos foram corados pela técnica Hematoxilina-Eosina (HE) para a avaliação histológica da lesão, assim como contagem e morfometria dos granulomas.

#### **3.9.3 Contagem dos granulomas**

Foram confeccionadas lâminas de fígado e intestino. No fígado, três fragmentos de cada animal (n=5) foram seccionados e examinados em microscópio óptico (OLYMPUS B 201) com objetiva de 10X, onde todos os granulomas foram contados com o auxílio de um contador manual. Cada fragmento hepático foi mensurado através de imagens com o

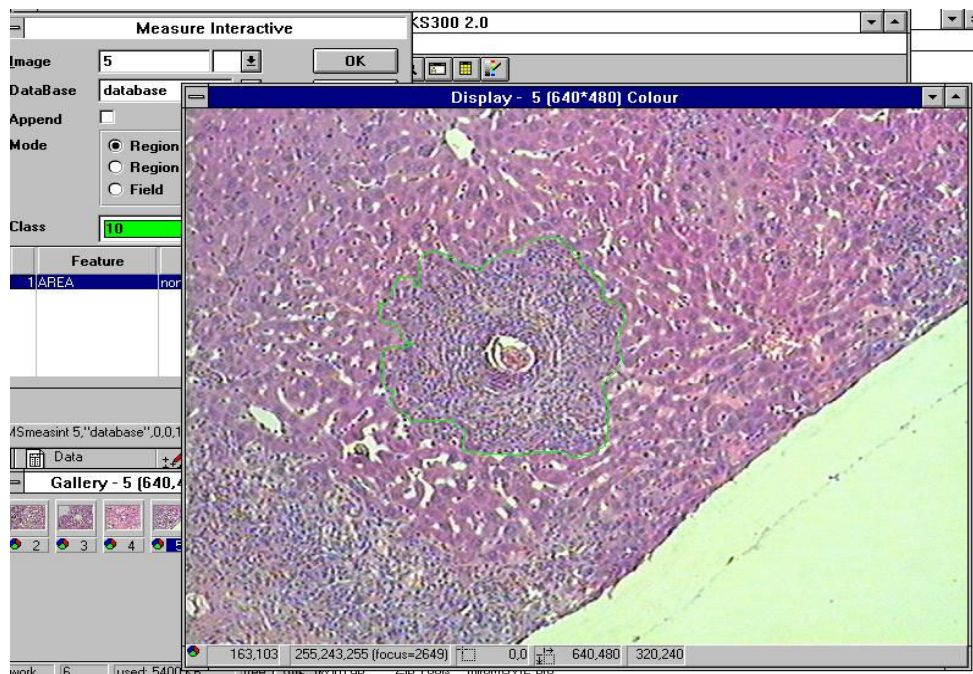
programa KS 300, versão 2.0 da Kontron Elektronik (CALIARI, 1997), para a obtenção da área em  $\text{cm}^2$ . O número de granulomas de cada fragmento foi então dividido pela sua respectiva área, obtendo-se o número de granulomas por  $\text{cm}^2$  de cada fragmento. Foi feita uma média do número destes granulomas por animal e depois por grupo. Os fragmentos de intestino delgado foram seccionados em quatro porções e enrolados em toda sua extensão na forma de "rocambole", todos os granulomas presentes foram contados.

Os critérios utilizados consideraram como um único granuloma aquele que apresentava um ou mais de um ovo mas apenas uma única reação inflamatória envolvendo-os e como granulomas individuais aqueles que apresentavam sua reação inflamatória particular. Os que se mostravam coalescentes, porém com reações distinguíveis, foram considerados granulomas diferentes. Os ovos esquistossomóticos presentes no fígado que não apresentavam reação inflamatória granulomatosa, também foram contados separadamente.

### **3.9.4 Mensuração dos granulomas**

Foram escolhidos aleatoriamente três granulomas por fragmento hepático e intestinal. Cada animal do grupo ( $n=5$ ) teve três fragmentos hepáticos avaliados, portanto nove granulomas hepáticos e 12 intestinais foram mensurados por animal. Cada medida foi realizada três vezes em cada granuloma, sendo a área final definida como a média das três medidas obtidas. O único critério utilizado nesta escolha foi granulomas bem delimitados e não coalescentes, com ovo viável na região central.

Para essa mensuração utilizou-se um analisador de imagens digital da Kontron Elektronik, programa KS 300; versão 2.0., como mostrado na figura 3. A medida foi expressa em  $\mu\text{m}^2$ .



**Figura 3 - Mensuração da área de granuloma hepático (HE) no analisador de imagens Kontron Elétronic, programa KS 300 2.0.** A linha verde delimita a área do granuloma. A área total do campo microscópico corresponde a 871.392  $\mu\text{m}^2$ .

### 3.9.5 Contagem de ovos nas fezes

Foram contados os ovos do *Schistosoma mansoni* expelidos nas fezes dos camundongos que foram infectados com 50 cercárias, após sete semanas de infecção. Utilizou-se o método de sedimentação Lutz ou de Hoffmann, (Pons & Janer, 1953). A técnica foi modificada para a quantificação dos ovos obtidos. Cada animal teve 3g de fezes colhidas e diluídas em 3ml de salina, depois de diluídas foram passadas em gaze dobrada em quatro partes. O material foi ressuspensionado por três vezes em formol tamponado. Três amostras contendo 100  $\mu\text{l}$  dessa solução foram usadas para contagem dos ovos em microscópio óptico por animal. Posteriormente fez-se a média deste número por animal e depois a média do grupo. O valor foi expresso em número de ovos/grama de fezes.

### **3.9.6 Perfusão do sistema porta**

Cinco animais de cada grupo foram submetidos à perfusão portal para a contagem e diferenciação sexual dos vermes adultos, segundo a técnica de Pellegrino & Siqueira, 1956.

### **3.10 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS**

Os níveis das citocinas IL-4, IL-10 e IFN $\gamma$  foram quantificados por ELISA (REES *et al* 1999) no intestino delgado e fígado de animais selvagens infectados e não infectados, alérgicos e não alérgicos. Cem miligramas de tecido foram retirados durante a necrópsia, mantidos a temperatura de -20°C e, posteriormente homogeneizados com PBS contendo antiproteases (0.1 mM PMSF, 0,1 nM benzethonium clorídrico, 10 mM EDTA e 20 KI aprotinina A) e 0,05% Tween20. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 3000 g e o sobrenadante imediatamente utilizado para o ensaio de ELISA diluído de 1:5. Placas de ELISA foram cobertas com anticorpo policlonal anti-IL-4, IL-10 e IFN $\gamma$  de camundongo (1-2  $\mu$ g/ml) e incubadas a 4° C por 24 horas. As placas foram lavadas 3 vezes e então a reação bloqueada com albumina bovina 1% e deixadas em agitador horizontal durante 1 hora. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com amostras ou citocinas recombinantes de rato de um dia para o outro (“overnight”). Os anticorpos policlonais biotinizados foram usados com diluição de 1:1000 ou 1:2000. A detecção foi feita utilizando-se estreptoavidina e OPD como substrato. A curva padrão foi construída com as concentrações de 1000, 500, 250, 125, 60, 30 e 15 pg/mL. A leitura foi realizada a 490 nm.

### **3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Diferenças nas respostas entre grupos relacionados foram realizadas pela ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA). Para comparações pareadas entre grupos controle e experimentais, foi utilizado o TESTE T DE STUDENT e correção de Bonferroni.

## ***RESULTADOS***

## IV – RESULTADOS

Dados de experimentos realizados durante o mestrado mostraram que animais BALB/c alérgicos, quando infectados com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni*, apresentam prematura e drástica mortalidade (80%) na sétima semana de infecção, período inicial da oviposição parasitária e de alterações na resposta imunológica do hospedeiro que passa a ser predominantemente Th2. Já nos grupos controles esta mortalidade nesta mesma semana, não ultrapassa 20%. Outra interferência da alergia observada nesses animais foi o tamanho da reação inflamatória granulomatosa contra o ovo do parasita no fígado que se mostrou significativamente menor ou mesmo inexistente nesse grupo (GARGIULO, 2002).

Para avaliar se a alergia está alterando o perfil das citocinas na infecção foram dosadas : IL-10, IL-4, IL-13, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  no fígado, intestino delgado e baço de animais SV alérgicos e não alérgicos na sétima semana de infecção.

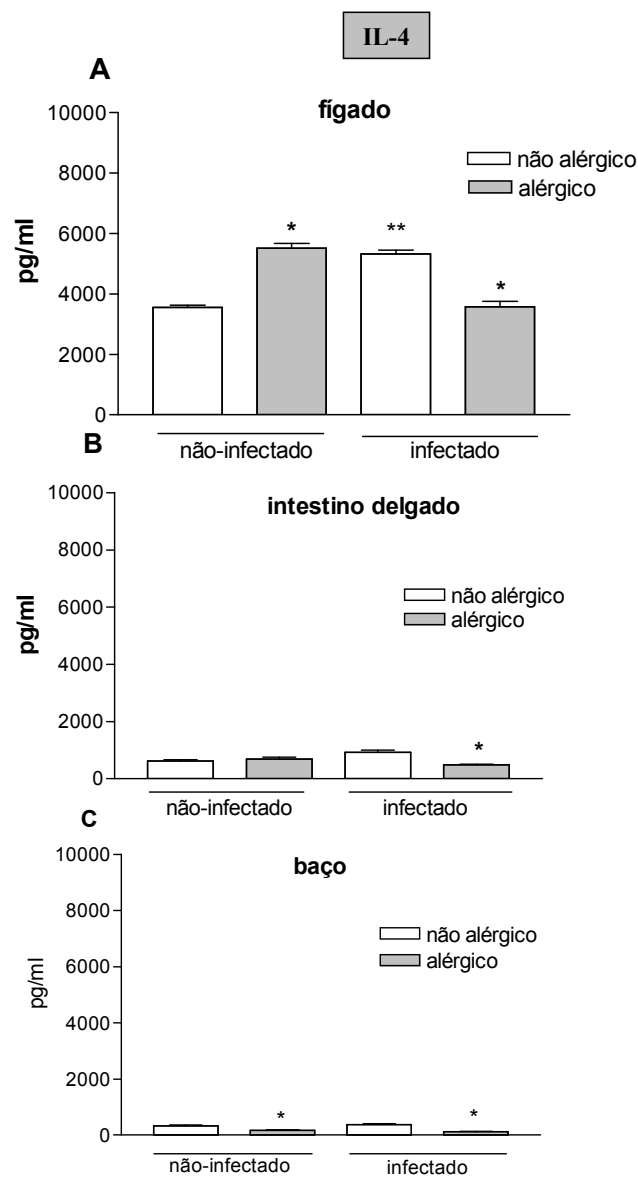
### 4.1- DOSAGEM DAS CITOCINAS

#### *A alergia foi capaz de diminuir os níveis de IL-4 no fígado e no intestino de animais infectados*

Os níveis de IL-4 foram dosados no fígado, intestino e baço de animais SV alérgicos e não alérgicos, não infectados e infectados. Nos animais não infectados essa dosagem foi feita quatro semanas após o desafio oral e nos animais infectados, sete semanas após a infecção, período da predominância da resposta do tipo Th2 e do início da mortalidade observada nos animais alérgicos infectados.

Os animais não infectados alérgicos apresentaram aumento dos níveis de IL-4 no fígado quando comparados aos não alérgicos (Figura 5A). Já no intestino delgado não foram observadas diferenças significativas entre esses dois grupos (Figura 5B).

Os animais infectados apresentaram níveis elevados de IL-4 no fígado, porém quando alérgicos, apresentam níveis significativamente menores dessa citocina no fígado e intestino (Figura 5). Não foi detectada a presença desta citocina no baço em nenhum dos grupos analisados.



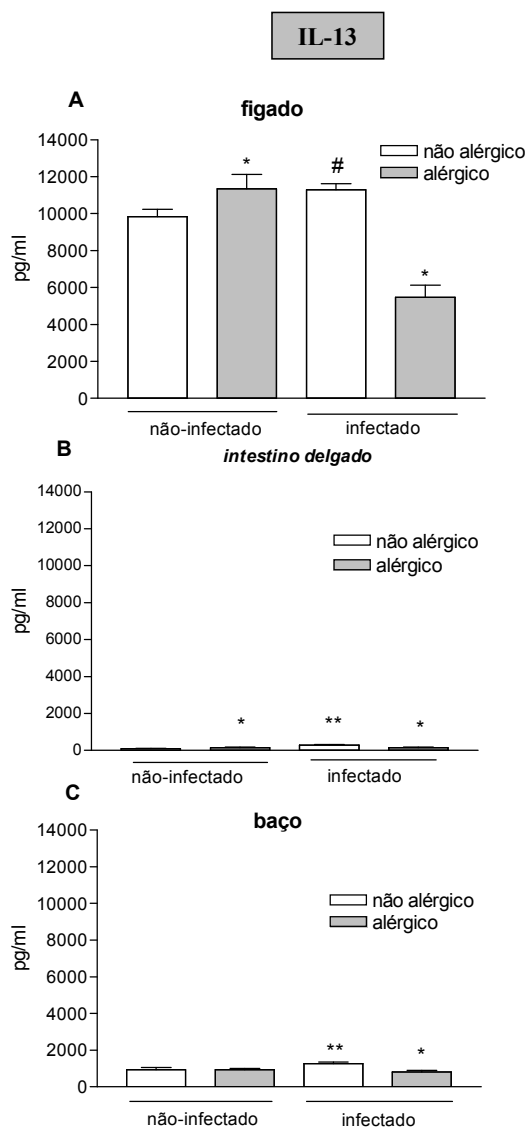
**FIGURA 4 – Produção de IL-4 no tecido.** Os níveis de IL-4 foram dosados no figado (A) e intestino delgado (B) dos animais selvagens (BALB/c) alérgicos e não alérgicos. Camundongos receberam 10 µg OVA com Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 (s.c.), reforço de 10 µg OVA no dia 14 e solução de clara de ovo a 20% (SCO) no dia 21. Os grupos não infectados foram sacrificados após quatro semanas de consumo de SCO. Os grupos infectados receberam 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28 e foram sacrificados sete semanas após a infecção. Fragmentos teciduais foram analisados quanto à produção de citocinas. A, dosagem de IL-4 no figado. B, níveis de IL-4 no intestino delgado. C, níveis de IL-4 no baço. Os dados foram obtidos das médias dos níveis de citocinas detectadas em teste de duplicata. \* ( $p < 0,05$ ) comparado grupo não alérgico. \*\* ( $p < 0,05$ ) comparado ao grupo não-infectado. (ANOVA-Test T-Student).

***A alergia foi capaz de diminuir os níveis de IL-13 no fígado e intestino de animais infectados***

Os níveis de IL-13 foram dosados no fígado, intestino e baço de animais SV alérgicos e não alérgicos, não infectados e infectados. Nos animais não infectados essa dosagem foi feita quatro semanas após o desafio oral e nos animais infectados, sete semanas após a infecção.

Os animais alérgicos não infectados apresentaram níveis elevados de IL-13 no fígado e intestino quando comparados aos seus controles não alérgicos (Figuras 5A e B).

Os níveis de IL-13 estão elevados em todos os tecidos analisados nos grupos não alérgicos quando comparados aos animais não infectados também não alérgicos. Porém os animais infectados alérgicos apresentam diminuição nos níveis dessa citocina quando comparados aos seus respectivos grupos não alérgicos também infectados (Figura 5).



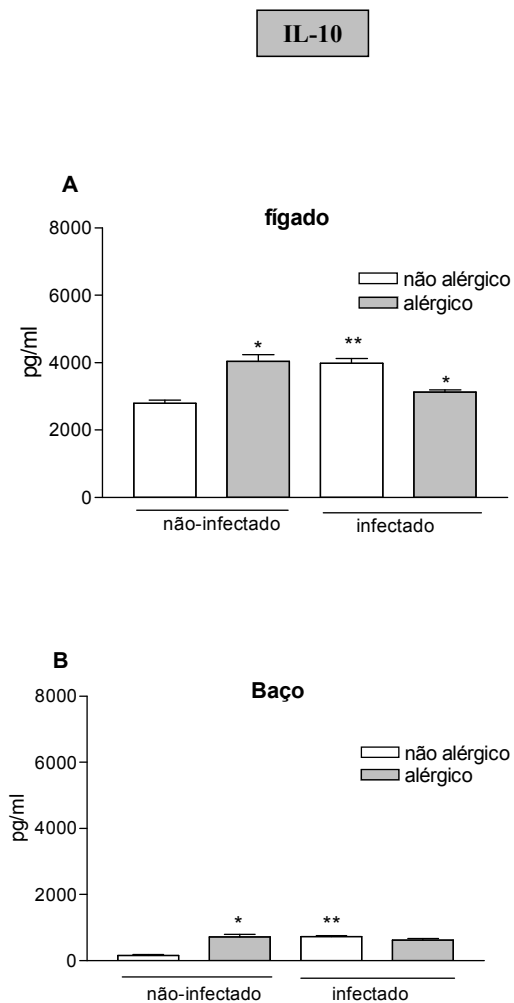
**FIGURA 5 – Produção de IL-13 no tecido.** Os níveis de IL-13 foram dosados no fígado (A) e intestino delgado (B) dos animais selvagens (BALB/c) alérgicos e não alérgicos. Camundongos receberam 10 µg OVA com Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 (s.c.), reforço de 10 µg OVA no dia 14 e solução de clara de ovo a 20% (SCO) no dia 21. Os grupos não infectados foram sacrificados após quatro semanas de consumo de SCO. Os grupos infectados receberam 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28 e foram sacrificados sete semanas após a infecção. Fragmentos teciduais foram analisados quanto à produção de citocinas. A, dosagem de IL-13 no fígado. B, níveis de IL-13 no intestino delgado. C, níveis de IL-13 no baço. Os dados foram obtidos das médias dos níveis de citocinas detectadas em teste de duplicata. \*( $p < 0,05$ ) comparado ao grupo não alérgico. \*\* ( $p < 0,05$ ) comparado ao grupo não-infectado. (ANOVA-Test T-Student).

***A IL-10 mostrou-se elevada na alergia, porém seus níveis foram diminuídos quando associada à infecção***

Os níveis de IL-10 foram dosados no fígado, intestino e baço de animais SV alérgicos e não alérgicos, não infectados e infectados. Nos animais não infectados essa dosagem foi feita quatro semanas após o desafio oral e nos animais infectados, sete semanas após a infecção.

Os animais alérgicos não infectados apresentaram níveis elevados de IL-10 no fígado e baço quando comparados aos seus controles não alérgicos (Figura 6A e B).

Os níveis de IL-10 estão significativamente elevados em todos os tecidos analisados nos grupos não alérgicos infectados quando comparados aos animais também não alérgicos não infectados (Figura 6). Já os infectados alérgicos apresentaram diminuição nos níveis dessa citocina no fígado quando comparados aos seus respectivos grupos controles não alérgicos (Figura 6). Não foi detectada a presença desta citocina no intestino delgado de nenhum dos grupos analisados.



