



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG



AMANDA ESTEVES ROCHA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO PULMONAR
EM MURINOS INFECTADOS PELO *Schistosoma mansoni* E
ESTIMULADOS COM LPS**

Alfenas/MG

2014

AMANDA ESTEVES ROCHA FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO PULMONAR
EM MURINOS INFECTADOS PELO *Schistosoma mansoni* E
ESTIMULADOS COM LPS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências Aplicadas à Saúde – Área de concentração Fisiopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira.

Alfenas/MG

2014

Ferreira, Amanda Esteves Rocha.

Avaliação do processo inflamatório pulmonar em murinos infectados pelo *Schistosoma mansoni* e estimulados com LPS / Amanda Esteves Rocha Ferreira. - Alfenas, 2014.

59 f. -

Orientador: Alessandro Antônio Costa Pereira.

Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Saúde) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Esquistossomose. 2. Lipopolissacarídeos. 3. *Schistosoma mansoni*. I. Pereira, Alessandro Antônio Costa. II. Título.

CDD: 616.963

AMANDA ESTEVES ROCHA FERREIRA

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biosciências Aplicadas à Saúde – Área de concentração Fisiopatologia na Universidade Federal de Alfenas. Orientador: Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira.

Aprovada em: 14 / 02 / 2014

Prof. ALESSANDRO ANTONIO COSTA PEREIRA

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. 

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. 

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Assinatura: 

Dedico a Deus, a meu esposo
Luíz Paulo, aos meus pais, meu
irmão e amigos pelo apoio durante
a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade e apoio ao desenvolvimento da pesquisa na pós-graduação.

Ao Programa de Mestrado em Biosciências Aplicadas à Saúde, a todos os professores do programa, secretaria e ao coordenador, Professor Valdemar Paffaro Junior, pelas oportunidades de aperfeiçoamento que nos proporcionam.

Ao meu orientador, Professor Alessandro Antônio Costa Pereira, que contribui muito com meu desenvolvimento pessoal e intelectual.

A TAE Maria Ângela Rodrigues pela orientação, carinho e dedicação de tantos anos que foram fundamentais para minha formação.

A Professora Raquel Lopes Martins Souza pela imensa colaboração pelo apoio e dedicação muito preciosos.

Ao Professor Marcos Marcos José Marques pela disponibilidade e colaboração.

Ao Professor Alexandre Giusti Paiva pela contribuição com o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisa René-Rachou/FioCruz, em especial ao Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho e a Dra. Ana Carolina de Mattos pela disposição e apoio a desenvolvimento do trabalho.

As colegas, amigas e companheiras de trabalho Patrícia Espuri, Karina Ferreira e Letícia Almeida pelas imensas contribuições, conversas e risadas.

Ao colega Silas Santana que muito ajudou.

As funcionárias do laboratório de Patologia e Parasitologia, Liliane e Dona Maria Helena, por sua dedicação e cuidado com o desenvolvimento do trabalho.

A meus pais que nunca mediram esforços para minha educação.

A meu esposo, Luíz Paulo, que me apóia em todas as minhas decisões e mesmo quando estou ausente tem paciência e cuidado comigo.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

RESUMO

A esquistossomose, causada pelo helminto do gênero *Schistosoma*, é uma doença negligenciada no mundo e apresenta alta prevalência por estar associada principalmente com saneamento básico e educação sanitária insuficientes. A doença desenvolve formas clínicas no seu hospedeiro vertebrado, inicia-se com uma fase aguda e posterior desenvolvimento da fase crônica. A fase crônica da doença acarreta maiores prejuízos, um deles é o desenvolvimento de lesões no fígado, baço, intestino e pulmões. A hipertensão portal causada pela doença permite a migração de ovos aos pulmões, onde inicia-se uma resposta inflamatória granulomatosa. A migração de ovos pelos órgãos pode favorecer o deslocamento conjunto de bactérias em uma infecção natural. Para o estudo da ação das bactérias no organismo é comum a utilização de endotoxina da parede de bactérias Gram-negativas, denominada lipopolissacarídeo (LPS). Neste trabalho, avaliamos o processo inflamatório pulmonar estimulado com LPS em animais infectados com *Schistosoma mansoni* em fase crônica. Os grupos de estudo foram divididos em **Controle/Salina** (dividido nos períodos de 6h (n=6) e 24h (n=6)), **Schisto** (com 120 dias de infecção (n=6)), **LPS** (dividido nos períodos de 6h (n=6) e 24h (n=6)) e **LPS/Schisto** (dividido nos períodos de 6h (n=6) e 24h (n=6)). Observamos o aumento de células polimorfonucleares (PMNs) nas primeiras 6 horas após a inoculação de LPS, no grupo LPS ($p < 0,001$) em relação aos demais grupos; e o aumento ($p < 0,001$) de PMNs no grupo LPS/Schisto em relação aos grupos Controle/Salina e Schisto. Após 24 horas da inoculação de LPS, o processo inflamatório modificou-se com o aumento de células mononucleares (MNs), exceto no grupo Controle/Salina ($p < 0,001$). O número de PMNs permaneceu aumentado no grupo LPS/Schisto em relação ao grupo Controle/Salina ($p < 0,001$) e ao grupo Schisto ($p < 0,05$). A dosagem da concentração de óxido nítrico aumentou no grupo LPS ($p < 0,001$) em relação aos demais grupos, e no grupo LPS/Schisto ($p < 0,001$) em relação aos grupos Controle/Salina e Schisto em 6 horas após a inoculação do LPS. Os granulomas pulmonares não sofreram alteração significativa no tamanho entre os grupos Schisto e LPS/Schisto. Sugerimos com este trabalho que a esquistossomose em fase crônica pode causar a imunossupressão de uma infecção bacteriana Gram-negativa concomitante.

Palavras-chave: Esquistossomose. Lipopolissacarídeos (LPS). *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

Schistosomiasis, caused by helminth of the genus *Schistosoma*, is neglected disease in the world and has a high prevalence to be associated with areas where sanitation and hygiene education are insufficient. The disease develop clinical forms in their host vertebrate begins in an acute phase and subsequent development of chronic phase. The chronic phase of the disease causes major damage one of them is the development of lesions in the liver, spleen, intestines and lungs. The portal hypertension caused by disease allows the migration of eggs to the lungs here start a granulomatous inflammatory response. The migration of eggs may favor the displacement set of bacterial infection in a nature. To study the action of bacteria in the organs is common to use the endotoxin wall of Gram-negative bacteria the lipopolysaccharide (LPS). In this study, we evaluated the process pulmonary inflammatory stimulated with LPS in animals infected with *Schistosoma mansoni* chronic phase. The study groups were divided into **Controle/Salina** (divided into group Controle/Salalina 6 h (n = 6) and 24 h (n = 6)), **Schisto** (120 days of infection (n = 6)), **LPS** (divided into group 6 h (n = 6) and 24 (n = 6)) and **LPS / Schisto**(divided in groups 6 h (n = 6) and 24 h (n = 6)). Observed an increase in polymorphonuclear cells (PMNs) in the first 6 hours after inoculation of LPS in group LPS ($p < 0,001$) in relation to the other groups, and the increase ($p < 0,001$) of PMNs in group LPS/Schisto than in groups Controle/Salina and Schisto. After 24 hours inoculation of LPS the process change inflammatory modified with increased cells mononuclears (MNs) in groups, except in group Controle/Salina ($p < 0,001$). The number of PMNs remained increased in group LPS/Schisto when compared to group Controle/Salina ($p < 0,001$) and group Schisto ($p < 0,05$). The dosage of nitric oxide concentration increased in group LPS ($p < 0,001$) in relation to the other groups, and group LPS/Schisto ($p < 0,001$) in relation to groups Controle/Salina and Schisto in 6 hours after the LPS inoculation. The pulmonary granulomas did not change significantly in size between groups Schisto and LPS/Schisto This work suggest that schistosomiasis in chronic phase may cause immunosuppression of a Gram-negative bacterial infection concomitant.

Keywords : Schistosomiasis. Lipopolissacarídeos (LPS). *Schistosoma mansoni*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO₂ –	Gás Carbônico
DNA –	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i> –	<i>Escherichia coli</i>
HE –	Hematoxilina e Eosina
IFN-γ –	Interferon γ
IL –	Interleucina
LPS –	Lipopolissacarídeo
MN –	Célula mononuclear
NF-κB –	Fator Nuclear Kappa B
NO –	Óxido nítrico
PAMPs –	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PMN –	Célula polimorfonuclear
ROS –	Espécies reativas de oxigênio
<i>S. mansoni</i> –	<i>Schistosoma mansoni</i>
SEA –	Antígeno Solúvel do Ovo
SRIS –	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TBE –	Tribromoetanol
TLR –	Receptores Toll Like
TNF-α –	Fator de necrose tumoral- α
UTI –	Unidade de Tratamento Intensivo