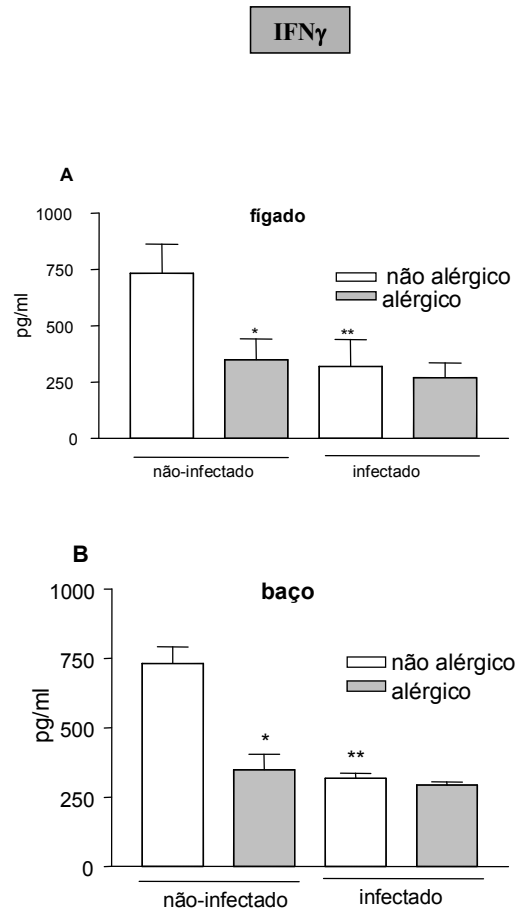
**FIGURA 6 – Produção de IL-10 no tecido.** Os níveis de IL-10 foram dosados no figado (A) e intestino delgado (B) dos animais selvagens (BALB/c) alérgicos e não alérgicos. Camundongos receberam 10 µg OVA com Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 (s.c.), reforço de 10 µg OVA no dia 14 e solução de clara de ovo a 20% (SCO) no dia 21. Os grupos não infectados foram sacrificados após quatro semanas de consumo de SCO. Os grupos infectados receberam 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28 e foram sacrificados sete semanas após a infecção. Fragmentos teciduais foram analisados quanto à produção de citocinas. A, dosagem de IL-10 no figado. B, níveis de IL-10 no baço. Os dados foram obtidos das médias dos níveis de citocinas detectadas em teste de duplicata. \* ( $p < 0,05$ ) comparado grupo não alérgico. \*\* ( $p < 0,05$ ) comparado ao grupo não-infectado. (ANOVA-Test T-Student).

***O IFN $\gamma$  apresentou níveis baixos em especial nos grupos alérgicos***

Os níveis de IFN $\gamma$  foram dosados no fígado, intestino e baço de animais SV alérgicos e não alérgicos, não infectados e infectados. Nos animais não infectados essa dosagem foi feita quatro semanas após o desafio oral e nos animais infectados, sete semanas após a infecção.

Os animais alérgicos não infectados apresentaram níveis significativamente menores dessa citocina no fígado e baço quando comparados aos não alérgicos infectados (Figura 7A e B).

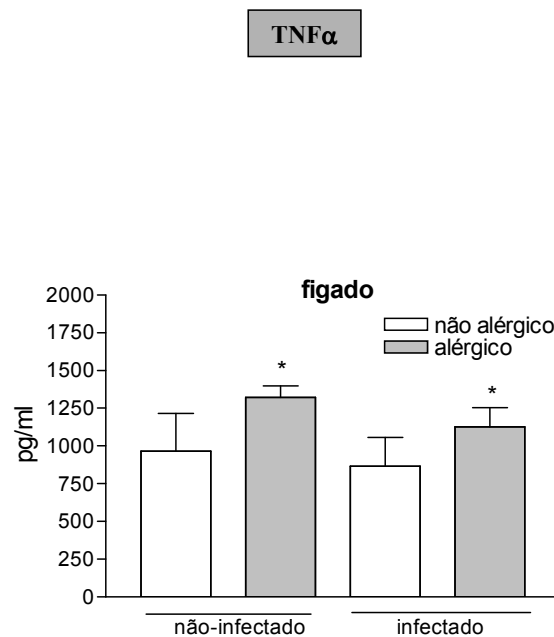
Na infecção, os níveis de IFN $\gamma$  estão significativamente diminuídos em todos os tecidos analisados nos grupos não alérgicos infectados quando comparados aos animais não alérgicos não infectados (Figura 7). Já os infectados alérgicos apresentaram diminuição ainda maior nos níveis dessa citocina no fígado e baço quando comparados aos seus controles não alérgicos também infectados (Figura 7). Não foi detectada a presença dessa citocina no intestino delgado de nenhum dos grupos analisados.



**FIGURA 7 – Produção de IFN $\gamma$  no tecido.** Os níveis de IFN $\gamma$  foram dosados no fígado (A) e intestino delgado (B) dos animais selvagens (BALB/c) alérgicos e não alérgicos. Camundongos receberam 10  $\mu$ g OVA com Al(OH) $_3$  no dia 0 (s.c.), reforço de 10  $\mu$ g OVA no dia 14 e solução de clara de ovo a 20% (SCO) no dia 21. Os grupos não infectados foram sacrificados após quatro semanas de consumo de SCO. Os grupos infectados receberam 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28 e foram sacrificados sete semanas após a infecção. Fragmentos teciduais foram analisados quanto à produção de citocinas. A, dosagem de IFN $\gamma$  no fígado. B, níveis de IFN $\gamma$  no baço. Os dados foram obtidos das médias dos níveis de citocinas detectadas em teste de duplicata. \* ( $p < 0,05$ ) comparado grupo não alérgico. \*\* ( $p < 0,05$ ) comparado ao grupo não-infectado. (ANOVA-Test T-Student).

***Os níveis de  $TNF\alpha$  estão aumentados no fígado dos animais alérgicos infectados ou não***

Os níveis de  $TNF\alpha$  só foram detectados no fígado, não sendo observados no baço e intestino delgado destes animais. Os animais alérgicos, infectados ou não, apresentaram níveis significativamente elevados dessa citocina quando comparados aos infectados não alérgicos. Porém, a infecção não foi capaz de, por si só, elevar estes níveis, pois o grupo não alérgico e não infectado apresentou resposta semelhante ao infectado não alérgico (Figura 8).



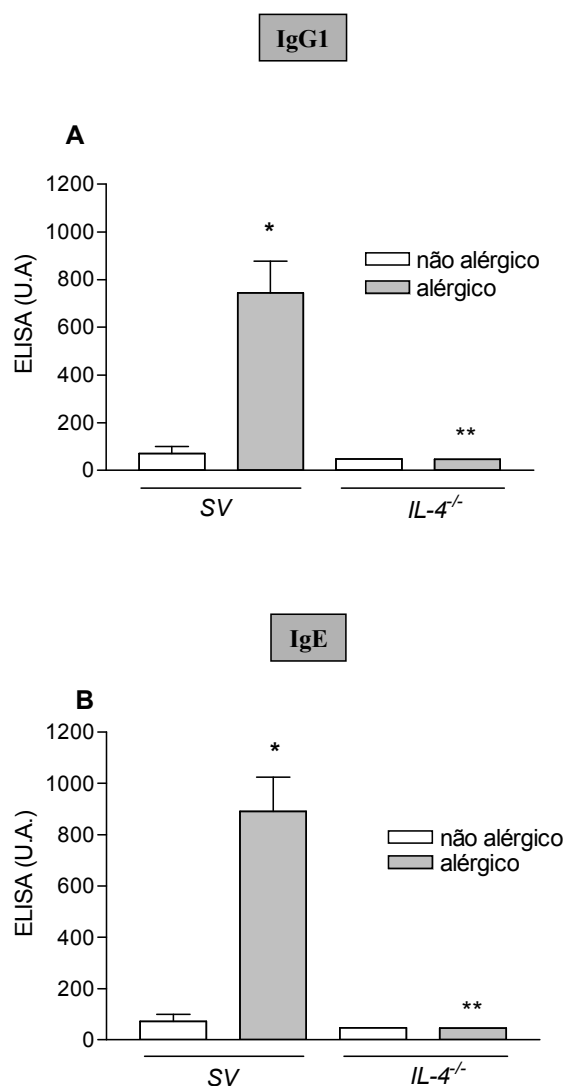
**FIGURA 8– Produção de TNF $\alpha$  no tecido.** Os níveis de TNF $\alpha$  foram dosados no fígado dos animais selvagens (BALB/c) alérgicos e não alérgicos. Camundongos receberam 10  $\mu$ g OVA com Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 (s.c.), reforço de 10  $\mu$ g OVA no dia 14 e solução de clara de ovo a 20% (SCO) no dia 21. Os grupos não infectados foram sacrificados após quatro semanas de consumo de SCO. Os grupos infectados receberam 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28 e foram sacrificados sete semanas após a infecção. Fragmentos teciduais foram analisados quanto à produção de citocinas. Os dados foram obtidos das médias dos níveis de citocinas detectadas em teste de duplicata. \*( $p < 0,05$ ) comparado grupo não alérgico. (ANOVA-Test T-Student).

## **4.2 - AVALIAÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR E ESQUISTOSSOMOSE EM ANIMAIS DEFICIENTES EM IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>)**

### **4.2.1 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA antes da ingestão de SCO a 20%.**

*A sensibilização parenteral foi capaz de induzir a produção de IgG1 e IgE nos animais SV mas não nos IL-4<sup>-/-</sup>*

Sete dias após a sensibilização secundária foi realizada uma sangria retro-orbital, nos animais dos grupos não alérgicos e alérgicos, selvagens e deficientes em IL-4 para análise dos níveis das imunoglobulinas IgG1 e IgE anti-OVA. Os animais SV sensibilizados apresentaram significativos níveis de IgG1 e IgE anti-OVA mostrando que o protocolo de imunização foi capaz de desencadear a produção de imunoglobulinas específicas ao antígeno em relação aos grupos não alérgicos que receberam apenas o adjuvante hidróxido de alumínio (Figura 9). O grupo de camundongos sensibilizados deficientes em IL-4 não apresentou alteração nos níveis dessas imunoglobulinas (Figura 9).

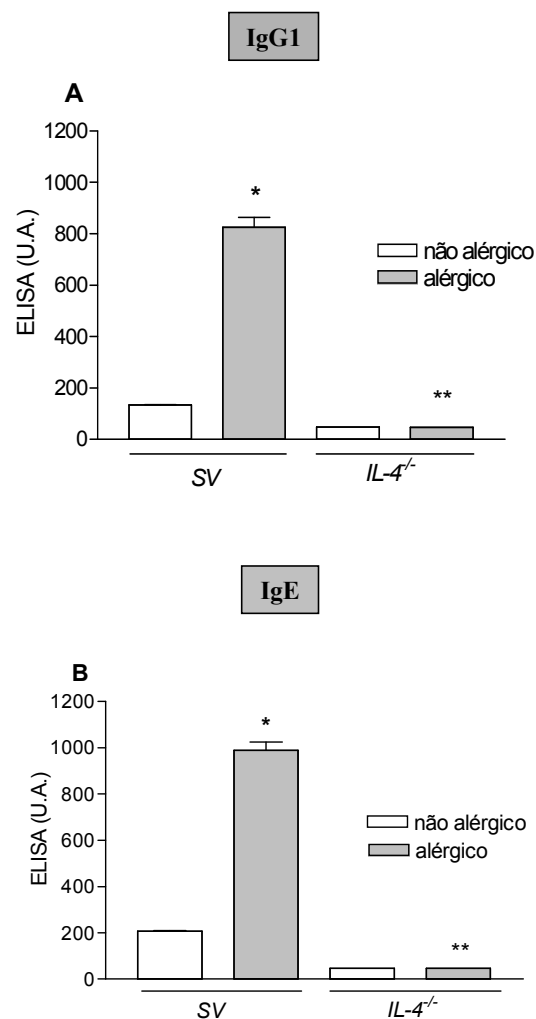


**FIGURA 9: Avaliação dos anticorpos IgG1 e IgE sete dias após sensibilização secundária.** Camundongos SV e  $IL-4^{-/-}$  receberam 10  $\mu$ g de OVA mais 1mg de  $Al(OH)_3$  no dia 0 e apenas OVA no dia 14. O grupo não alérgico recebeu apenas  $Al(OH)_3$  no dia 0 e salina no dia 14 e continuou a beber apenas água. Antes de serem desafiados com SCO, foi coletado o soro de todos os animais e feita a dosagem da imunoglobulina IgG1 (A e B) e IgE (C e D) anti OVA. As barras representam a média dos valores obtidos na diluição 1/1600 para IgG1 e para o soro total para IgE comparado ao soro positivo sendo considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). Foram utilizados 5 animais/grupo. \*  $P < 0.05$  em relação ao seu grupo não alérgico. \*\*  $P < 0.05$  comparado ao grupo selvagem. (ANOVA-Test T-Student).

#### **4.2.2 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA após a ingestão de SCO a 20%**

*A ingestão de SCO aumentou os níveis de IgG1 e IgE anti-OVA apenas nos animais SV*

Os grupos sensibilizados foram também desafiados oralmente com solução de clara de ovo a 20% enquanto os grupos não alérgicos continuaram a ingerir somente água. Sangrias foram realizadas 35 dias após o início da ingestão de SCO ou água, através de vasos axilares para análise da produção de imunoglobulinas específicos IgG1 e IgE. A ingestão prolongada através da solução contendo o antígeno (OVA) foi capaz de aumentar ainda mais os níveis dessas imunoglobulinas nos SV sensibilizados (Figura 10). Porém, nos animais IL-4<sup>-/-</sup>, se mantiveram inalterados (Figura 10).



**FIGURA 10 – Avaliação dos anticorpos IgG1 e IgE no soro após 56 dias de ingestão de SCO ou não.** Camundongos SV e *IL-4<sup>-/-</sup>* receberam 10 µg de OVA mais 1mg de  $\text{Al(OH)}_3$  no dia 0 e apenas OVA no dia 14. O grupo não alérgico recebeu apenas  $\text{Al(OH)}_3$  no dia 0 e salina no dia 14 e continuou a beber água. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO permanecendo, ininterruptamente, por 56 dias. Foi coletado o soro de todos os animais e feita a dosagem da imunoglobulina IgG1(A) e IgE (B) anti OVA. As barras representam a média dos valores obtidos na diluição 1/1600 para IgG1 e para o soro total para IgE comparado ao soro positivo sendo considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). Foram utilizados 5 animais/grupo. \*  $P < 0.05$  em relação ao seu grupo não alérgico. \*\*  $P < 0.05$  comparado ao grupo selvagem. (ANOVA-Test T-Student).

### 4.2.3 - AVALIAÇÃO GERAL

Camundongos SV e deficientes em IL-4 foram monitorados ao longo de todos os protocolos experimentais, quanto:

#### **Peso corporal**

*A alergia induziu perda de peso corpóreo nos animais SV, mas não nos IL-4<sup>-/-</sup>*

Pode-se observar na Figura 11A que os animais SV tiveram uma perda de peso em torno de 20% após o contato com o antígeno através da SCO que permaneceu ao longo de todas as semanas em experimento. Já os camundongos IL-4<sup>-/-</sup> não apresentaram alteração no peso corpóreo quando comparados aos animais não sensibilizados (Figura 11A).

#### **Consumo de ração**

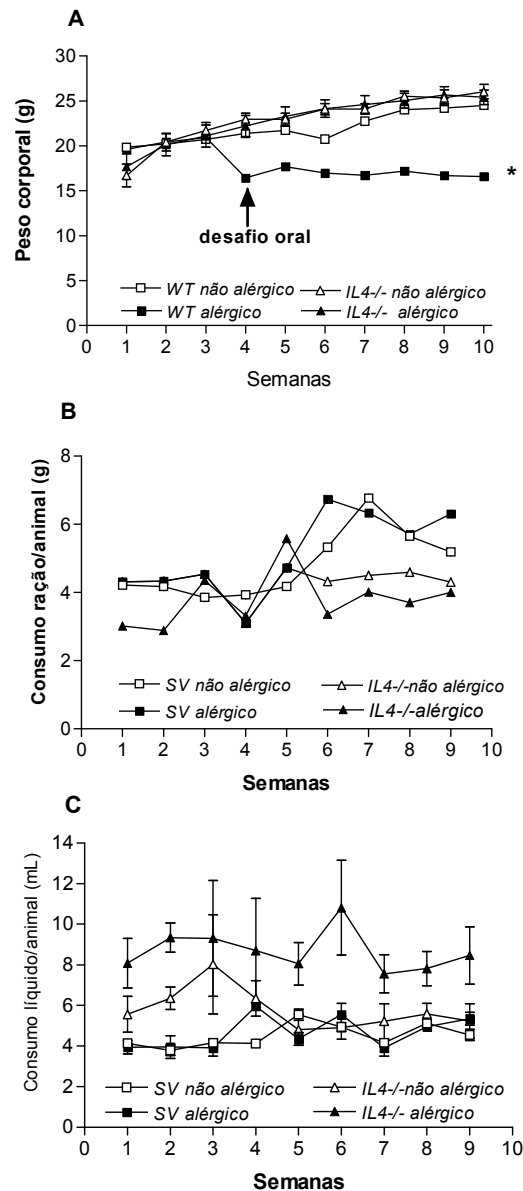
*Todos os grupos apresentaram o mesmo consumo de ração*

Para verificar se havia diferença no consumo entre os animais que justificasse o emagrecimento do grupo SV alérgico, a ração de todos os grupos foi pesada semanalmente. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos selvagens e deficientes, sensibilizados ou não (Figura 11B).

## **Consumo líquido**

### ***Todos os grupos apresentaram o mesmo consumo líquido***

Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO, enquanto os grupos não alérgicos permaneceram bebendo água durante todo o experimento. Essas mamadeiras foram trocadas e pesadas diariamente. Não foi observada diferença significativa entre os grupos selvagens e deficientes, alérgicos ou não no consumo líquido (Figura 11C).



**FIGURA 11 - Avaliação Geral:** Camundongos SV e IL-4<sup>-/-</sup> receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. A, o peso corporal foi monitorado semanalmente. Assim como o consumo de ração (B) e o consumo líquido (C). \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. (ANOVA-Test T-Student).

#### 4.2.4 - AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

##### Avaliação da Sobrevida ao Parasita

*A alergia diminuiu a sobrevida em animais SV, mas não em IL-4<sup>-/-</sup> alérgicos*

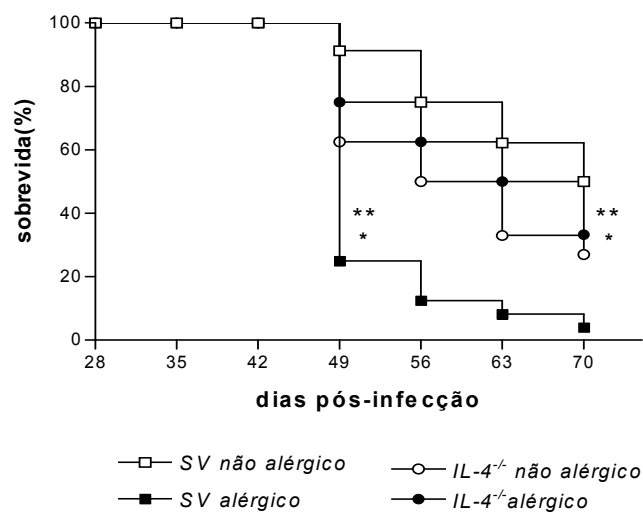
Todos os camundongos, SV e deficientes, foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. Os selvagens alérgicos apresentaram mortalidade precoce, tendo no dia 49 apenas 20% dos seus animais vivos, contra 80% dos não alérgicos (Figura 12). Já os IL-4<sup>-/-</sup> tiveram uma inversão neste perfil, apresentando maior sobrevida no grupo alérgico quando comparado ao grupo não alérgico (Figura 12). Quando comparamos apenas os grupos não alérgicos, SV e deficientes, observamos que a retirada da citocina IL-4 piora a sobrevida desses animais, visto que no dia 49, apenas 60% dos animais deficientes estavam vivos contra 90% dos animais SV (Figura 12).

##### Avaliação Parasitológica

*Apenas os animais SV alérgicos apresentaram diferenças nos padrões parasitológicos analisados*

Todos os animais foram submetidos à perfusão portal após sete semanas de infecção para a contagem e diferenciação sexual dos vermes adultos, segundo a técnica de Pellegrino & Siqueira, 1956. Também foram contados os ovos expelidos nas fezes dos camundongos no dia anterior a perfusão portal. Utilizou-se para essa quantificação a técnica adaptada do método de sedimentação Lutz ou de Hoffmann, (PONS & JANER, 1953).

Os animais selvagens alérgicos apresentaram um número significativamente maior de ovos excretados nas fezes, quando comparados aos não alérgicos. Os animais IL-4<sup>-/-</sup> apresentaram diminuição significativa do número de ovos excretados nas fezes quando comparados a todos os outros grupos. Já os animais alérgicos deficientes mostraram uma reversão neste processo tendo número estatisticamente igual ao dos selvagens não alérgicos. (Tabela I).



**FIGURA 12 – Índice de sobrevivência à infecção pelo *S. mansoni*.** Os grupos alérgicos receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. Os gráficos acima mostram curva de sobrevivência após a infecção, ocorrida no dia 1. O gráfico representa a curva de mortalidade dos animais selvagens (SV) e dos animais deficientes em IL-4. \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. \*\* P < 0.05 comparado ao grupo selvagem (ANOVA-Test T-Student).

**Tabela 1 – Comparação parasitológica e morfológica entre os grupos selvagens e IL-4<sup>-/-</sup> infectados com *S. mansoni* alérgicos e não alérgicos.**

| Grupos                          | intestino                                |                             | Ovos fecais<br>(ovos/g) | casais de vermes |
|---------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|------------------|
|                                 | Tamanho<br>Granuloma ( $\mu\text{m}^2$ ) | Nº granulomas<br>(nº/campo) |                         |                  |
| SV (OVA-/SCO-)                  | 96,3 $\pm$ 31,5                          | 1,10 $\pm$ 0,28             | 240 $\pm$ 50            | 11 $\pm$ 0,50    |
| SV (OVA+/SCO+)                  | 100,6 $\pm$ 25,2                         | 0,80 $\pm$ 0,098*           | 298 $\pm$ 82*           | 10 $\pm$ 5,6     |
| IL-4 <sup>-/-</sup> (OVA-/SCO-) | 98,5 $\pm$ 22,7                          | 1,00 $\pm$ 0,23             | 159,5 $\pm$ 48,9**      | 12 $\pm$ 2,0     |
| IL-4 <sup>-/-</sup> (OVA+/SCO+) | 96,3 $\pm$ 31,5                          | 1,20 $\pm$ 0,40**           | 271,4 $\pm$ 28,3*       | 11 $\pm$ 1,0     |

Camundongos selvagens (SV) e deficientes em IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) receberam 10  $\mu\text{g}$  OVA com Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 (s.c.) (OVA+), reforço de 10  $\mu\text{g}$  OVA no dia 14 e solução de clara de ovo a 20% no dia 21 (SCO+). Todos os animais foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28. Após 49 dias da infecção, foi feita contagem dos ovos nas fezes e perfusão portal para contagem dos parasitas. Houve aumento do número de ovos excretados pelos animais selvagens alérgicos (OVA+/SCO+). Porém não houve diferença no número de casais de parasitas ou ovos excretados nos animais deficientes para IL-4 alérgicos ou não. O número e tamanho dos granulomas intestinais foi avaliado e também só se mostrou significativamente diferente apenas no número e nos selvagens alérgicos. \* P < 0.05 comparado ao (OVA-/SCO-). \*\* P < 0.05 comparado ao grupo selvagem. ANOVA-Test T-Student.

## **Avaliação Morfológica**

- ***Número de granulomas***

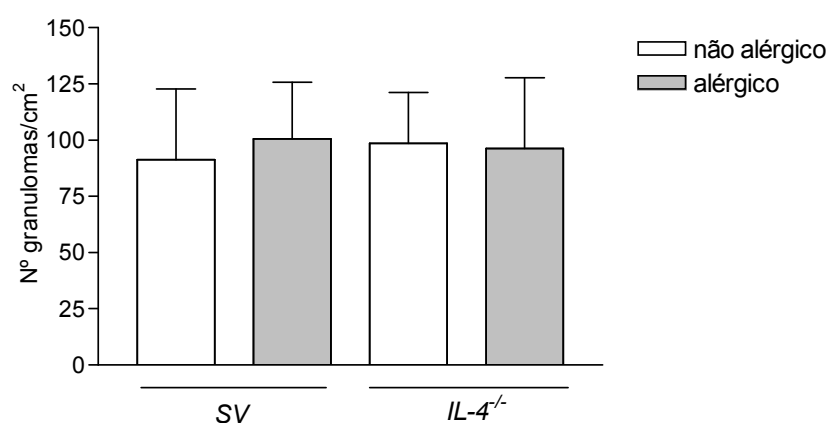
***O número de granulomas intestinais dos SV alérgicos foi significativamente menor***

O fígado e o intestino de todos os animais foram necropsiados, processados e analisados histologicamente na sétima semana após a infecção. O número de reações inflamatórias granulomatosas, típicas dessa patologia, foi contado no fígado e intestino dos animais SV e deficientes em IL-4, alérgicos e não alérgicos. Não houve diferença significativa no número dos granulomas hepáticos entre os grupos alérgicos e não alérgicos, selvagens e deficientes (Figura 13). Porém o número de granulomas intestinais dos animais selvagens alérgicos foi significativamente menor que nos demais grupos (Tabela I).

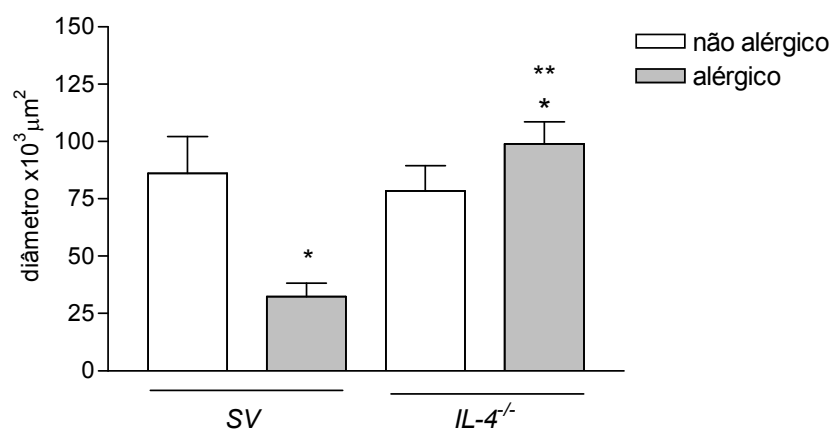
- ***Área da granulomatosa***

***Animais alérgicos apresentaram diferenças no tamanho dos granulomas hepáticos***

As áreas dos granulomas hepáticos e intestinais, foram analisadas pela morfometria computadorizada. O tamanho dos granulomas hepáticos dos animais selvagens alérgicos foi significativamente menor que dos seus controles não alérgicos (Figura 14). Porém os animais IL-4<sup>-/-</sup> tiveram uma inversão neste perfil: os animais alérgicos apresentaram granulomas hepáticos maiores quando comparados aos não alérgicos (Figura 14). A área média dos granulomas intestinais não foi diferente entre os animais selvagens e deficientes, alérgicos ou não alérgicos (Tabela I).



**FIGURA 13 – Avaliação do número de granulomas hepáticos.** Os grupos alérgicos receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. O tecido hepático foi coletado na sétima semana após a infecção e o número de reações granulomatosas foi contada no fígado de animais selvagens e de animais deficientes em IL-4. ( $p \leq 0,05$ ). ANOVA-Test T-Student.



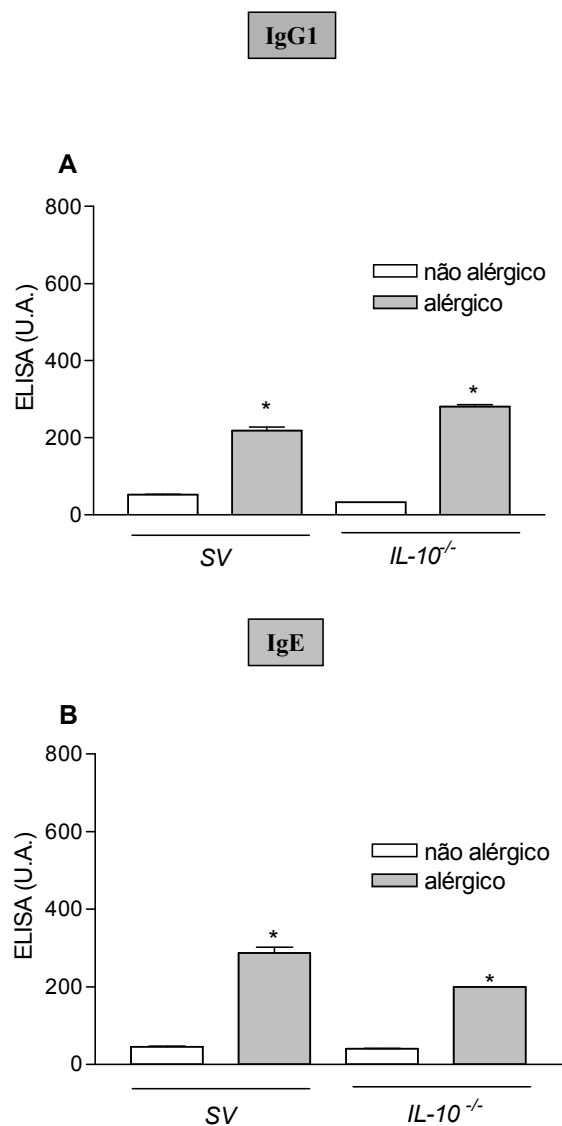
**FIGURA 14 – Avaliação da área dos granulomas hepáticos.** Os grupos alérgicos receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. Todos os animais foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28. O tecido hepático foi coletado na sétima semana após a infecção e a área granulomatosa foi quantificada. A, área média dos granulomas hepáticos dos animais selvagens. B, área granulomatosa hepática dos animais IL-4<sup>-/-</sup>. \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. \*\* P < 0.05 comparado ao grupo selvagem. ANOVA-Test T-Student.

### **4.3 - AVALIAÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR E ESQUISTOSSOMOSE EM ANIMAIS DEFICIENTES EM IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>)**

#### **4.3.1 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA antes da ingestão de SCO a 20%.**

*A sensibilização parenteral foi capaz de induzir a produção de IgG1 e IgE nos SV e IL -10<sup>-/-</sup>*

Sete dias após a sensibilização secundária foi realizada uma sangria retro-orbital, nos animais dos grupos não alérgicos e alérgicos, selvagens (C57BL/6) e deficientes em IL-10, do mesmo background, para análise dos níveis das imunoglobulinas IgG1 e IgE anti-OVA. Os animais SV sensibilizados apresentaram significativos níveis de IgG1 e IgE anti-OVA mostrando que o protocolo de imunização foi capaz de desencadear a produção de imunoglobulinas específicos ao antígeno em relação aos grupos não alérgicos que receberam apenas o adjuvante hidróxido de alumínio (Figura 15). O grupo de camundongos sensibilizados deficientes em IL-10 também apresentou elevação nos níveis dessas imunoglobulinas (Figuras 15).

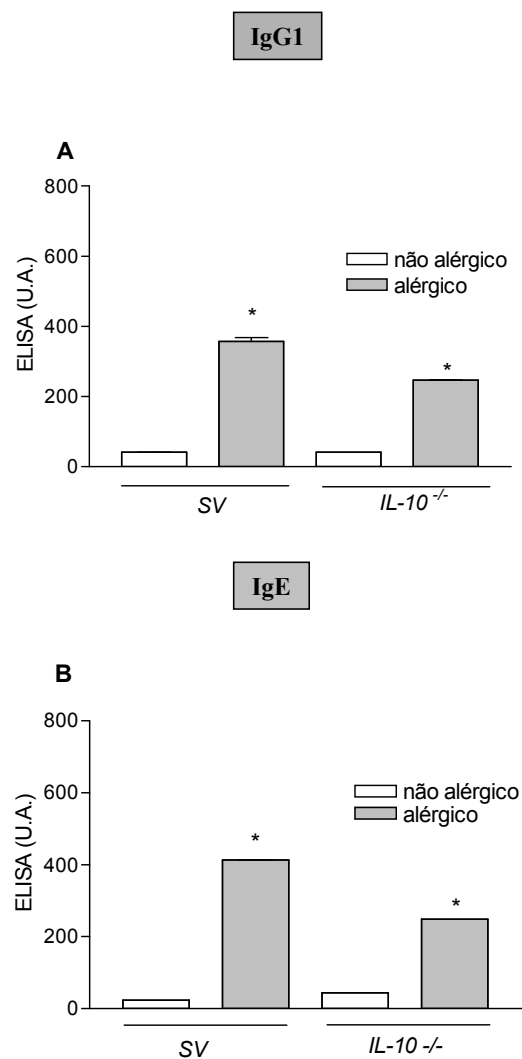


**FIGURA 15: Avaliação dos anticorpos IgG1 e IgE sete dias após sensibilização secundária.** Camundongos SV e *IL-10*<sup>-/-</sup> receberam 10 µg de OVA mais 1mg de Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e apenas OVA no dia 14. O grupo não alérgico recebeu apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Antes das mamadeiras serem trocadas (desafio oral), foi coletado o soro de todos os animais e feita a dosagem da imunoglobulina IgG1 (A) e IgE (B) anti OVA. As barras representam a média dos valores obtidos na diluição 1/1600 para IgG1 e para o soro total para IgE comparado ao soro positivo sendo considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). Foram utilizados 5 animais/grupo. \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. ANOVA-Test T-Student.

#### **4.3.2 Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA após a ingestão de SCO a 20%**

*A ingestão de SCO aumentou ou manteve os níveis de IgG1 e IgE anti-OVA nos SV e IL-10<sup>-/-</sup>*

Os grupos sensibilizados foram também desafiados oralmente com solução de clara de ovo a 20% enquanto os grupos não alérgicos continuaram a ingerir somente água. Sangrias foram realizadas 35 dias após o desafio, através de vasos axilares para análise da produção de imunoglobulinas específicas IgG1 e IgE. A ingestão prolongada através da solução contendo o antígeno (OVA) foi capaz de aumentar ou mesmo manter elevados os níveis dessas imunoglobulinas em todos os animais sensibilizados, selvagens e deficientes em IL-10 (Figura 16).



**FIGURA 16 – Avaliação dos anticorpos IgG1 e IgE no soro após 56 dias de ingestão de SCO.** Camundongos SV e *IL-10*<sup>-/-</sup> receberam 10 µg de OVA mais 1mg de Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e apenas OVA no dia 14. O grupo não alérgico recebeu apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, apenas as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO permanecendo, ininterruptamente, por 56 dias. Foi coletado o soro de todos os animais e feita a dosagem da imunoglobulina IgG1(A) e IgE (B) anti OVA. As barras representam a média dos valores obtidos na diluição 1/1600 para IgG1 e para o soro total para IgE comparado ao soro positivo sendo considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). Foram utilizados 5 animais/grupo. \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. ANOVA-Test T-Student.

### 4.3.3 AVALIAÇÃO GERAL

Camundongos SV e deficientes em IL-10 foram monitorados ao longo de todos os protocolos experimentais, quanto:

#### **Peso corporal**

*Animais selvagens e deficientes em IL-10 alérgicos não apresentaram perda de peso corpóreo*

Pode-se observar na Figura 17A que não houve diferença no peso corpóreo dos animais selvagens e deficientes alérgicos mesmo após o contato com o antígeno através da ingestão de SCO (desafio) ao longo de todas as semanas do experimento.

#### **Consumo de ração**

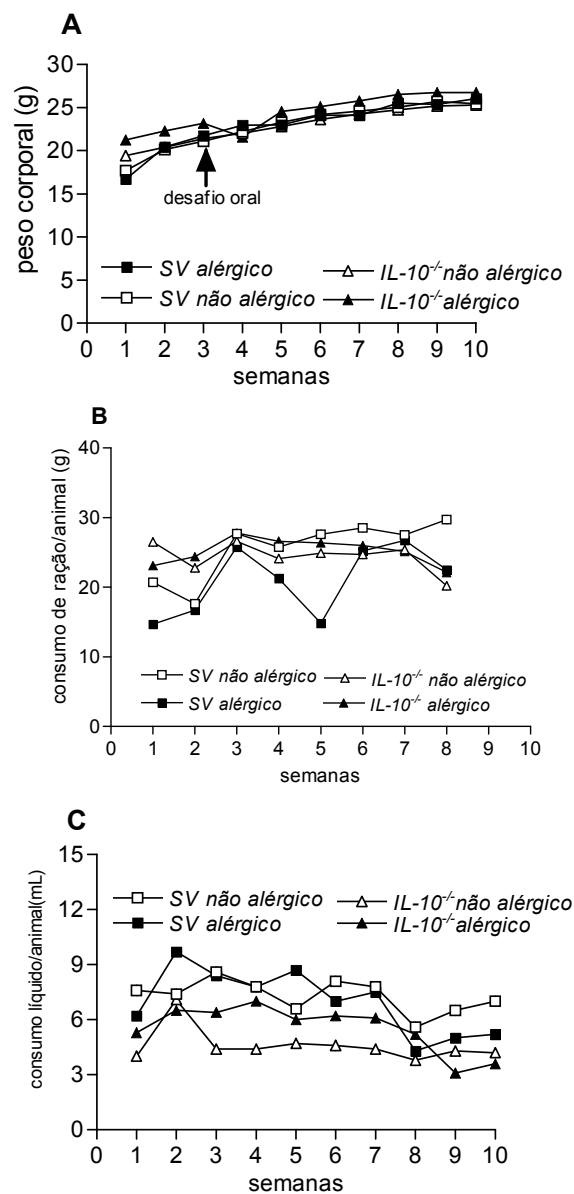
*Não houve diferenças significativas no consumo de ração entre os grupos*

A ração de todos os grupos foi pesada semanalmente. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos selvagens e deficientes, sensibilizados ou não (Figura 17B).

#### **Consumo líquido**

*Todos os grupos apresentaram o mesmo consumo líquido*

Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO, enquanto o grupo não alérgico permaneceu bebendo água durante todo o experimento. Essas mamadeiras foram trocadas e pesadas diariamente. Não foi observada diferença significativa entre os grupos selvagens e deficientes, sensibilizados ou não no consumo líquido (Figura 17C).



**FIGURA 17 - Avaliação Geral:** Camundongos SV e IL-10<sup>-/-</sup> receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, somente as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. A, o peso corporal foi monitorado semanalmente, assim como o consumo de ração (B) e o consumo líquido (C). \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. ANOVA-Test T-Student.

#### **4.3.4 - AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL**

##### **Avaliação da Sobrevida ao Parasita**

###### ***A alergia aumentou a sobrevida nos animais deficientes em IL-10***

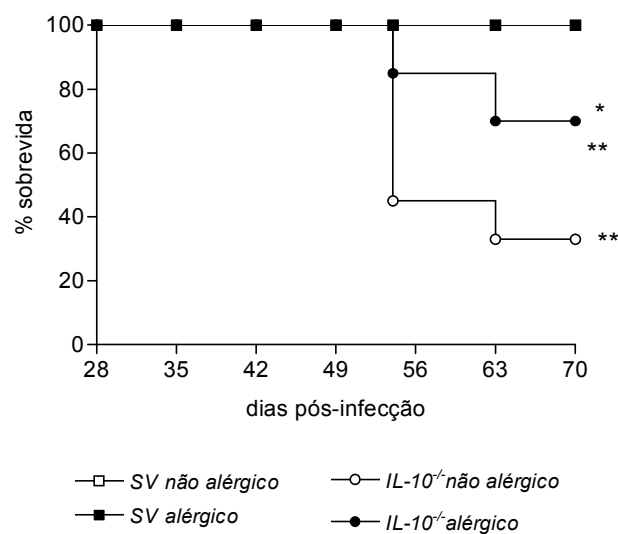
Todos os camundongos foram infectados com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni* sete dias após o desafio oral. Os animais selvagens alérgicos não tiveram mortalidade, assim como os não alérgicos (Figura 18) passando não alérgicamente da fase aguda para a fase crônica. Porém os IL-10<sup>-/-</sup> tiveram diminuição na sua sobrevida a partir da oitava semana pós-infecção. Já os animais deficientes alérgicos tiveram maior sobrevida quando comparados aos não alérgicos (Figura 18).

##### **Avaliação Parasitológica**

###### ***Os animais IL-10<sup>-/-</sup> apresentaram diferenças nos padrões parasitológicos analisados***

Como descrito anteriormente, todos os animais foram submetidos à perfusão portal após sete semanas e tiveram os ovos expelidos nas fezes contados.

Os grupos de animais selvagens apresentaram perfil parasitológico semelhante entre si. Porém os animais deficientes em IL-10 mostraram diferenças significativas entre si e em relação aos SV: houve diminuição no número de ovos excretados, bem como no número de casais de vermes nos dois grupos de animais deficientes (Tabela II). No grupo alérgico esta diminuição foi ainda mais significativa quando comparada ao seu controle não alérgico. O mesmo ocorreu com o número de vermes neste grupo que se mostrou menor nos animais alérgicos (Tabela II).