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	11
2.	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	Esquistossomose	14
2.2	LPS	19
2.2.1	LPS e a infecção.....	20
2.2.2	LPS e a Sepse.....	21
3.	OBJETIVOS	24
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Grupos experimentais	25
4.2	Delineamento experimental	26
4.2.1	Infecção dos animais com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	26
4.2.2	Preparo e inoculação da solução de LPS.....	27
4.3	Dosagem do óxido nítrico	27
4.4	Avaliação morfológica pulmonar por microscopia óptica	28
4.4.1	Procedimento histológico.....	28
4.4.2	Quantificação dos parâmetros de celularidade.....	29
4.4.3	Análise da celularidade.....	29
4.4.4	Determinação do tamanho dos granulomas.....	30
4.4.5	Análise microscópica.....	30
4.5	Análise estatística	30
5.	RESULTADOS	31
5.1	Quantificação da celularidade	31
5.2	Dosagem de óxido nítrico	32
5.3	Aspectos microscópicos pulmonares	33
5.3.1	Microscopia do grupo Controle/Salina.....	33
5.3.2	Microscopia do grupo <i>Schistosoma mansoni</i>	33
5.3.3	Microscopia dos grupos 6 horas após a inoculação de LPS.....	34
5.3.4	Microscopia dos grupos 24 horas após a inoculação de LPS.....	35
5.4	Dimensão dos granulomas pulmonares	36
5.4.1	Aspectos microscópicos dos granulomas pulmonares.....	37
6.	DISCUSSÃO	39

7.	CONCLUSÃO	45
	REFERÊNCIAS	46

1 INTRODUÇÃO

O *Schistosoma mansoni* é um verme platelminto que possui ciclo heteroxeno, com aparente dimorfismo sexual. O seu ciclo de vida envolve os caramujos (gênero *Biomphalaria*), seus hospedeiros intermediários e mamíferos (principalmente o homem), seu hospedeiro definitivo. (ANDRADE; BINA, 1985; BRUNET et al., 1997; REY, 2001).

O *S. mansoni* é o causador da esquistossomose mansônica, conhecida popularmente por xistose, barriga d'água ou doença dos caramujos. A esquistossomose é endêmica e o controle da doença está associado com educação e saneamento básico. A patogenia no homem está associada à carga parasitária, à cepa do parasita e à resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção (REY, 2001).

Os vermes adultos fêmeas põem ovos que em sua maioria são eliminados junto com as fezes, porém parte destes ovos podem alcançar a circulação e ficar retidos nos órgãos do hospedeiro definitivo (REY, 2001; MELO; COELHO, 2005). A fase crônica da esquistossomose é caracterizada pelas formas clínicas desenvolvidas no intestino, fígado e pulmões do hospedeiro, nestes órgãos há o recrutamento de células inflamatórias que se instalam ao redor dos ovos, caracterizando a resposta granulomatosa (LENZI; LENZI; SOBRAL, 1987; REY, 2001).

Nos pulmões, os ovos se alojam a princípio em arteríolas ou em capilares pré-alveolares, bloqueando-os e forçando a abertura de capilares colaterais, por fim fixam-se no tecido onde se desenvolvem os granulomas. Os granulomas acarretam a hipertensão pulmonar, desenvolvimento de artrite obliterante e lesões angiomatóides comprometendo o funcionamento do órgão (ANDRADE; ANDRADE, 1970).

Todos os indivíduos estão susceptíveis a uma infecção bacteriana e a esquistossomose pode favorecer uma infecção, sobretudo na translocação dos ovos do intestino para outros órgãos quando poderá acarretar a movimentação conjunta de bactérias. A esquistossomose estimula o processo inflamatório: expressa citocinas e moléculas de adesão e estimulando a migração de células para o tecido infectado que pode resultar em ulceração da mucosa do trato gastrointestinal e

doença inflamatória sistêmica, além de alterar a capacidade da resposta imune intestinal (ONGURU et al., 2011). A perturbação da microcirculação e a lesão na parede do intestino também podem favorecer a chegada das bactérias na corrente sanguínea (SANDEK et al., 2008). Estes mecanismos poderão ser fonte de coinfeção bacteriana natural durante a esquistossomose, pois a mucosa intestinal e o endotélio sofrem perturbações devido a translocação dos ovos (KARANJA et al., 2002).