**FIGURA 18 – Índice de sobrevivência à infecção pelo *S. mansoni*.** Os grupos alérgicos receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. Os gráficos acima mostram curva de sobrevivência a partir da infecção, ocorrida no dia 1, em animais selvagens (SV) e deficientes em IL-10. \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. (ANOVA-Test T-Student).

**Tabela II – Comparação parasitológica e morfológica entre os grupos selvagens e IL-10<sup>-/-</sup> infectados com *S. mansoni* alérgicos e não alérgicos.**

| Grupo                            | intestino                               |                           | Ovos fecais<br>(ovos/g) | casais de vermes |
|----------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------|-------------------------|------------------|
|                                  | Tamanho<br>Granuloma (µm <sup>2</sup> ) | Nºgranuloma<br>(nº/campo) |                         |                  |
| SV (OVA-/SCO-)                   | 86,3 ± 19,5                             | 1,20 ± 0,48               | 420 ± 80                | 14 ± 1,9         |
| SV (OVA+/SCO+)                   | 95,6 ± 29,2                             | 1,40 ± 0,1                | 368 ± 51,7              | 16 ± 2,6         |
| IL-10 <sup>-/-</sup> (OVA-/SCO-) | 79,5 ± 20,7                             | 0,8 ± 0,63**              | 241,4 ± 38,7**          | 7 ± 0,8 **       |
| IL10 <sup>-/-</sup> (OVA+/SCO+)  | 83,3 ± 30,5                             | 1,3 ± 0,30*               | 186,5 ± 29,3 *          | 4 ± 1,6 *        |

Camundongos selvagens (SV) e deficientes em IL-10 (IL-10<sup>-/-</sup>) receberam 10 µg de OVA com Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 (s.c.) (OVA+), reforço de 10 µg OVA no dia 14 e solução de clara de ovo a 20% no dia 21 (SCO+). Todos os animais foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28. Após 49 dias da infecção, foi feita contagem dos ovos nas fezes e perfusão portal para contagem dos parasitas. Houve diminuição do número de ovos excretados pelos animais IL-10<sup>-/-</sup> quando comparados aos selvagens. Nestes animais deficientes, o grupo alérgico (OVA+/SCO+) teve uma diminuição ainda maior na excreção dos ovos que os não alérgicos. O número de casais de parasitas nos animais deficientes para IL-10 também foi significativamente menor que nos selvagens. O grupo alérgico teve uma diminuição ainda maior em relação aos normais. O número dos granulomas intestinais também só se mostrou significativamente diferente nos animais IL-10<sup>-/-</sup>. O grupo deficiente não alérgico teve diminuição nas reações granulomatosas quando comparado aos grupos selvagens, mas o grupo alérgico teve uma diminuição significativa, quando comparado ao grupo não alérgico.

\* P < 0.05 comparado ao OVA-/ SCO - \*\* P < 0.05 comparado ao grupo selvagem. (ANOVA-Test T-Student).

## **Avaliação Morfológica**

- **Número de granulomas**

*Animais IL-10<sup>-/-</sup> alérgicos tiveram aumento significativo na área dos granulomas hepáticos*

O fígado e o intestino de todos os animais foram necropsiados, processados e analisados histologicamente na sétima semana após a infecção com 50 cercárias. O número de reações inflamatórias granulomatosas, típicas dessa patologia, foi contado no fígado e intestino dos animais SV e deficientes em IL-10, alérgicos e não alérgicos.

O número de granulomas hepáticos e intestinais não foi significativamente diferente nos animais SV e deficientes não alérgicos ou alérgicos (Figura 19).

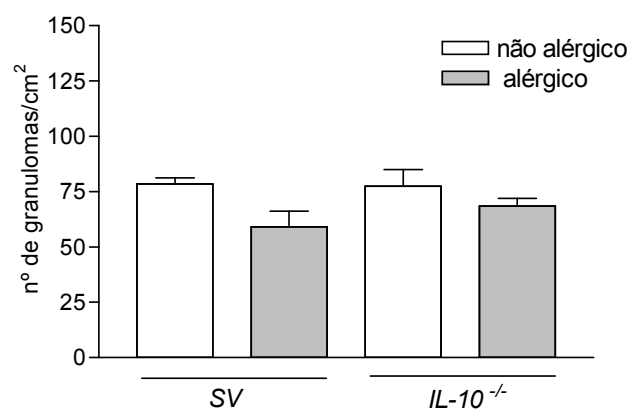
Os granulomas intestinais tiveram número menor nos animais IL-10 deficientes não alérgicos quando comparados aos alérgicos e aos grupos SV. Já o grupo alérgico reverteu essa alteração mostrando número maior destes granulomas quando comparado ao deficiente não alérgico apresentando perfil semelhante aos grupos SV (Tabela II).

- **Área da granulomatosa**

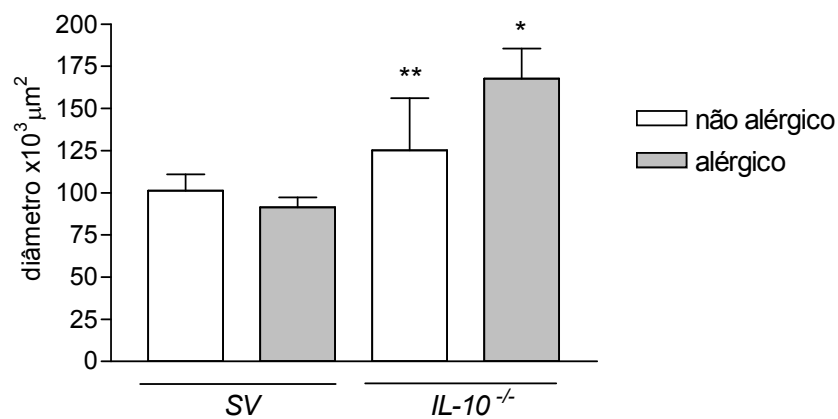
*A ausência de IL-10 aumentou o tamanho dos granulomas hepáticos e combinada a alergia esse aumento foi ainda maior*

As áreas dos granulomas hepáticos e intestinais, foram analisadas pela morfometria computadorizada. Os granulomas hepáticos dos animais SV não apresentaram diferenças na área granulomatosa (Figura 20). Porém, a ausência da IL-10 foi capaz de aumentar esta área que foram ainda maiores nos deficientes em IL-10 alérgicos (Figura 20).

As médias das mensurações dos granulomas intestinais não apresentaram diferenças significativas entre os animais selvagens e deficientes, alérgicos ou não. (Tabela II).



**FIGURA 19– Avaliação do número de granulomas hepáticos.** Os grupos alérgicos receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. O tecido hepático foi coletado na sétima semana após a infecção e o número de reações granulomatosas foi contado no fígado de animais selvagens e deficientes em IL-10. ( $p \leq 0,05$ ) . ANOVA-Test T-Student.



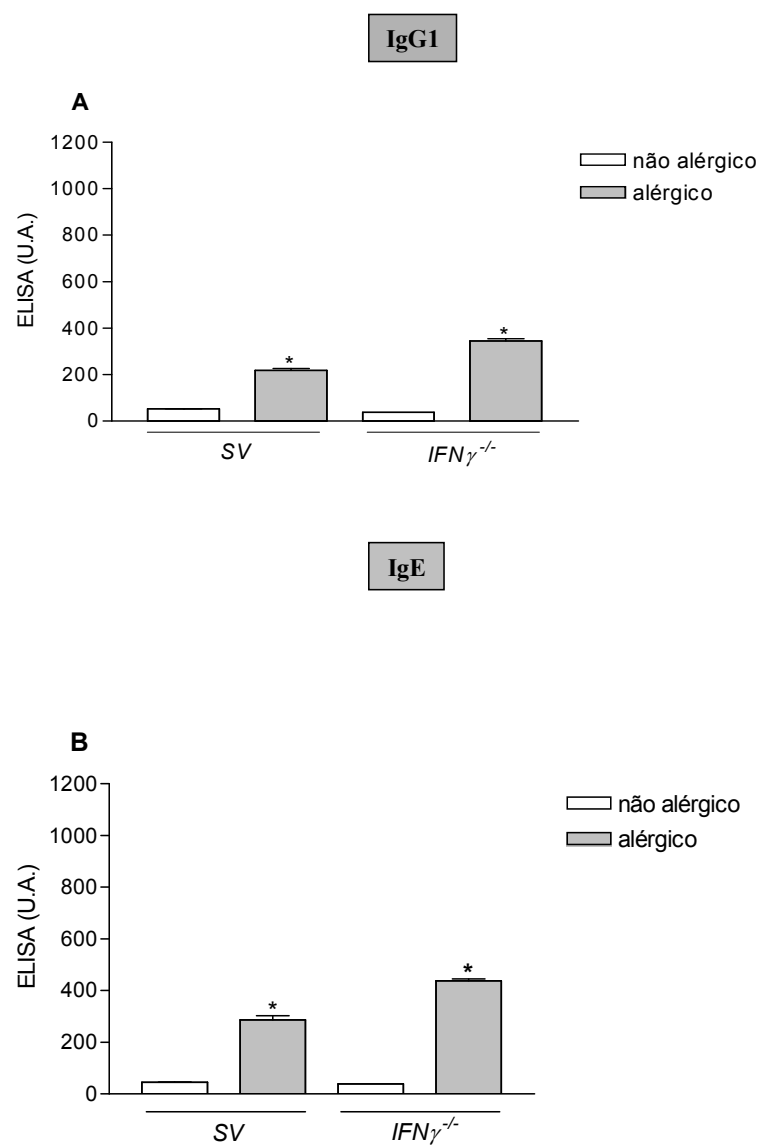
**FIGURA 20– Avaliação da área dos granulomas hepáticos.** Os grupos alérgicos receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. Todos os animais foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28. O tecido hepático foi coletado na sétima semana após a infecção e a área granulomatosa foi quantificada. A, área média dos granulomas hepáticos dos animais selvagens. B, área granulomatosa hepática dos animais IL-10<sup>-/-</sup>. \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. \*\* P < 0.05 comparado ao grupo selvagem. ANOVA-Test T-Student.

#### **4.4 - AVALIAÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR E ESQUISTOSSOMOSE EM ANIMAIS DEFICIENTES EM $IFN\gamma$ ( $IFN\gamma^{-/-}$ )**

##### **4.4.1 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA antes da ingestão de SCO a 20%.**

*A sensibilização parenteral foi capaz de induzir a produção de IgG1 e IgE nos SV e  $IFN\gamma^{-/-}$*

Sete dias após a sensibilização secundária foi realizada uma sangria retro-orbital, nos animais dos grupos não alérgicos e alérgicos, selvagens (C57BL/6) e deficientes em  $IFN\gamma$ , do mesmo background, para análise dos níveis das imunoglobulinas IgG1 e IgE anti-OVA. Os animais SV sensibilizados apresentaram significativos níveis de IgG1 e IgE anti-OVA mostrando que o protocolo de imunização foi capaz de desencadear a produção de imunoglobulinas específicos ao antígeno em relação aos grupos não alérgicos que receberam apenas o adjuvante hidróxido de alumínio (Figura 21). O grupo de camundongos sensibilizados deficientes em  $IFN\gamma$  também apresentou elevação nos níveis dessas imunoglobulinas (Figura 21).

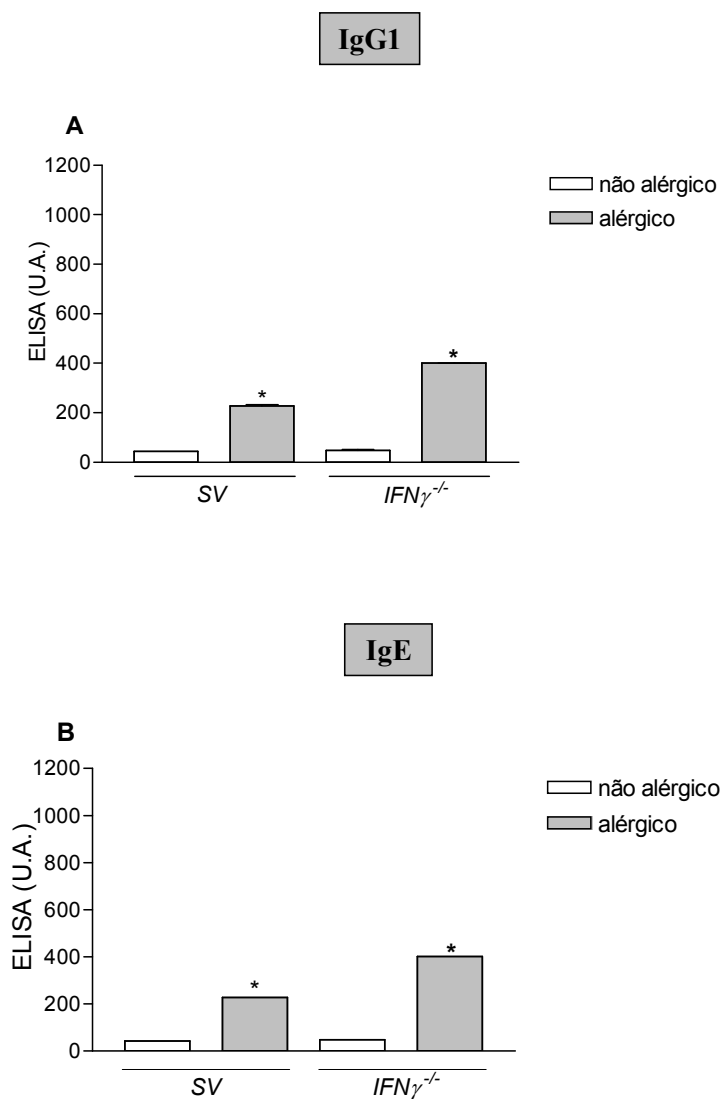


**FIGURA 21: Avaliação dos anticorpos IgG1 e IgE sete dias após sensibilização secundária.** Camundongos SV e  $IFN\gamma^{-/-}$  receberam 10  $\mu$ g de OVA mais 1mg de  $Al(OH)_3$  no dia 0 e apenas OVA no dia 14. O grupo não alérgico recebeu apenas  $Al(OH)_3$  no dia 0 e salina no dia 14 e continuou a beber apenas água. Antes de serem desafiados com SCO, foi coletado o soro de todos os animais e feita a dosagem da imunoglobulina IgG1(A) e IgE (B) anti OVA. As barras representam a média dos valores obtidos na diluição 1/1600 para IgG1 e para o soro total para IgE comparado ao

#### **4.4.2 Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA após a ingestão de SCO a 20%**

*A ingestão de SCO aumentou ou manteve os níveis de IgG1 e IgE anti-OVA nos SV e IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>*

Os grupos sensibilizados foram também desafiados oralmente com solução de clara de ovo a 20% enquanto os grupos não alérgicos continuaram a ingerir somente água. Sangrias foram realizadas 35 dias após o desafio, através de vasos axilares para análise da produção de imunoglobulinas específicas IgG1 e IgE. A ingestão prolongada através da solução contendo o antígeno (OVA) foi capaz de aumentar ou mesmo manter elevados os níveis dessas imunoglobulinas em todos os animais sensibilizados, selvagens e deficientes em IFN $\gamma$  (Figura 22).



**FIGURA 22 – Avaliação dos anticorpos IgG1 e IgE no soro 56 dias após desafio oral.** Camundongos SV e *IFN* $\gamma^{-/-}$  receberam 10  $\mu$ g de OVA mais 1mg de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  no dia 0 e apenas OVA no dia 14. O grupo não alérgico recebeu apenas  $\text{Al}(\text{OH})_3$  no dia 0 e salina no dia 14 e continuou a beber água. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO permanecendo, ininterruptamente, por 56 dias. Foi coletado o soro de todos os animais e feita a dosagem da imunoglobulina IgG1 (A) e IgE (B) anti OVA. As barras representam a média dos valores obtidos na diluição 1/1600 para IgG1 e para o soro total para IgE comparado ao soro positivo sendo considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). Foram utilizados 5 animais/grupo. \*  $P < 0.05$  em relação ao seu grupo não alérgico. ANOVA-Test T-Student.

#### 4.4.3 AVALIAÇÃO GERAL

Camundongos SV e deficientes em  $IFN\gamma$  foram monitorados ao longo de todos os protocolos experimentais, quanto:

##### **Peso corporal**

*Animais selvagens e deficientes em  $IFN\gamma$  alérgicos não apresentaram perda de peso corpóreo*

Pode-se observar na Figura 23A que não houve diferença no peso corpóreo dos animais selvagens e deficientes alérgicos mesmo após o contato com o antígeno através da ingestão de SCO (desafio) ao longo de todas as semanas do experimento.

##### **Consumo de ração**

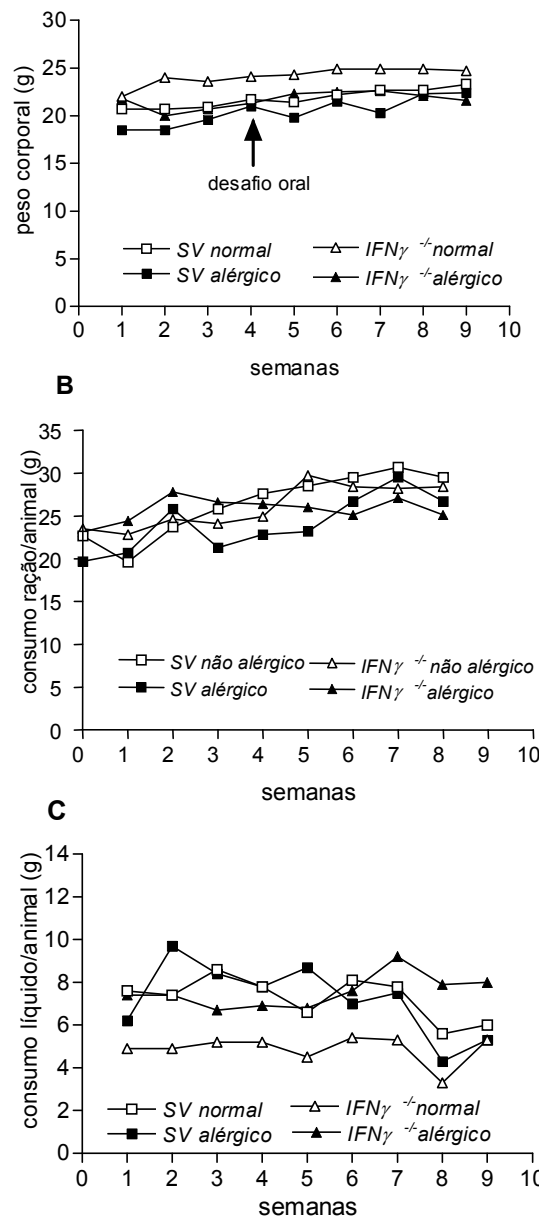
*Não houve diferenças significativas no consumo de ração entre os grupos*

A ração de todos os grupos foi pesada semanalmente. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos selvagens e deficientes, sensibilizados ou não (Figura 23B).

##### **Consumo líquido**

*Todos os grupos apresentaram o mesmo consumo líquido*

Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO, enquanto o grupo não alérgico permaneceu bebendo água durante todo o experimento. Essas mamadeiras foram trocadas e pesadas diariamente. Não foi observada diferença significativa entre os grupos selvagens e deficientes, sensibilizados ou não no consumo líquido (Figura 23C).



**FIGURA 23 - Avaliação Geral:** Camundongos SV e IFN $\gamma^{-/-}$  receberam 10  $\mu$ g OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, somente as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. A, o peso corporal foi monitorado semanalmente, assim como o consumo de ração (B) e o consumo líquido (C.). ( $p \leq 0,05$ ) ANOVA-Test T-Student.