Os indivíduos que vivem em áreas endêmicas e estão constantemente expostos à infecção pelo *S. mansoni*, podendo ser concomitantemente infectados por bactérias presentes água, na microbiota epitelial ou ainda durante a penetração das cercárias (COSTELLO et al., 2009).

O LPS é uma endotoxina muito utilizada em experimentações animais, quando utilizada em altas doses, desenvolve o modelo experimental de sepse (THOMAS, 1954; FRACASSO, 2008; DUARTE et al., 2013). O termo sepse é definido como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) decorrente de infecção por bactérias, fungos, helmintos e vírus (FRACASSO, 2008; WIENS et al., 2012). Algumas alterações fisiológicas na sepse são na temperatura corporal (hipertermia e/ou hipotermia); na taquicardia e no aumento no número de leucócitos (MORISON; RYAN, 1987; BONE et al., 1992; FRACASSO, 2008). A sepse acomete 30% dos pacientes e pode levar a falência múltipla de órgãos (DAVIES; HAGEN, 1997; FRACASSO, 2008; DUARTE et al., 2013). Tem alta taxa de morbidade e mortalidade e é uma das principais infecções que exigem cuidados intensivos nas Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) (MARTIN et al., 2003; POVOA et al., 2005; DUARTE et al., 2013).

Muitas pesquisas buscam compreender os mecanismos envolvidos tanto na fisiopatologia quanto na imunopatologia da esquistossomose, assim como na sepse separadamente. Em consoante, o presente trabalho avaliou, após a administração de LPS em animais na fase crônica da esquistossomose o processo inflamatório pulmonar; a microscopia dos granulomas pulmonares; bem como a concentração do óxido nítrico, e correlacionou estes dados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O *S. mansoni* é um trematódeo, endoparasita de vertebrados, com corpo achatado dorsoventralmente, simetria bilateral, sem segmentação, são acelomados, seus órgãos de fixação são constituídos por duas ventosas, são dióicos e com nítido dimorfismo sexual (PLATT; BROOKS, 1997; REY, 2001; MELO; COELHO, 2005).

O desenvolvimento do *S. mansoni* está intimamente relacionado com sua capacidade de adaptação ao meio em que está vivendo (VERMEIRE et al., 2003). No ciclo do *S. mansoni* (FIGURA 1), a cercaria, forma larval do verme, proveniente do amadurecimento dos esporocistos presentes nos moluscos (*Biomphalaria glabrata*), penetra ativamente na pele, passa um período subcutâneo no qual sofre alterações bioquímicas e morfológicas específicas que rapidamente tornam o parasita apto a sobreviver no hospedeiro definitivo. Assim, há transformação de cercárias em esquistossômulos, estes, na derme, modificam-se morfológicamente, chegam ao sistema venoso ou linfático e migram para o pulmão, esta migração intrapulmonar ocorre na ausência de resposta inflamatória perceptível por parte do hospedeiro. Em torno de uma a duas semanas após a saída da pele os esquistossômulos chegam ao fígado, se desenvolvem rapidamente e logo se transformam em vermes adultos. Após a organogênese completa os vermes adultos vão para as veias mesentéricas do intestino (REY, 2001; MELO; COELHO, 2005; CROSBY et al., 2010). Os vermes adultos fixam nas veias mesentéricas do intestino, acasalam e põem ovos, aproximadamente 400 ovos são postos por dia na submucosa e na parede de capilares e vênulas, os ovos levam cerca de sete dias para se tornarem maduros (miracídio formado no interior do ovo) (REY, 2001; MELO; COELHO, 2005). Muitos ovos são excretados nas fezes e ganham o meio externo e na água os ovos liberam o miracídio, forma infectante para o caramujo. Entretanto, cerca de 50% dos ovos são carregados via circulação portal e podem ficar retidos nos tecidos induzindo a formação de granulomas hepáticos e intestinais, esplenomegalia e fibrose periportal (REY, 2001; MELO; COELHO, 2005; FAIRFAX et al., 2012).