#### 4.3.4 - AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

##### Avaliação da Sobrevida ao Parasita

*A alergia não interferiu na sobrevida dos animais deficientes em IFN $\gamma$*

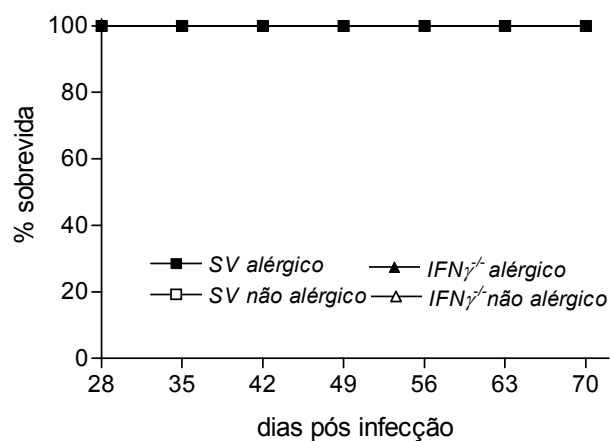
Todos os animais foram infectados com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni*. Vinte e oito dias após a sensibilização primária. A sobrevida foi total, não houve mortalidade em nenhum dos grupos selvagem ou IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> (Figura 24).

##### Avaliação Parasitológica

*Os animais IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> alérgicos apresentaram diferenças nos padrões parasitológicos analisados*

Como descrito anteriormente, todos os animais foram submetidos à perfusão portal após sete semanas e tiveram os ovos expelidos nas fezes contados.

Os grupos de animais selvagens apresentaram perfil parasitológico semelhante entre si. Porém os animais deficientes em IFN $\gamma$  alérgicos mostraram diferenças significativas entre si e em relação aos SV: houve diminuição no número de ovos excretados, bem como no número de casais de vermes (Tabela III).



**FIGURA 24 – Índice de sobrevivência à infecção pelo *S. mansoni*.** Os grupos alérgicos receberam 10  $\mu$ g OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. O gráfico acima mostra curva de sobrevivência a partir da infecção, ocorrida no dia 1. (p $\leq$ 0,05) ANOVA-Test T-Student.

**Tabela 3 – Comparação parasitológica e morfológica entre os grupos selvagens e  $IFN\gamma^{-/-}$  infectados com *S. mansoni* alérgicos e não alérgicos.**

| <b>Grupos</b>                                   | <b>intestino</b>                                    |                                   | <b>Ovos fecais<br/>(ovos/g)</b> | <b>casais de vermes</b> |
|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
|                                                 | <b>Tamanho<br/>Granuloma (<math>\mu m^2</math>)</b> | <b>Nºgranuloma<br/>(nº/campo)</b> |                                 |                         |
| <b>SV (OVA-/SCO-)</b>                           | 49,3 ± 19,5                                         | 1,0 ± 0,2                         | 347 ± 71                        | 11,0 ± 1,4              |
| <b>SV (OVA+/SCO+)</b>                           | 49,6 ± 49,2                                         | 1,20 ± 0,1                        | 302 ± 52,7                      | 12 ± 2,6                |
| <b><math>IFN\gamma^{-/-}</math> (OVA-/SCO-)</b> | 57,1 ± 33,7                                         | 1,3 ± 0,3                         | 398,4 ± 80,7**                  | 19 ± 3,3**              |
| <b><math>IFN\gamma^{-/-}</math> (OVA+/SCO+)</b> | 61,3 ± 10,5                                         | 0,9 ± 0,2                         | 387,5 ± 30,4*                   | 17 ± 3,5 *              |

Camundongos C57BL/6 (SV) e deficientes em  $IFN\gamma$  ( $IFN\gamma^{-/-}$ ) receberam 10  $\mu g$  de OVA com  $Al(OH)_3$  no dia 0 (s.c.) (OVA+), reforço de 10  $\mu g$  OVA no dia 14 e solução de clara de ovo a 20% no dia 21 (SCO+). Todos os animais foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28. Após 49 dias da infecção, foi feita contagem dos ovos nas fezes e perfusão portal para contagem dos parasitas. Houve diminuição do número de ovos excretados pelos animais  $IFN\gamma^{-/-}$  quando comparados aos selvagens. Nestes animais deficientes, o grupo alérgico (OVA+/SCO+) teve uma diminuição ainda maior na excreção dos ovos que os não alérgicos. O número de casais de parasitas nos animais deficientes para  $IFN\gamma$  também foi significativamente menor que nos selvagens. O grupo alérgico teve uma diminuição ainda maior em relação aos normais. O número dos granulomas intestinais também só se mostrou significativamente diferente nos animais  $IFN\gamma^{-/-}$ . O grupo deficiente não alérgico teve diminuição nas reações granulomatosas quando comparado aos grupos selvagens, mas o grupo alérgico teve uma diminuição significativa, quando comparado ao grupo não alérgico. \*P < 0.05 comparado ao OVA-/ SCO - . \*\* P < 0.05 comparado ao grupo selvagem. (ANOVA-Test T-Student).

## **Avaliação Morfológica**

- **Número de granulomas**

*Não houve diferenças significativas no número dos granulomas hepáticos e intestinais entre todos os grupos analisados*

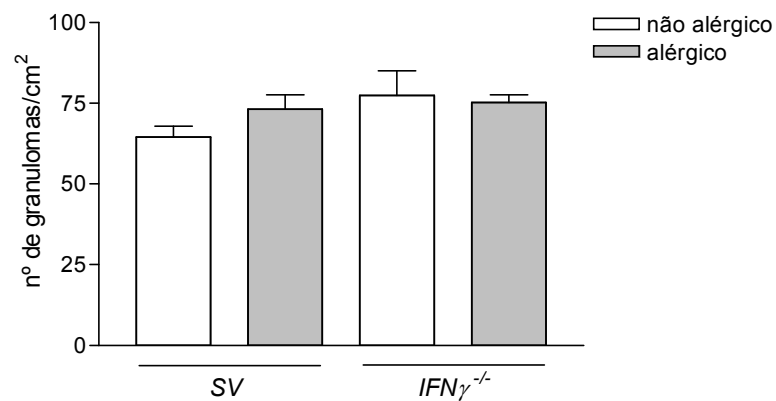
O fígado e o intestino de todos os animais foram necropsiados, processados e analisados histologicamente na sétima semana após a infecção com 50 cercárias. O número de reações inflamatórias granulomatosas, típicas dessa patologia, foi contado no fígado e intestino dos animais SV e deficientes em  $\text{IFN}\gamma$ , alérgicos e não alérgicos.

O número de granulomas hepáticos não foi significativamente diferente nos animais SV não alérgicos ou alérgicos, nem entre os  $\text{IFN}\gamma^{-/-}$  (Figura 25). Os granulomas intestinais também não apresentaram diferenças significativas entre os grupos como mostra a Tabela III.

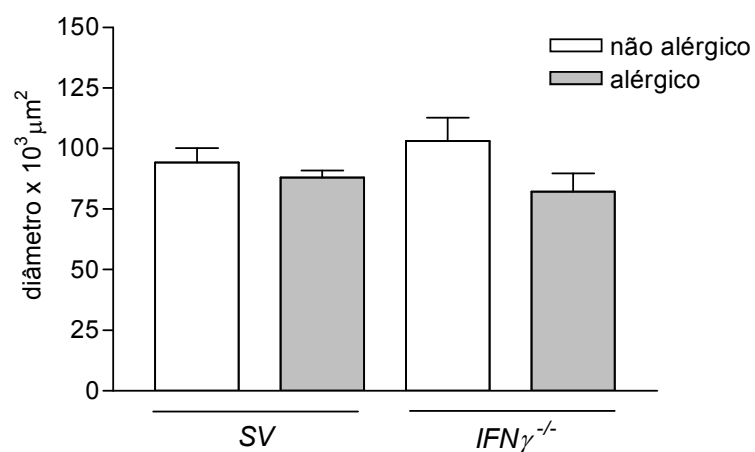
- **Área da granulomatosa**

*A alergia e a ausência de  $\text{IFN}\gamma$  não interferiram na área dos granulomas hepáticos e intestinais*

As áreas dos granulomas hepáticos e intestinais foram analisadas pela morfometria computadorizada e não apresentaram diferenças significativas entre os grupos selvagens e deficientes em  $\text{IFN}\gamma$ , alérgicos ou não alérgicos no fígado (Figura 26) e no intestino (Tabela III).



**FIGURA 25– Avaliação do número de granulomas hepáticos.** Os grupos alérgicos receberam 10 µg OVA+1mg  $Al(OH)_3$  (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas  $Al(OH)_3$  no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. O tecido hepático foi coletado na sétima semana após a infecção e o número de reações granulomatosas foi contada no fígado de animais selvagens e animais deficientes em  $IFN\gamma$ . ( $p \leq 0,05$ ) ANOVA-Test T-Student.



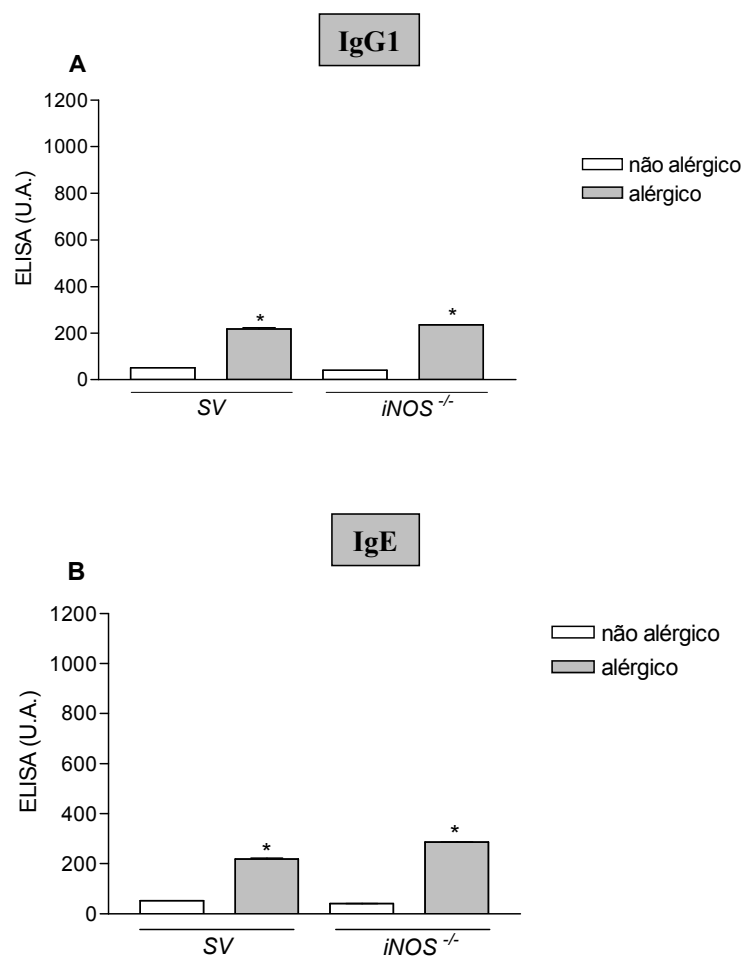
**FIGURA 26– Avaliação da área granulomatosa no fígado.** Os grupos alérgicos receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. Todos os animais foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28. O tecido hepático foi coletado na sétima semana após a infecção e a área granulomatosa foi quantificada nos animais selvagens e IFNγ<sup>-/-</sup>. (p ≤ 0,05) ANOVA-Test T-Student.

#### **4.5 - AVALIAÇÃO DA ALERGIA ALIMENTAR E ESQUISTOSSOMOSE EM CAMUNDONGOS DEFICIENTES EM iNOS (iNOS<sup>-/-</sup>)**

##### **4.5.1 - Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA antes da ingestão de SCO a 20%.**

*A sensibilização parenteral foi capaz de induzir a produção de IgG1 e IgE nos SV e iNOS<sup>-/-</sup>*

Sete dias após a sensibilização secundária foi realizada uma sangria retro-orbital, nos animais dos grupos não alérgicos e alérgicos, selvagens (C57BL/6) e deficientes em iNOS, do mesmo background, para análise dos níveis das imunoglobulinas IgG1 e IgE anti-OVA. Os animais SV sensibilizados apresentaram significativos níveis de IgG1 e IgE anti-OVA mostrando que o protocolo de imunização foi capaz de desencadear a produção de imunoglobulinas específicas ao antígeno em relação aos grupos não alérgicos que receberam apenas o adjuvante hidróxido de alumínio (Figura 27). O grupo de camundongos sensibilizados deficientes em iNOS também apresentou elevação nos níveis dessas imunoglobulinas (Figura 27).

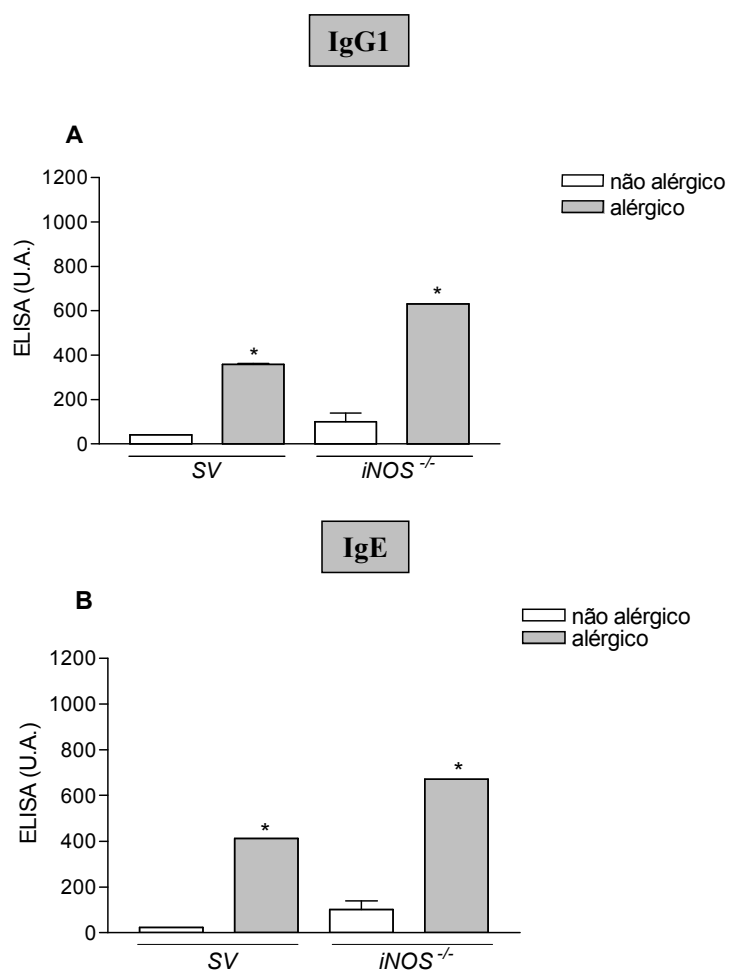


**FIGURA 27: Avaliação dos anticorpos IgG1 e IgE sete dias após sensibilização secundária.** Camundongos SV e *iNOS*<sup>-/-</sup> receberam 10 µg de OVA mais 1mg de Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e apenas OVA no dia 14. O grupo não alérgico recebeu apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Antes de serem desafiados com SCO, foi coletado o soro de todos os animais e feita a dosagem da imunoglobulina IgG1(A) e IgE (B) ant OVA. As barras representam a média dos valores obtidos na diluição 1/1600 para IgG1 e para o soro total para IgE comparado ao soro positivo sendo considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). Foram utilizados 5 animais/grupo. \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. ANOVA-Test T-Student.

#### **4.5.2 Avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA após a ingestão de SCO a 20%**

*A ingestão de SCO aumentou ou manteve os níveis de IgG1 e IgE anti-OVA nos SV e iNOS<sup>-/-</sup>*

Os grupos sensibilizados foram também desafiados oralmente com solução de clara de ovo a 20% enquanto os grupos não alérgicos continuaram a ingerir somente água. Sangrias foram realizadas 35 dias após o desafio, através de vasos axilares para análise da produção de imunoglobulinas específicas IgG1 e IgE. A ingestão prolongada através da solução contendo o antígeno (OVA) foi capaz de aumentar ou mesmo manter elevados os níveis dessas imunoglobulinas em todos os animais sensibilizados, selvagens e deficientes em iNOS (Figura 28).



**FIGURA 28 – Avaliação dos anticorpos IgG1 e IgE no soro após 56 dias de ingestão de SCO.** Camundongos SV e *iNOS*<sup>-/-</sup> receberam 10 µg de OVA mais 1mg de Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e apenas OVA no dia 14. O grupo não alérgico recebeu apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO permanecendo, ininterruptamente, por 56 dias. Foi coletado o soro de todos os animais e feita a dosagem da imunoglobulina IgG1 (A) e IgE (B). As barras representam a média dos valores obtidos na diluição 1/1600 para IgG1 e para o soro total para IgE comparado ao soro positivo sendo considerado como 1000 unidades arbitrárias (U.A.). Foram utilizados 5 animais/grupo. \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. ANOVA-Test T-Student.

### 4.5.3 AVALIAÇÃO GERAL

Camundongos SV e deficientes em iNOS foram monitorados ao longo de todos os protocolos experimentais, quanto:

#### **Peso corporal**

*Animais selvagens e deficientes em iNOS alérgicos não apresentaram perda de peso corpóreo*

Pode-se observar na Figura 29A que não houve diferença no peso corpóreo dos animais selvagens e deficientes alérgicos mesmo após o contato com o antígeno através da ingestão de SCO (desafio) ao longo de todas as semanas do experimento.

#### **Consumo de ração**

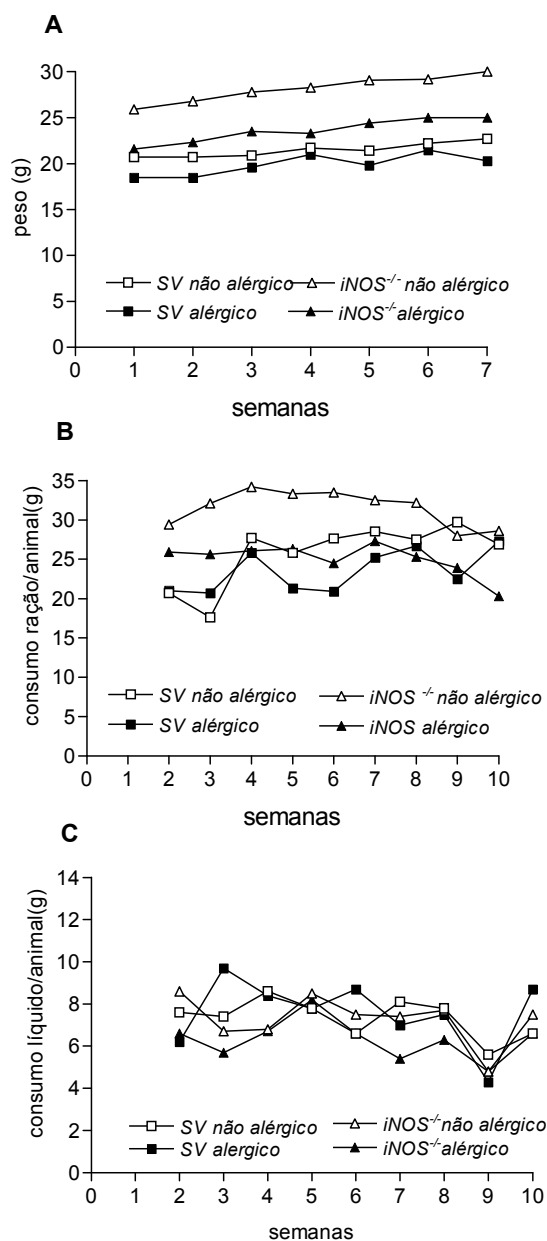
*Não houve diferenças significativas no consumo de ração entre os grupos*

A ração de todos os grupos foi pesada semanalmente. No entanto, não houve diferença significativa entre os grupos selvagens e deficientes, sensibilizados ou não (Figura 29B).

#### **Consumo líquido**

*Todos os grupos apresentaram o mesmo consumo líquido*

Sete dias após a sensibilização secundária, as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO, enquanto o grupo não alérgico permaneceu bebendo água durante todo o experimento. Essas mamadeiras foram trocadas e pesadas diariamente. Não foi observada diferença significativa entre os grupos selvagens e deficientes, sensibilizados ou não no consumo líquido (Figura 29C).



**FIGURA 29 - Avaliação Geral:** Camundongos SV e iNOS<sup>-/-</sup> receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária, somente as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. A. O peso corporal foi monitorado semanalmente, assim como o consumo de ração (B) e o consumo líquido (C.). (p≤ 0,05) ANOVA-Test T-Student.

#### **4.3.4 - AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL**

##### **Avaliação da Sobrevida ao Parasita**

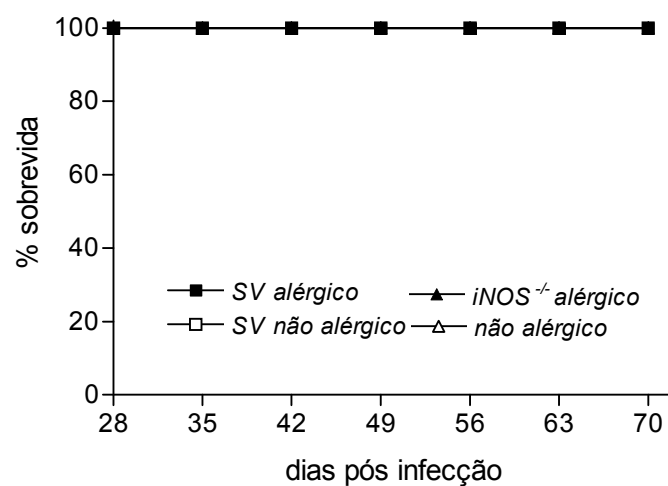
*A alergia não interferiu na sobrevida dos animais deficientes em iNOS*

Todos os animais foram infectados com 50 cercárias de *Schistosoma mansoni*. Vinte e oito dias após a sensibilização primária. A sobrevida foi total, não houve mortalidade em nenhum dos grupos selvagem ou iNOS<sup>-/-</sup> (Figura 30).

##### **Avaliação Parasitológica**

*Os animais iNOS<sup>-/-</sup> não alérgicos apresentaram diferenças nos padrões parasitológicos analisados*

Como descrito anteriormente, todos os animais foram submetidos à perfusão portal após sete semanas e tiveram os ovos expelidos nas fezes contados. Os grupos de animais selvagens apresentaram perfil parasitológico semelhante entre si. Porém os animais deficientes em iNOS mostraram diferenças significativas entre si e em relação aos SV: houve diminuição no número de ovos excretados nos animais não alérgicos quando comparados aos alérgicos e quando comparados aos SV, tanto não alérgicos quanto alérgicos (Tabela IV).



**FIGURA 30 – Índice de sobrevivência à infecção pelo *S. mansoni*.** Os grupos alérgicos receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. O gráfico acima mostra curva de sobrevivência a partir da infecção, ocorrida no dia 1. ( $p \leq 0,05$ ) ANOVA-Test T-Student.

**Tabela IV – Comparação parasitológica e morfológica entre os grupos selvagens e *iNOS*<sup>-/-</sup> infectados com *S. mansoni* alérgicos e não alérgicos.**

| <b>Grupos</b>                                | <b>intestino</b>                                          |                                   | <b>Ovos fecais<br/>(ovos/g)</b> | <b>casais de vermes</b> |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
|                                              | <b>Tamanho<br/>Granuloma (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b> | <b>Nºgranuloma<br/>(nº/campo)</b> |                                 |                         |
| <b>SV (OVA-/SCO-)</b>                        | 49,5 ± 4,5                                                | 1,0 ± 0,3                         | 302 ± 60                        | 11,0 ± 3,6              |
| <b>SV (OVA+/SCO+)</b>                        | 42,6 ± 32                                                 | 0,8 ± 0,1                         | 279 ± 42,7                      | 13 ± 2,3                |
| <b><i>iNOS</i><sup>-/-</sup> (OVA-/SCO-)</b> | 48,7 ± 13,7                                               | 0,8 ± 0,3                         | 366,4 ± 27,7**                  | 18 ± 2,6**              |
| <b><i>iNOS</i><sup>-/-</sup> (OVA+/SCO+)</b> | 47,3 ± 10,5                                               | 1,2 ± 0,1                         | 255,5 ± 30,4*                   | 14 ± 3,5                |

Camundongos selvagens (SV) e deficientes iNOS em (*iNOS*<sup>-/-</sup>) receberam 10 µg de OVA com Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 (s.c.) (OVA+), reforço de 10 µg OVA no dia 14 e solução de clara de ovo a 20% no dia 21 (SCO+). Todos os animais foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28. Após 49 dias da infecção, foi feita contagem dos ovos nas fezes e perfusão portal para contagem dos parasitas. Houve diminuição do número de ovos excretados pelos animais quando comparados aos selvagens. Nestes animais deficientes, o grupo alérgico (OVA+/SCO+) teve uma diminuição ainda maior na excreção dos ovos que os não alérgicos. O número de casais de parasitas nos animais deficientes para também foi significativamente menor que nos selvagens. O grupo alérgico teve uma diminuição ainda maior em relação aos normais. O número dos granulomas intestinais também só se mostrou significativamente diferente nos animais *iNOS*<sup>-/-</sup>. O grupo deficiente não alérgico teve diminuição nas reações granulomatosas quando comparado aos grupos selvagens, mas o grupo alérgico teve uma diminuição significativa, quando comparado ao grupo não alérgico. \* P < 0.05 comparado ao OVA-/ SCO - \*\* P < 0.05 comparado ao grupo selvagem. (ANOVA-Test T-Student).

## **Avaliação Morfológica**

- **Número de granulomas**

*O número dos granulomas hepáticos e intestinais foi diferente entre os grupos alérgicos SV e iNOS<sup>-/-</sup>*

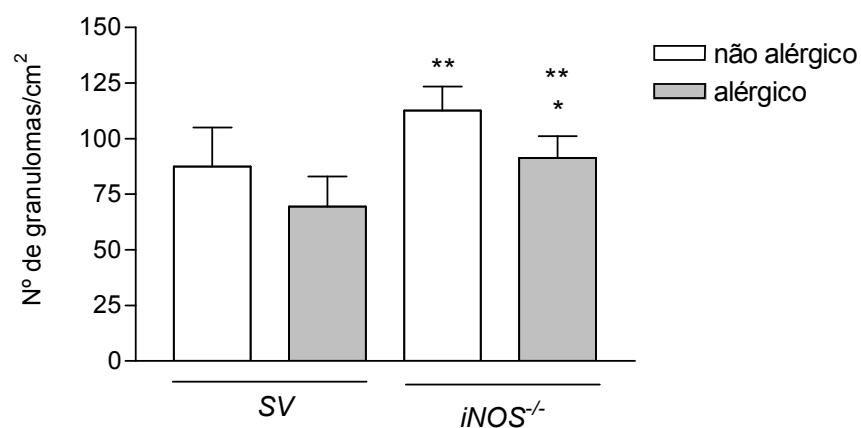
O fígado e o intestino de todos os animais foram necropsiados, processados e analisados histologicamente na sétima semana após a infecção com 50 cercárias. O número de reações inflamatórias granulomatosas, típicas dessa patologia, foi contado no fígado e intestino dos animais SV e deficientes em iNOS, alérgicos e não alérgicos.

O número de granulomas hepáticos não foi significativamente diferente entre os animais SV não alérgicos. Porém, quando comparamos aos animais iNOS<sup>-/-</sup> observamos significativo aumento (Figura 31). Os granulomas intestinais estão em menor número nos animais deficientes em iNOS, porém quando os mesmos estão alérgicos, o número é igual aos dos SV (Tabela IV).

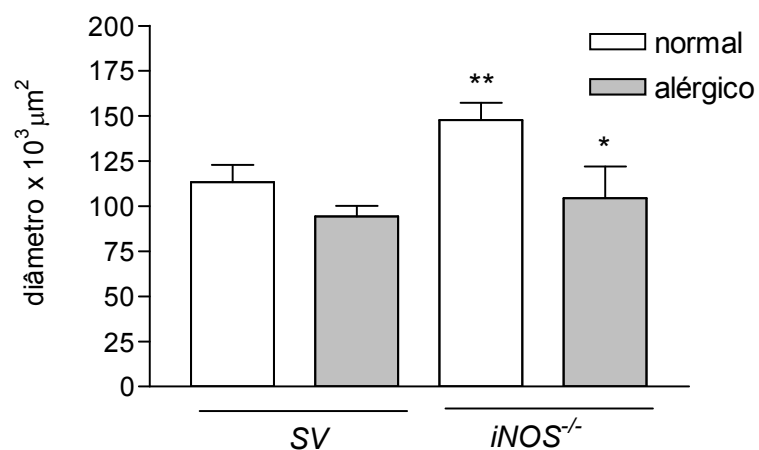
- **Área da granulomatosa**

*A ausência de iNOS foi capaz de aumentar os a área granulomatosa no fígado e a alergia reverteu este processo*

As áreas dos granulomas hepáticos e intestinais foram analisadas pela morfometria computadorizada. O número de granulomas hepáticos não foi diferente nos animais SV, porém os deficientes em iNOS apresentaram aumento no diâmetro dos granulomas hepáticos, o grupo alérgico porém mostrou diminuição desta área em relação ao grupo não alérgico (Figura 32). No intestino não houve alteração entre os animais SV e deficientes em iNOS, alérgicos ou não alérgicos (Tabela IV).



**FIGURA 31– Avaliação do número de granulomas hepáticos.** Os grupos alérgicos receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. No dia 28 todos os grupos foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni*. O tecido hepático foi coletado na sétima semana após a infecção e o número de reações granulomatosas foi contada no fígado de animais selvagens e de animais deficientes em iNOS \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. \*\* P < 0.05 comparado ao grupo selvagem. ANOVA-Test T-Student.



**FIGURA 32 – Avaliação da área granulomatosa no fígado.** Os grupos alérgicos receberam 10 µg OVA+1mg Al(OH)<sub>3</sub> (dia 0) e OVA no dia 14. Os grupos normais receberam apenas Al(OH)<sub>3</sub> no dia 0 e salina no dia 14. Sete dias após a sensibilização secundária as mamadeiras dos grupos alérgicos foram substituídas por SCO e os animais normais continuaram a beber água. Todos os animais foram infectados com 50 cercárias de *S. mansoni* no dia 28. O tecido hepático foi coletado na sétima semana após a infecção e a área granulomatosa foi quantificada no fígado dos animais selvagens e *iNOS*<sup>-/-</sup>. \* P < 0.05 em relação ao seu grupo não alérgico. \*\* P < 0.05 comparado ao grupo selvagem. ANOVA-Test T-Student.

## ***DISCUSSÃO***

## V – DISCUSSÃO

Modelos animais têm fornecido uma excelente oportunidade para examinar as consequências fisiológicas, biológicas, bioquímicas e imunológicas não só da alergia como também da esquistossomose, permitindo estudos da interação parasita hospedeiro.

Utilizando modelos experimentais de alergia e infecção pelo *Schistosoma mansoni*, avaliamos a produção de citocinas por vários órgãos, bem como a interferência da ausência de algumas dessas citocinas nos quadros dessas duas condições patológicas, tanto nas condições isoladas, como concomitantes.

### **5.1 - Alergia à ovalbumina em camundongos não infectados e infectados com *Schistosoma mansoni***

Animais sensibilizados com ovalbumina adsorvida em hidróxido de alumínio consumiram solução de clara de ovo durante quatro semanas, quando então foram feitas as dosagens de anticorpos no soro e citocinas no fígado, baço e intestino delgado. Esse tempo foi escolhido porque em experimentos prévios observamos que as manifestações desse quadro alérgico se apresentaram logo nas primeiras semanas pós-desafio, se estabilizando a seguir.

Os níveis de IL-4 e IL-13 nos tecidos analisados estavam aumentados nos camundongos alérgicos com relação aos não alérgicos (Figuras 4 e 5). Esses dados eram esperados uma vez que se sabe que o uso de adjuvantes como Al(OH)<sub>3</sub> induz a produção de IgG1 e IgE, anticorpos dependentes de IL-4 (FAQUIM-MAURO & MACEDO, 2000) e que as duas citocinas estão envolvidas na produção de IgE nas condições alérgicas (KABESCH et al., 2006). De fato, níveis elevados de IgG<sub>1</sub> e IgE foram detectados no soro dos animais selvagens imunizados (Figuras 9 e 10). Esse aumento dos níveis dos isotipos anafiláticos foi observado logo após a imunização secundária, antes mesmo do desafio e foi potencializado após a ingestão oral do antígeno.

A importância da IL-4 também foi confirmada com experimentos realizados com animais deficientes para essa citocina (Figuras 9 e 10). Os animais IL-4<sup>-/-</sup> não apresentaram aumento nos níveis destas imunoglobulinas após a sensibilização nem após o desafio oral, o

que já era esperado, pois a produção de IgG<sub>1</sub> e IgE induzida pelo adjuvante hidróxido de alumínio, é dependente de IL-4 (FAQUIM-MAURO & MACEDO, 2000).

A infecção posterior com *S. mansoni* reduziu tanto os níveis de IL-4, como de IL-13 nos órgãos analisados, quando comparamos animais não infectados e infectados, ambos alérgicos. No entanto, não houve diferença nos níveis séricos de IgG<sub>1</sub> e IgE anti-ovalbumina no final do experimento, ou seja 56 dias após consumo contínuo de clara que coincide com sete semanas após infecção (Fig.10).

Outra marca deste modelo de alergia é o emagrecimento dos animais selvagens (BALB/c) sensibilizados e desafiados oralmente com o antígeno, que ocorre uma semana após a imunização secundária e se mantém abaixo da média quando comparados aos animais não alérgicos por todo experimento.

Nossos experimentos anteriores mostraram que essa perda de peso corporal não está associada a um menor consumo de ração por este grupo, nem a uma má absorção dos nutrientes advindos da dieta, já que a mucosa intestinal, analisada morfometricamente, apresentou-se íntegra e os níveis de albumina sérica no soro não estavam alterados. A desidratação também foi excluída como possível causa para este emagrecimento, já que o teste de micro-hematócrito não se mostrou alterado. Embora não se tenha conhecimento do mecanismo envolvido no emagrecimento dos animais nesse modelo, concluímos também que a IL-4 é importante para esse sinal, uma vez que camundongos IL-4<sup>-/-</sup> submetidos ao protocolo de alergia alimentar não emagreceram.

Além de não interferir na produção de imunoglobulinas anafiláticas anti-ovalbumina, a infecção não alterou o emagrecimento observado na alergia (Figura 11).

Recentemente muitos trabalhos têm mostrado que a alergia está diminuída em pessoas com infecções helmínticas. Experimentalmente, esse dado também tem sido comprovado. Por exemplo, Bashir e colaboradores mostraram que a infecção helmíntica protege contra uma resposta alérgica a antígenos da dieta (BASHIR *et al.*, 2002). Nesse trabalho, camundongos C3H/HeJ foram primeiramente infectados com larva de *Heligmosomoides polygyrus* e, posteriormente, sensibilizados com proteínas do amendoim. Os autores observaram que os níveis de histamina e os níveis de IgE anti proteína do amendoim estavam diminuídos nos animais previamente infectados. Outro trabalho mostrou que a infecção por *S. mansoni* protegeu animais do choque anafilático (MANGAN

*et al.*, 2004). No nosso modelo, mesmo após a infecção, não houve mudança na produção de anticorpos IgE e IgG1 antiovalbumina, bem como o emagrecimento não foi alterado. Provavelmente essa modulação não ocorreu devido à condição alérgica ter sido anterior à da infecção.

Uma das principais citocinas envolvidas na caquexia observada em pacientes com câncer é o TNF- $\alpha$ . De fato, o aumento de TNF $\alpha$  observado no fígado dos animais alérgicos poderia estar refletindo o que está ocorrendo de forma sistêmica nestes animais e justificar o emagrecimento deste grupo. Os níveis de TNF- $\alpha$  foram detectados apenas no fígado e se mostraram significativamente maiores nos animais alérgicos (Figura 8). A infecção não interferiu nos níveis de TNF- $\alpha$  gerados pela indução da alergia (Figura 8). Níveis aumentados de TNF- $\alpha$  levam à caquexia e caracterizam um quadro clínico semelhante ao observado no nosso modelo de alergia, não só pela perda de peso corporal como também pela aparência debilitada e diminuição do pâncreas adiposo.

O IFN- $\gamma$  tem sido associado de forma negativa com processos alérgicos, isto é, geralmente a produção desta citocina por células T de pacientes alérgicos é menor quando comparados com pacientes não alérgicos (NG *et al.*, 2002; SCOTT-TAYLOR *et al.*, 2005). Em acordo com dados da literatura, no nosso modelo de alergia, os níveis de IFN- $\gamma$  foram significativamente reduzidos no baço e fígado dos animais alérgicos quando comparados aos não alérgicos (Figura 7). Esses níveis não foram alterados pela infecção concomitante (Figura 7). Embora a produção de IFN- $\gamma$  tenha sido reduzida nos camundongos selvagens alérgicos, camundongos deficientes em IFN- $\gamma$ , submetidos ao mesmo protocolo de alergia, tiveram produção de IgE e IgG1, bem como pesos corpóreos (Figura 23), semelhantes aos encontrados em animais selvagens. Esses dados mostram que, embora o IFN- $\gamma$  esteja diminuído na alergia, sua ausência não exacerba os sinais da alergia, como visto em outros modelos. Yoshida e colaboradores, por exemplo, observaram que a responsividade respiratória e o infiltrado de eosinófilos no lavado broncoalveolar, induzidos pelo desafio de ovalbumina em camundongos sensibilizados, estão aumentados em camundongos deficientes em IFN- $\gamma$  (YOSHIDA *et al.*, 2002).

A IL-10 também está relacionada com a proteção da mucosa intestinal e seus níveis estão aumentados no intestino inflamado (LINDSAY & HODGSON, 2001). Os níveis elevados de IL-10 (Figura 6), dosados nos animais alérgicos no fígado e baço, nos levam a acreditar que no intestino delgado também há aumento desta citocina que estaria protegendo a integridade da sua mucosa. Além da IL-10, outros fatores de proteção, tais como o ácido gástrico, enzimas proteolíticas que degradam as proteínas alimentares, a motilidade intestinal que reduz o contato da mucosa com substâncias potencialmente antigênicas, a produção do muco que recobre continuamente e de forma aderente toda a sua extensão, são essenciais para proteção da mucosa intestinal (BRANDTZAEG, 1995). Provavelmente no nosso modelo de alergia, a preservação da integridade da mucosa intestinal, mesmo com a exposição contínua ao antígeno por via oral, reflete a ação integrada destes mecanismos protetores. Os níveis de IL-10, principalmente no fígado, foram reduzidos no animal com alergia concomitante à infecção (Figura 6), no entanto esse dado não interferiu no peso dos animais (Figura 17).

Animais deficientes em IL-10, assim como os selvagens, mesmo sendo de outro *background* (C57BL/6), produziram IgE e IgG1 após a sensibilização e desafio quando comparados aos não alérgicos (não sensibilizados e não desafiados). Isso mostra que a IL-10 não interfere na produção de anticorpos anafiláticos.

A avaliação de animais deficientes em iNOS também mostrou que a produção de IgE e IgG1, bem como o peso corpóreo, não se modificam na ausência de NO sendo equivalentes nos animais selvagens e deficientes alérgicos. Nos três últimos casos (animais deficientes em IL-10, IFN- $\gamma$  e iNOS), os animais tinham o *background* C57BL/6. Embora esses animais produzam anticorpos anafiláticos, não foi observada redução de peso após indução da alergia. Dados recentes de nosso laboratório mostram que, embora o protocolo de alergia alimentar utilizado não tenha induzido perda de peso nos animais C57BL/6, há retenção de líquido e diminuição da gordura abdominal após ingestão contínua de dieta contendo ovalbumina por camundongos sensibilizados com ovalbumina (MOREIRA, 2006). Esse dado mostra que o modelo de alergia também tem interferência nesses animais. Esse parâmetro poderá ser analisado em futuros experimentos com os camundongos deficientes para IL-10, IFN- $\gamma$  e iNOS.