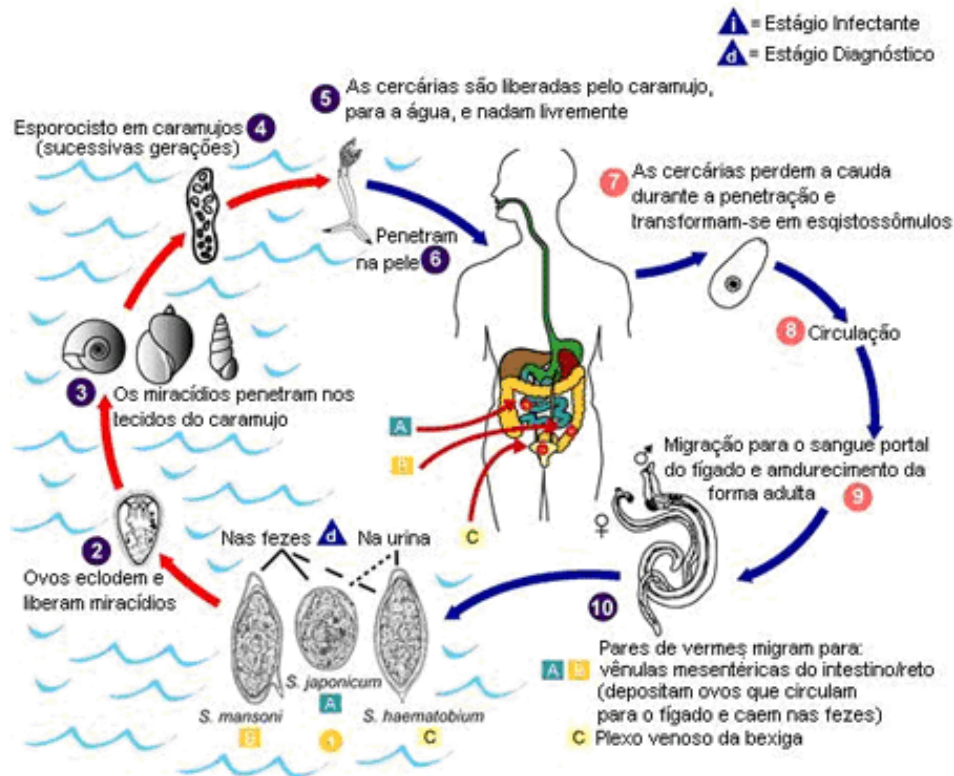


FIGURA 1 - Representação esquemática do ciclo biológico do *Schistosoma*.
FONTE: Modificado de CENTER FOR DISEASE CONTROL/Atlanta/USA.

2.1 Esquistossomose

No Brasil, o agente etiológico da esquistossomose mansônica, o *S. mansoni*, foi introduzido à época do tráfico de escravos, fixando-se ao encontrar hospedeiros intermediários susceptíveis (caramujos) e condições climáticas ideais. A princípio a esquistossomose se instalou na região canavieira no Nordeste do Brasil e, através dos movimentos migratórios que ocorreram em vários momentos da história econômica do país, espalhou-se para outras regiões (MELO; COELHO, 2005). Atualmente, a região Nordeste e o nordeste de Minas Gerais são as localidades mais acometidas pela doença que persiste principalmente pela falta de saneamento básico (FIGURA 2) (PLATT; BROOKS, 1997; REY, 2001; MELO; COELHO, 2005; FAIRFAX et al., 2012).

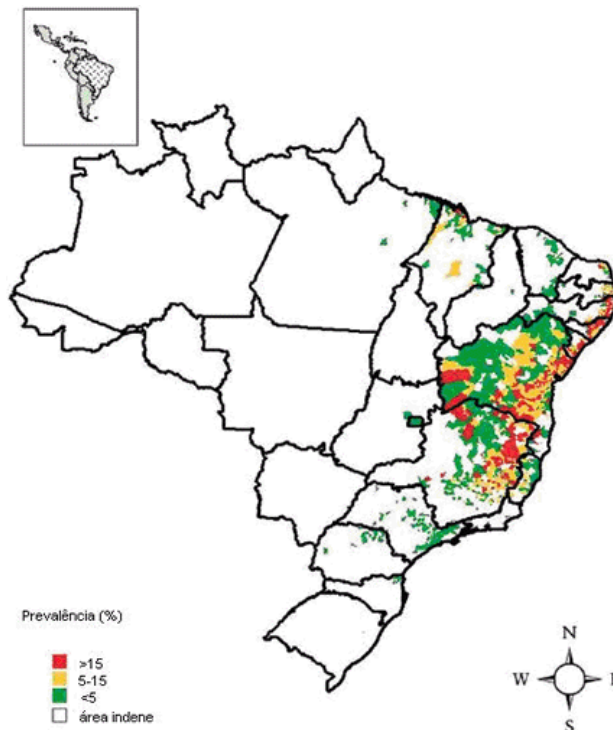


FIGURA 2 - Áreas endêmicas da esquistossomose mansônica no Brasil.
 FONTE: AMARAL et al., 2006.