## **5.2 - Infecção pelo *S.mansoni* em camundongos não alérgicos e alérgicos à ovalbumina**

A infecção pelo *Schistosoma mansoni* é caracterizada imunologicamente por uma alternância nas respostas Th1 e Th2 ao longo do processo infeccioso que é observada também ao longo da infecção experimental em camundongos (PEARCE *et al.*,1991).

Mais recentemente, o interesse neste parasita tem aumentado devido às demonstrações de que a maturação e a fecundidade do *schistosoma* são, de alguma maneira, dependentes da resposta imune do hospedeiro. O *schistosoma*, assim como outros helmintos parasíticos, induz uma resposta Th2, fornecendo um excelente modelo para estudar o desenvolvimento e a função desse tipo de resposta imune.

Em experimentos prévios, animais BALB/c alérgicos infectados com *S. mansoni* apresentaram alto índice de mortalidade a partir da sétima semana de infecção mostrando que a alergia repercutiu fortemente na sobrevida desses animais (GARGIULO, 2002). Nesse período de infecção, o tipo de resposta predominante descrita é Th2. Anteriormente, a resposta era exclusivamente Th1, mas, com o início da oviposição, em torno da quinta semana, a resposta Th2 começa a se sobrepor, o que se reflete em uma diminuição das células CD4 e CD8 (FALLON *et al.*,1998). Portanto, a sobrevida do hospedeiro parece depender da capacidade de fazer um equilíbrio apropriado da resposta TH que é capaz de orquestrar o desenvolvimento do granuloma, prevenir a doença aguda debilitante e minimizar a fibrose e morbidade severa durante a infecção crônica.

As dosagens de citocinas características das duas fases da resposta do hospedeiro poderiam apontar uma possível mudança neste perfil imunológico que justificassem as alterações causadas pela alergia no curso da infecção.

Porém, quando as duas situações são concomitantes, alergia e infecção, as citocinas IL-4 e IL-13 diminuem significativamente em relação aos não alérgicos-infectados ficando com níveis iguais ou menores aos não alérgicos-não infectados.

Dados da literatura mostram que a resposta Th1 está relacionada com a alta morbidade nessa parasitose, e que a sua substituição pela resposta tipo Th2 se torna necessária, pois uma resposta Th1 continuada causaria uma resposta inflamatória excessiva e aumento da mortalidade (FALLON *et al.*,1998). Fallon e colaboradores mostraram que camundongos deficientes em IL-4 tiveram alto índice de mortalidade entre a 5<sup>a</sup> -7<sup>a</sup> semanas

pós-infecção, sugerindo que a IL-4 ou respostas IL-4 dependentes, têm um papel protetor na infecção (FALLON *et al.*, 2000). Nesse mesmo trabalho, é relatado também que na condição de deficiência dupla, IL-4 e IL-13, há também aumento da mortalidade. Nas duas condições, há uma redução do tamanho do granuloma hepático. No nosso trabalho, os resultados da diminuição da produção de IL-4 e IL-13 pelo fígado de camundongos alérgicos-infectados estão de acordo com o aumento da mortalidade nesses animais e com a reduzida reação granulomatosa nos fígados desses animais (Figura 14), embora não se saiba a razão que leva à diminuição dessas citocinas nesses animais, uma vez que nas duas condições a produção dessas citocinas é estimulada. Uma provável hipótese é a de que a superestimulação para a produção de citocinas Th2 pode ser requerida para o controle da alergia que, semanas depois, se torna insuficiente ou mesmo incompetente para o controle da infecção pelo *Schistosoma mansoni*.

Portanto, com base nesses resultados pode-se sugerir que o padrão de resposta Th1, presente em estágios iniciais nesta infecção, continue e não haja a substituição pelo padrão Th2 típico deste período nestes animais alérgicos-infectados.

Os experimentos realizados com camundongos deficientes em IL-4 reproduziram os dados de Fallon e colaboradores com relação à infecção com *S. mansoni*. A partir da sétima semana de infecção, a ausência de IL-4 também causou severa mortalidade. No entanto, embora sinais de alergia (produção de anticorpos e emagrecimento) não tenham ocorrido em animais deficientes em IL-4, a sobrevida frente ao *S. mansoni* não foi a mesma. Animais deficientes de IL-4 alérgicos-infectados tiveram sobrevida maior quando comparados com animais não alérgicos-infectados (Figura 12). Esse dado foi coerente com o tamanho do granuloma hepático, que também foi aumentado nesses animais alérgicos-infectados IL-4<sup>-/-</sup>, quando comparados com os selvagens nas mesmas condições experimentais (Figura 14).

A patologia intestinal é uma característica marcante na esquistossomose, pois durante a infecção os ovos eliminados pelos parasitas adultos localizados nas veias mesentéricas são translocados pela parede intestinal até o lúmen para serem excretados pelas fezes. O número de granulomas intestinais nos selvagens alérgicos foi menor que nos não alérgicos, o que foi justificado pelo maior número de ovos excretados nas fezes (Tabela I). Em nossos experimentos, camundongos deficientes em IL-4 alérgicos-

infectados apresentaram mais granulomas intestinais e menos ovos nas fezes que animais selvagens nas mesmas condições, mais uma vez mostrando que na ausência de IL-4 a alergia leva à diferente repercussão.

Com base nesses resultados vemos que a administração de ovalbumina com hidróxido de alumínio traz repercussões imunológicas mesmo na ausência de IL-4. Esse resultado também foi verificado por Brewer e colaboradores (BREWER *et al.*, 1996). Esses autores observaram que a administração de hidróxido de alumínio e ova em animais deficientes de IL-4, embora não tenha induzido à produção de IgG1 e IgE, foi capaz de estimular a produção de IgG<sub>2a</sub> e IL-5. Dessa forma, tanto uma resposta Th1 como Th2 pode ter sido estimulada nos animais.

A Figura 6 mostra que os níveis de IL-10 nos animais alérgicos-infectados foram menores quando comparados com os só alérgicos, ou só infectados. A diminuição de IL-10, causada pela infecção, não interferiu na alergia. No entanto, a mortalidade dos camundongos BALB/c alérgicos pode estar relacionada com a diminuição da produção de IL-10. Camundongos C57BL/6 também apresentam mortalidade frente ao *S. mansoni* na ausência de IL-10 (Figura 18), mostrando a importância dessa citocina na proteção frente ao parasita.

Admite-se que a interleucina 10 (IL-10) seja necessária para a regulação do granuloma na fase inicial, induzindo sua imunorregulação (WYNN *et al.*, 1998). A IL-10 é um importante depressor endógeno de síntese de citocinas do tipo Th1 e Th2. Além disso, sua indução auxilia a polarização da resposta tipo Th2 (SHER *et al.*, 1991; STADECKER & VILLANUEVA, 1994; AURIAULT, 1996).

A produção da IL-10, que ocorre simultaneamente com a redução na produção de INF- $\gamma$ , pode ser responsável pela supressão da síntese de citocinas pelas células Th1 (AURIAULT, 1996). Portanto a retirada desta citocina poderia estar levando à morte nos camundongos deficientes pela manutenção de um perfil imunológico Th1 que é deletério. WYNN *et al.* em 1998 mostraram que a retirada de IL-10 levou a um aumento da mortalidade e morbidade durante a fase aguda da doença.

Porém, quando a alergia é inserida nesse contexto há uma significativa redução na mortalidade, ou seja, na ausência de IL-10, a administração de ovalbumina e hidróxido de alumínio, ajuda de alguma forma, na proteção frente ao *S. mansoni*. O aumento da

sobrevida foi, mais uma vez, relacionado com o aumento da área granulomatosa no fígado, quando comparado ao animal não alérgico, também IL-10<sup>-/-</sup> e infectado (Figura 20).

Se pensarmos na área granulomatosa como fator protetor do hospedeiro contra a reatividade dos antígenos do ovo (SEA), diríamos que na alergia, na ausência da IL-10, estaria melhorando a infecção, o que explicaria o aumento da sobrevida destes animais em relação ao grupo não alérgico. Por outro lado, sabemos que a área granulomatosa é um local de grandes lesões teciduais que posteriormente são substituídas por fibrose. Sendo assim, na fase crônica da doença, possivelmente esta ausência de IL-10 na alergia acabe sendo maléfica.

Curiosamente, os dados parasitológicos mostram diferenças significativas entre os selvagens e IL-10<sup>-/-</sup>, como número menor de vermes e ovos excretados nas fezes, o que poderia estar acontecendo por modificações da resposta inicial ao esquistossômulo, impedindo-o de se transformar em verme adulto e conseqüentemente interferindo no número de ovos. Este dado pode estar mascarando os resultados do número de granulomas nestes animais, onde estas diferenças seriam mais significativas em relação aos selvagens.

Na sétima semana de infecção, não houve diferença nos níveis de IFN- $\gamma$  esplênicos e hepáticos dos camundongos não alérgicos e alérgicos (Figura 7). Da mesma forma, animais deficientes em IFN- $\gamma$ , citocina marcante na primeira fase de resposta ao parasita, não altero nem o índice de sobrevida, nem o tamanho e número de granulomas hepáticos.

A inexistência de mortalidade no grupo deficiente em IFN- $\gamma$  alérgico frustra nossas expectativas quanto a uma possível exacerbação da resposta Th1 como a causadora da mortalidade e diminuição da resposta granulomatosa no grupo selvagem. Porém, como o *background* destes animais é C57BL/6, e estes quando alérgicos não apresentaram mortalidade, isto poderia estar interferindo nessa avaliação. Portanto, a ausência desta citocina na alergia, aparentemente parece não ser importante na fase aguda da esquistossomose, pois além de não interferir na sobrevida, também não altera a formação granulomatosa. Talvez a deficiência desta citocina se reflita apenas na fase crônica onde seu aumento tem sido relacionado com a fibrose hepática em camundongos infectados (CZAJA *et al.*, 1989).

A retirada desta citocina aumenta indistintamente, no grupo alérgico e normal, o número de vermes e ovos excretados, o que pode estar refletindo um menor controle do

hospedeiro frente aos esquistossômulos, nas fases iniciais da infecção, o que ocasionaria um número maior de vermes adultos e conseqüentemente uma postura e eliminação maior de ovos. Este fenômeno, porém não foi capaz de interferir significativamente na mortalidade e morbidade destes animais.

A regulação da produção de óxido nítrico (NO) produzido durante a esquistossomose tem sido correlacionada com a morbidade e mortalidade, visto que animais IL-4 deficientes tiveram seus níveis aumentados (PATTON *et al.*, 2002). O NO estaria aumentando a apoptose e causando danos celulares pela produção de radicais tóxicos que acarretam extensas áreas de necrose (JAMES *et al.*, 1998; BRUNET *et al.*, 1999). A função do NO em várias doenças experimentais tem sido estudada usando inibidores de NO. A inativação da iNOS, uma das três isoformas da enzima conversora para a produção de NO, é uma das maneiras indiretas de se averiguar a produção de gás.

A inibição do NO por esta via não mostrou causar impacto na sobrevivência dos animais alérgicos ou não, mostrando que o NO parece não estar relacionado com a mortalidade observada nos selvagens. Porém, mais uma vez, o *background* C57BL/6 pode estar interferindo nestas conclusões.

Apesar disso, modificações morfológicas e parasitológicas foram observadas nesses animais, que sugerem um papel realmente protetor do NO visto que na sua retirada há aumento no número e área dos granulomas hepáticos. O número de vermes e ovos excretados pelas fezes nestes animais também se mostra alto provavelmente porque o NO ativa macrófagos que degradam os esquistossômulos, aumentando assim o número de parasitas adultos. A alergia, porém, quando induzida nestes animais deficientes, mostrou reverter estas alterações, tendo um papel protetor na infecção.

Por fim, nos animais infectados, o TNF- $\alpha$  estava aumentado no fígado de camundongos alérgicos, tanto infectados como não infectados. Da mesma forma que essa citocina pode estar relacionada com a caquexia dos animais alérgicos, pode também estar prejudicando a resposta frente ao parasita. A mortalidade nesse grupo também poderia se justificar por esta elevação de TNF- $\alpha$  pois de tão debilitados este grupo pode não estar resistindo a infecção.

Durante a fase aguda da doença, células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) produzem grande quantidade de TNF- $\alpha$ , bem como de interleucina-1 (IL-1) e de IL-6 que já foram detectadas no plasma de pacientes infectados (DE JESUS *et al.* 2002).

Nossos resultados ilustram como é intrincada a rede de citocinas principalmente em processos inflamatórios que ocorrem simultaneamente. E que a compreensão dos mecanismos que pioram a esquistossomose em animais alérgicos através de animais deficientes é confusa porque o sistema imune na ausência de determinada citocina pode encontrar outras vias e que o balanço das citocinas Th1/Th2 não consegue explicar tudo de forma coerente e lógica.

Várias linhas investigativas vêm sendo utilizadas para compreender estas interações. Trabalhos usando análises de DNA e genéticas refinadas prometem revelar de forma mais eficaz como esse equilíbrio é obtido. Essa informação deverá auxiliar as terapêuticas para a esquistossomose e doenças relacionadas. O entendimento de como o hospedeiro faz a decisão de montar as respostas Th2 durante a infecção permanece como uma área de alta prioridade, pois o entendimento do impacto da resposta imune hospedeiro parasita auxiliará na compreensão de outras patologias.

As células T regulatórias têm sido cada vez mais estudadas e sendo apontadas como responsáveis pela polarização da resposta Th2 em detrimento a Th1 durante infecções helmínticas (MCKEE & PEARCE, 2004). Portanto, uma possível explicação para a piora dos animais alérgicos frente ao *Schistosoma mansoni* seria a diminuição dessas células na alergia o que acarretaria em uma resposta Th2 deficiente que, como já foi extensivamente discutido acima, é fundamental para o curso desta normal desta parasitose. Este é um vasto campo para estudos futuros que se mostram promissores e ainda permanecem obscuros.

## **CONCLUSÃO**

## VI – CONCLUSÕES

Neste trabalho concluímos que o modelo de alergia utilizado foi capaz de, em camundongos BALB/c, produzir anticorpos IgE e IgG1 séricos específicos (anti-OVA) e emagrecimento e que esses fenômenos não ocorrem na ausência de IL-4. Além disso, a alergia foi capaz de aumentar a produção hepática de IL-4, IL-13, IL-10 e TNF- $\alpha$ , mas diminuir a de IFN- $\gamma$ . A infecção posterior com *S. mansoni* não interfere na produção de IgE, IgG1 e perda de peso, mas reduz a produção hepática de IL-4, IL-13 e IL-10.

O modelo de alergia quando utilizado em camundongos C57BL/6 também induz a produção de IgE e IgG1 séricas específicas, mas o emagrecimento. Esses fenômenos não são modificados na ausência de IL-10, IFN- $\gamma$  e iNOS. A infecção posterior com *S. mansoni* não interfere nos parâmetros de alergia analisados nesses camundongos C57BL/6 (produção de IgE, IgG1 e perda de peso).

Camundongos BALB/c infectados com *S. mansoni* apresentam mortalidade de 40% ao redor dos 49 dias após infecção. A produção de IL-4, IL-13 e IL-10 estão aumentadas no fígado. A ausência de IL-4 aumenta a mortalidade, bem como a condição alérgica. Nas duas condições, há diminuição da área do granuloma hepático. Outros mecanismos protetores são desencadeados após a alergia em camundongos deficientes de IL-4, frente ao parasita.

Camundongos C57BL/6 infectados com *S. mansoni* não apresentam mortalidade. A sobrevivência é reduzida na ausência de IL-10, mas não na ausência de IFN- $\gamma$  e iNOS, ou na condição alérgica. A alergia em animais deficientes em IL-10 induz mecanismos protetores, também relacionados com o aumento da área do granuloma hepático.

***REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS***

## VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS A. K., MURPHY K.M., SHER A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383: 787-793, 1996.
2. ANDERSON J. A. Milk, Eggs and Peanuts: Food allergies in children. *Am Fam Physician*, 56: 1365-1374, 1997.
3. ARAUJO MI, BLISS SK, SUZUKI Y, ALCARAZ A, DENKERS EY, PEARCE EJ. Interleukin-12 promotes pathologic liver changes and death in mice coinfectd with *Schistosoma mansoni* and *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 69 (3): 1454-62, 2001.
4. ARAUJO, M.I. *et al.* Inverse association between skin response to allergens and *Schistosoma mansoni* infection. *Inst. Arch. Of Allergy Immunol*, 2000; 123:145 –148.
5. BARAU & DUPONT, C. Modifications of intestinal permeability during food provocation procedures in pediatric irritable bowel syndrome. *J. Pediatric irritable bowel syndrome. J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 11 (1): 72-77, 1990.
6. BASHIR MEH, ANDERSEN P, FUSS IJ, SHI HN, NAGLER-ANDERSON C. An enteric helminth infection protects against an allergic response to dietary antigen. *J Immunol*, 169: 3284-3292, 2002.
7. BELL, RG. IgE, allergies and helminth parasites: A new perspective on an old conundrum. *Immunol.Cell.Biol.*, 74: 337-45 ,1996.
8. BOCK, SA. A critical evaluation of clinical trials in adverse reactions to foods in children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 78: 165-74, 1986.
9. BOGDAN, C., Y. VODOTZ, J. PAIK, Q.W. XIE ANT C. NATHAN. Mechanism of suppression of nitric oxide synthase expression by interleukin-4 in primary mouse macrophages. *J. Leukocyte Biology*. 55: 227-233, 1994.
10. BOROS, D.L. Immunoregulation of granuloma formation in murine schistosomiasis mansoni. *Ann. NY Acad. Sci.* 465:313-323, 1986.
11. BRADLEY, J., Mc CLUSKEY, J. *Clinical Immunology. Oxford University Press*, 1997.
12. BREWER JM, CONACHER M, SATOSKAR , BLUEETHMANN H, ALEXANDER J. In interleukin-4-deficient mice, alum not only generates T helper responses equivalent to Freund's complete adjuvant, but continues to induce T helper 2 cytokine production. *Eur. J. Immunol*, 26 (9): 2062-6, 1996. BRITO, T., FRANCO, M.F. Granulomatous inflammation. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 36(2): 185-192, 1994.
13. BROSTOFF & GAMLIN, 2000. Food Allergies and food intolerance: the complete guide to their identification and treatment. *Healing Arts Press*, Rochester, Vermont, 2000.
14. BRUNET, R. L., FINKELMAN, F.C., CHEVER, M.A. KOPF, PEARCE, E.J. IL-4 protects against TNF- $\alpha$  mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *J. Immunol.* 159:777. 1997.
15. BRUNET, R. L., BEALL, M., DUNNE, D.W., PEARCE, E. J. Nitric oxide and Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *S. mansoni* infection. *The Journal of Immunology*, 199, 163: 4976-4984.

16. BURKS, A. W., JAMES, J.M., HIEGEL, A. Atopic dermatitis and food hypersensitivity reaction. *J. Pediatr.* 132:132-136, 1998.
17. CARA D.C. Mudança de preferência a sabores induzida imunologicamente em camundongos. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 110p, 1995.
18. COELHO, P.M.Z., TOPPA, N.H., FELDMANN, J.S. ET AL. Schistosoma mansoni: Permanence of modulation of granulomatous inflammatory response in mice cured in chronic phase. *International Journal for Parasitology.* 26 (12): 1393-1395, 1996.
19. CHRISTIE L, HINE RJ, PARKER JG & BURKS W. Food allergies in children affect nutrient intake and growth. *Journal of American Dietetic Association*, 102: 1648-1651.
20. CZAJA, M.J., F.R. Weiner, S. Takahashi, M. A. Giambrone *et al.*,  $\gamma$ -Interferon treatment inhibits collagen deposition in murine schistosomiasis. *Hepatology.*, 10:795.
21. DE JESUS, A. R. *et al.* de Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *Journal Infect.*, 185: 98-105, 2002.
22. DE WITT, W. B., WARREN K.S. Hepatosplenic schistosomiasis in mice. *Am J Trop Med Hyg*, 6: 440-446, 1959.
23. ELSE, KJ (a); HULTNER, L; GRENCIS, RK. Modulation of cytokine production and response phenotypes in murine trichuriasis. *Par. Immun.*, 14: 441-9, 1992.
24. ELSE, KJ (B); HULTNER, L; GRENCIS, RK. Cellular immune responses to the murine nematode parasite Trichuris muris II. Differential induction of Th-cell subsets in resistant versus susceptible mice. *Immunology*, 75:232-7, 1992.
25. FALLON, P. G., P. SMITH, AND D. W. DUNNE. 1998. type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection. *Eur. J. Immunol.* 28:1408.
26. FALLON, P. G, RICHARDSON, G. J. MCDENZIE, A. N. MCKENZIE. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J. Immunol.* 164:2585-2591, 2000.
27. FOX, S.W. & FOSTER, J.F. Some notable protein systems. In: Introduction to protein chemistry. New York, John Wiley & Sons, Inc. 353-65, 1957.
28. FULEIHAN, R.L. Allergy, immunology, and related disorders. *Curr Opin Pediatr* 10:581-583, 1998.
29. GARGIULO, D. L. Avaliação Da Esquistossomose Experimental Em Camundongos Com Alergia Experimental, 2002.
30. GEHA, R.S. Allergy, a disease of the internal and external environments. *Opinion in Immunology.* 12: 615-617, 2000.
31. GLASSMAN, S; NEWMAN, LJ; BEREZIN, S; GRYBOSKI, JD. Cow's milk protein sensitivity during infancy in patients with inflammatory bowel disease. *Am. J. Gastroenterol.*, 85(7): 838-40, 1990.
32. GODFREY RC. Asthma and IgE levels in rural and urban communities in The Gambia. *Clin.Allergy*, 5: 201-7 1975.

33. HAAS, H., FALCONI, F.H., HOLLAND M.J. ET AL. Early interleukin-4 towards a Th<sub>2</sub> response and interleukin-4: Its role in the switch towards a Th<sub>2</sub> response and IgE-mediated allergy. *Int. Arch. of Allergy and Immun.* 119: 86-94, 1999.
34. HELM R.M., BURKS A.W. mechanisms of food allergy. *Current opinion in Immunology*, 12 (6): 647-653, 2000.
35. HERNANDEZ, H.J., TRZYNA, W.C., CORDINGLEY, J.S., BRODEUR, P.H., STADECKER, M. J. Differential antigen recognition by T cell populations from strains of mice developing polar forms of granulomatous inflammation in response to egg *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.* 27: 666-670, 1997.
36. HOLT, P. G. MACAUBAS, C. STUMBLES, P. A., SLY, P. D. *Nature* 402, B12 (1999).
37. JANCAR, S.; SIROIS, M.G.; CARRIER, J.; BRAQUET, P.; SIROIS, P. PAF induces rat plasma extravasation and releases eicosanoids during anaphylaxis. *Inflammation*. 15: 347-54, 1991.
38. JARRET, E; BAZIN, H. Elevation of total serum IgE in rats following helminth parasite infection. *Nature (Lond.)*, 251: 613-4, 1974.
39. KABESCH M, SCHEDEL M, CARR D, WOITSCH B, FRITZSCH C, WEILAND SK, VON MUTIUS E. IL-4/IL-13 pathway genetics strongly influence serum IgE levels and childhood asthma. *J Allergy Clin Immunol*, 117 (2): 269-74, 2006.
40. KALLIOMAKI, M., SALMINEN, S., ARVILOMMI, H., KERO, P., KOSSINEN, P., ISOLAURI, E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*, 357: 1076-9, 2001.
41. KAY A.B. Overview of allergy and allergic diseases: with a view to future. *British Medical Bulletin*, 56(4): 843-864, 2000.
42. KOPF, M. G. Le Gross, M. BACHMANN, M.C. LAMERS, and KOHLER, G. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature*. 362; 245-248.
26. LANCET. The International Study of Asthma and Allergies in Childhood Steering Committee, *Lancet* 351, 122, 1998.
43. LEBREC, H; SARLO, K; BURLESON, GR. Effect of influenza virus infection on ovalbumin-specific IgE responses to inhaled antigen in the rat. *J. Toxicol Environ Health*, 49(6): 619-630, 1996.
44. LICHTENBERG, F. VON. Studies on granuloma formation- III. Antigen sequestration and destruction in the schistosome pseudotubercle. *American Journal of Pathology*. 45(1): 75-93, 1964.
45. LYNCH, N.R., HANGEL, I., PEREZ, M., DI PRISCO, M.C., LOPEZ, R., ALVAREZ, N. Effect of antihelminthic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 92: 404-411, 1993.
46. LOVIK, M. Do infections reduce the development of allergy ? Do measles reduce the risk of allergic disease? *Tidsskr Nor Lægeforen*, 117(5): 668-690, 1997.
47. MAHANTY, S. & NUTMAN, T. B. *Parasite Immunol.* 17, 385, 1995.
47. MANGAN NE, FALLON RE, SMITH P, VAN ROOIJEN N, MCKENZIE AN, FALLON PG. Helminth infection protects mice from anaphylaxis via IL-10-producing B cells. *J Immunol.* 2004 Nov 15;173(10):6346-56.

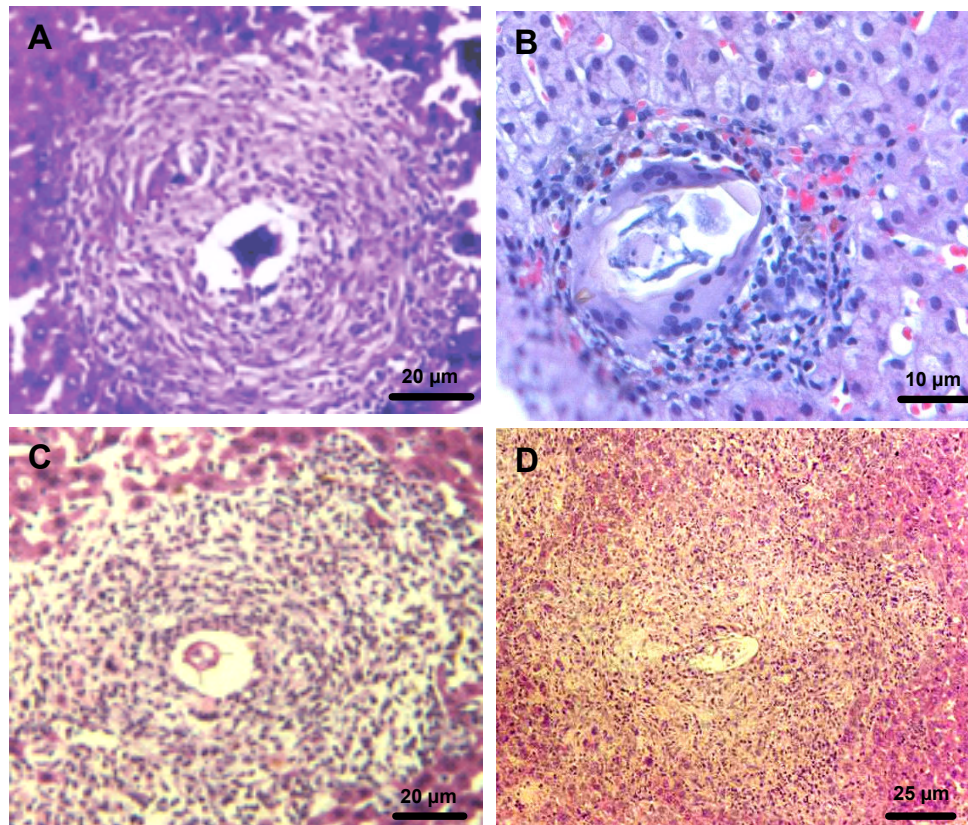
48. MASTERS S, BARRET-CONNOR, E. *Epidemiol. Rev.* 7, 49 1985.
49. MELO, A.L., COELHO, P.M.Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*, 10ª edição. São Paulo. Ed Atheneu. P. 428, 2000.
50. METCALFEF D.D., BARAM D. MEKORI, Y. A. Mast cells. *Phisiol ver*, 77: 1033-1079, 1997.
51. MOORE, D.L., GROVE, D.I., WARREN K.S. The *Schistosoma mansoni* egg granuloma: quantification of cell population. *Journal of Pathology*. 121: 41-50, 1977.
52. MOSMANN, TR; COFFMAN, RL. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional propertis. *Annu.Rev.Immunol.*, 7: 145-73 1989.
53. NG TW, HOLT PG AND PRESCOTT SL. Cellular immune responses to ovalbumin and house dust mite in egg-allergic children. *Allergy*, 57 (3): 207-14, 2002.
54. PASTORELLO, EA ; STOCCHI, L; PRAVETTONI, V; BIGI, AL; SCHIKE, ML; INCORVALA, C; ZANUSSI, C. Role of the elimination diet in adults with food allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 84: 465-823, 1989.
55. PEARCE, E.J., CASPAR, P., GRZYCH, J.M., LEWIS, F.A.,SHER, A. Downregulation of Th1 cytokine production accompaines induction of Th2 responses by parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *J. Exp. Med.* 173: 159-166, 1995.
56. PEARCE E.J., MACDONALD, A. S. The Immunobiology of Schistosomiasis. *Nature Reviews*, 2: 499-511, 2002.
57. PEREIRA, F.E.L. Etiopatogênese Geral da doenças. In: Filho, G.B., F.E.L., PITELLA, J.E.H., BAMBIRRA, E.A., BARBOSA, A.J.A. *Patologia Geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Kooggan, 1993, p. 220.
58. PEREIRA, F.E.L., BOGLIOLO, L. Inflamações. In: FILHO, G.B., PEREIRA, F.E.L., PITELLA, J.E.H., BAMBIRRA, E.A., BARBOSA, A.J.A. *Patologia Geral*. Rio de Janeiro: Guanabara Kooggan, 1993, p. 220.
59. PICCINNI M. P.; MAGGI E.; ROMAGNANI S. Environmental factors favoring the allergen-specific Th2 response in allergic subjects. *Annals of The New York of Sciences*, 917: 844-852, 2000.
60. PLAUT, M. Cytokines and modulation of disease of immediate hypersensitivity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 685: 512-20, 1993.
61. PLAUT, M. Cytokines and modulation of diseases of immediate hypersensitivity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 685: 512-20, 1993.
57. PRATA, A. Esquistossomose mansoni. In: Veronesi, R. *Doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 838-855, 1991.
58. RAMALINGAM, T.R., REIMAN, R.M., AND WYNN, A. T. Exploiting worm and allergy models to understand Th2 cytokine biology. *Curr Opion Allergy Clin Immunol* 5: 392-398, 2005.
59. REES, G.S.; GEE, C. K.; WARD, H. L.; BALL, C.; TARRANT, G. M.; POOLE, S.; bristow, A. F. (1999) Rat tumour necrosis factor alfa: expression in recombinat *Pichia pastoris*, purification, characterization and development of a novel ELISA. *Eur. Cytokine Netw* 10(3):383-92
60. ROMAGNANI S. The role of lymphocytes in allergyc disease. *J Allergy Clin Immunol*, 105: 3099-408, 2000.

61. SADLER, C.H., L.I. RUTIZKY, M. J. STADECKER, AND R.A. WILSON. IL-10 is crucial for the transition from acute to chronic disease state during infection of mice with *S. mansoni*. *Eur. J. Immunol.* 33:880.
62. SALDANHA J.C.S. Avaliação da resposta inflamatória à *Leishmania major* em camundongos com alergia alimentar. 2002.
63. SALDANHA J.C.S., GARGIULO D.L., SILVA S.S., CARMO-PINTO F.H., ANDRADE M.C., ALVAREZ J.I. TEIXEIRA M.M., CARA D.C. A model of chronic Ig-E-mediated food allergy in ovalbumin-sensitized mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 37 (6): 809-816, 2004.
64. SAMPSON, H.A. Role of food allergy and mediator release in atopic dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 81: 635-45, 1991.
65. SAMPSON, A. H. Anaphylaxis. *British Medical Bulletin*, 56 (4): 925-935, 2000.
66. SCOTT, P. KAUFMANN, S.H.E., The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immun. Today*, 12:346-348, 1991.
67. SCOTT-TAYLOR TH, HOURIHANE JB, HARPER J, STROBEL S. Patterns of food allergen-specific cytokine production by T lymphocytes of children with multiple allergies. *Clin Exp Allergy*, 35 (11): 1473-80, 2005.
68. SHIMOJO, N; KATSUKI, T; COLIGAN, JE; NISHIMA, Y; SASAZUKI, T; TSUNOO, H; SAKAMAKI, T; KOHNO, Y; NIIMI, H. Identification of the disease-related T cell epitope of ovalbumin and epitope-targeted T cell inactivation in egg allergy. *Int. Arch. Allergy Immunol*, 105(2): 155-61, 1994.
69. SICHERER SH (2002). Food allergy, *Lancet*, 360:701-710.
70. SILVA, L.M., FERNANDES, A.L.M., BARBOSA JR, A. et al. Significance of schistosomal granuloma modulation. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 95 (3): 353-361, 2000.
71. SMARTIN S., MARCOS A, CHANDRA R.K. Food hypersensitivity. *Nutrition Research*, 21 (3): 473-497, 2001.
72. SMITH, M.D. The ultrastructural development of the schistosome egg granuloma in mice. *Parasitology*. 75: 119-123, 1977.
73. STOKES, CR; MILLER, BG; BAILEY, M; WILSON, AD & BOURNE, FJ. The immune response to dietary antigens and its influence on disease susceptibility in farm animals. *Clin. Exp. Immunol.* 38: 497-502, 1987.
74. STRACHAN D.P. *Br. Med. J.* 299, 1259 1989.
75. TRINCHIERI G. A proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 251-276, 1995.
76. VASCONCELOS-PEDRAS, J.A., BRUNER, R.L., PEARCE, E.J. Profound effect of the absence of IL-4 on T cell response during infection with *S. Manson*. *J. Leukocyte Biology* 70: 737-744.
77. VAZ, N.M. & OVARY, Z. Passive anaphylaxis in mice with gG antibodies. I. PCA and RPCA reactions with homologous and heterologous antibodies. *J. Immunol.* 100: 169-74, 1968.
78. WARREN, K.S., DE WITT, W. B. Production of portal hypertension and esophageal varices in the mouse. *Proc Soc Exper Biol Med*: 98: 99-101, 1961.

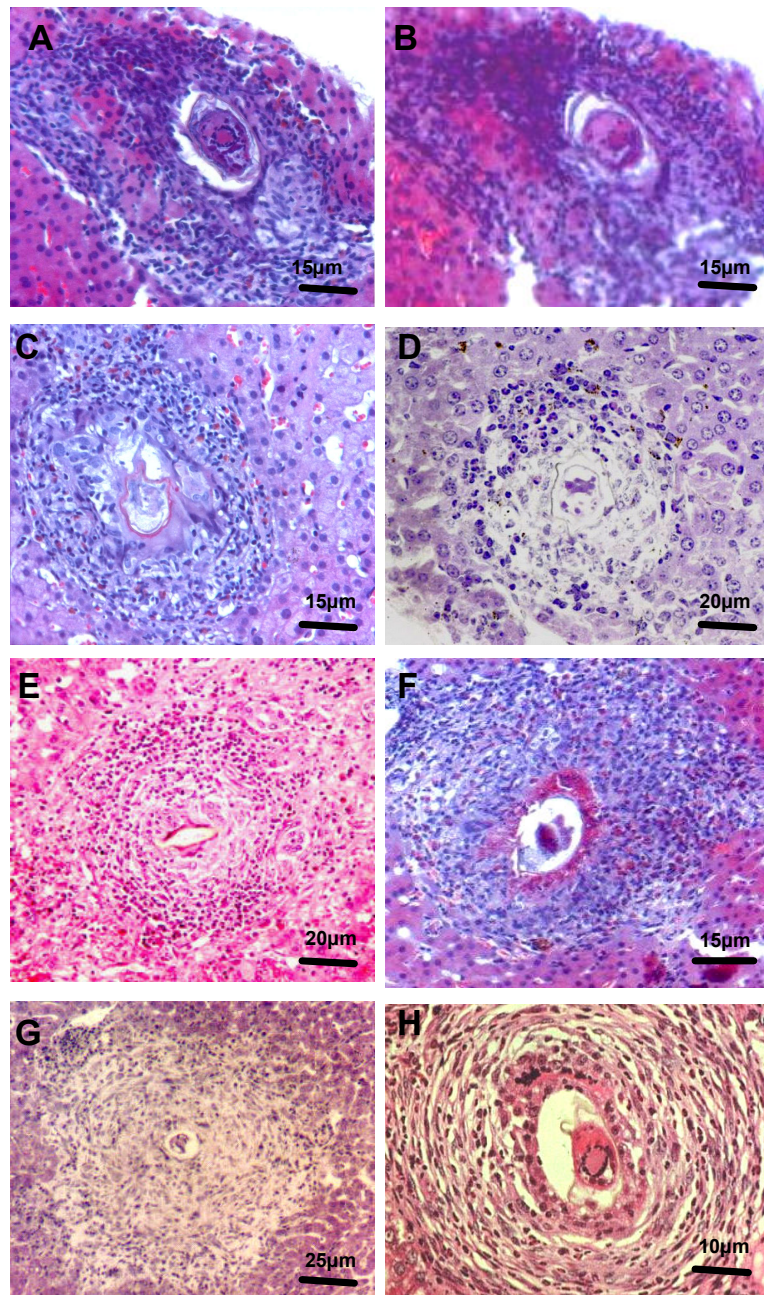
79. W.H.O. Schistosomiasis, 2000. [www.who.int/inf-fs/en/fact115.html](http://www.who.int/inf-fs/en/fact115.html).
80. WASSERMAN, S.I. Mediators of immediate hypersensitivity. *J. Allergy Clin. Immunol.* 72: 101-113, 1993.
81. WILLIAMS, G.T., WILLIAMS, W.J. Granulomatous inflammation – a review. *Journal Clinical Pathology*. 36: 723-733, 1983.
82. WOOLCOCK, A. J., PEAT, J.K. Evidence for the increase in asthma worldwide. *CIBA Found Symp*, 206: 122-34, 1997.
83. WYNN, T. A., CHEEVER, A. W. , WILLIAMS, M. E., HIENY, S., CASPAR, P., KUHN, R., MULLER, W. e SHER, A. IL-10 regulates liver pathology in acute murine *S. mansoni* but is not required for immune down-modulation of chronic disease. *J. Immunol.* 160: 4473.
84. YAZDANBAKHS M., VAN DEN BIGGELAAR, A. H. J. MAIZELS R. M., *Trends Immunol.* 22, 372 2001.
85. YEMANEBERHAN H *et al.*, *Lancet* 350, 85 1997.
86. YOSHIDA M, LEIGH R, MATSUMOTO K, WATTIE J, ELLIS R, O'BYRNE PM, INMAN MD. Effect of interferon-gamma on allergic airway responses in interferon-gamma-deficient mice. *Am J Respir Crit Care Med.*, 166 (4): 451-6, 2002.

***ANEXOS***

## VIII – ANEXOS



Aspecto típico dos granulomas hepáticos, após 7 semanas de infecção, *A*, camundongos selvagens (*BALB/c*) não alérgicos e selvagens alérgicos (*B*) que apresentaram redução na média de seus diâmetros em relação ao seus controles. *C*, camundongos *IL4*<sup>-/-</sup> não alérgicos e alérgicos (*D*) que apresentaram granulomas maiores que seus controles selvagens e deficientes não alérgicos (H&E).



Aspecto típico dos granulomas hepáticos, após 7 semanas de infecção, *A*, camundongos selvagens (*C57BL6*) não alérgicos e selvagens alérgicos (*B*) que não apresentaram diferenças significativas no diâmetro médio de seus granulomas. *C*, camundongos deficientes em *IFN* $\gamma$  não alérgicos e alérgicos (*D*) que não apresentaram diferenças significativas no diâmetro médio dos granulomas. *E*, granuloma de camundongos *IL10*<sup>-/-</sup> não alérgico e alérgico (*F*), ambos apresentaram aumento no diâmetro em relação aos selvagens. *G*, granuloma de camundongo deficiente em *iNOS* não alérgico com diâmetro aumentado em relação ao selvagem e alérgico (*H*) que apresentou diâmetro semelhante aos selvagens (H&E).

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)