A esquistossomose é endêmica em muitos países em desenvolvimento (ALPERT; IRWIN; DALEN, 1981; PEARCE; MACDONALD, 2002; FAIRFAX et al., 2012). Mais de 300 milhões de pessoas estão infectadas e o índice de mortalidade é cerca de 1% da população, conforme a World Health Organization (2006), devido principalmente aos efeitos diretos ou indiretos da infecção crônica, a doença e suas interações estimulam mais atenção científica e pública (ROSS et al., 2002).

Muitas intervenções, como programas de desparasitação, vêm sendo realizadas proporcionando impacto positivo na saúde dos pacientes (RICHARDS; MACP, 2013). Espera-se uma batalha contra as “doenças tropicais negligenciadas” visando uma abordagem integrada, as quais irão se juntar as doenças que são prioridades atuais HIV/AIDS, tuberculose e malária (W.H.O., 2012). Apesar dos presentes dados, a esquistossomose ainda não apresenta significativa atenção, sendo negligenciada, e por muitos anos foi considerada “menos importante” entre as doenças (BROOKER; CLEMENTS; BUNDY, 2004).

A patogenia da esquistossomose é caracterizada por duas fases: aguda e a crônica. A esquistossomose aguda é caracterizada pela presença de numerosos

granulomas periovulares (granulomas grandes, com muitos eosinófilos, com a periferia pouco delimitada e necrose periovular)(RASO; NEVES, 1965; PLATT; BROOKS, 1997; REY, 2001; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). As manifestações clínicas desta fase são caracterizadas por prostração, febre e eosinofilia que coincidem com alguns dias após a exposição cercariana, ou decorrido algumas semanas, quando inicia a eliminação dos ovos nas fezes surgem dores abdominais e diarreia acompanhada de muco e sangue (ANDRADE; BINA, 1985; REY, 2001). O organismo também pode gerar resposta inflamatória à presença do verme adulto causando lesões nos locais acometidos (DEMO, 2002).

A fase aguda pode evoluir relativamente rápido para a fase crônica. Esta exhibe uma condição bipolar, com um tipo de manifestação leve e outro grave (ANDRADE; BINA, 1985; REY, 2001; REZENDE et al., 2011). A forma crônica leve é encontrada na maioria dos indivíduos infectados nas áreas endêmicas, muitos são assintomáticos e eliminam ovos viáveis nas fezes. No fígado aparecem granulomas periovulares isolados que normalmente evoluem para cicatrização, o intestino geralmente é pouco lesado apesar dos vermes adultos se alojarem neste órgão (ANDRADE; PRATA, 1963, REY, 2001; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Já a forma crônica grave da doença é caracterizada por fibrose hepática periportal, como descrito por Symmers (1904). As lesões desta fase apresentam destruição e obstrução do sistema da veia porta intra-hepática, hipertensão do sistema porta sem esplenomegalia (forma hepática) ou com esplenomegalia (forma hepatoesplênica) (MELO; COELHO, 2005; REY, 2001).

A dilatação dos ramos colaterais no fígado ocorre devido à progressiva destruição dos ramos vasculares periféricos estabelecendo o aumento no fluxo sanguíneo que têm entre suas consequências a hipertensão portal e o aumento colateral portocaval, permitindo que os ovos sejam carregados pelo sangue portal (CHIRAKALWASAN et al., 2006; FAIRFAX et al., 2012). Os ovos ao serem embolizados podem alcançar o pulmão e se alojam nos pré-capilares alveolares. Em casos com embolização maciça ocorre a amputação dos pré-capilares e os ovos podem aparecer em colaterais dos médios e grossos ramos arteriais. Os ovos presos aos tecidos liberam continuamente antígenos, estes induzem respostas celulares Th2 polarizadas que promovem o desenvolvimento das lesões granulomatosas (PEARCE; MACDONALD, 2002; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013).

O granuloma esquistossomótico é um conjunto compacto e organizado de células da inflamação que unidas às células do órgão afetado, formam uma estrutura esférica, circundando o ovo. É caracterizado morfológicamente por fases de amadurecimento (fase nequentrópica de crescimento) e de involução (fase entrópica) (LENZI et al., 1991). Os granulomas são compostos por eosinófilos, macrófagos alternativamente ativados, linfócitos, neutrófilos, mastócitos e fibroblastos (METWALI et al., 1996). A indução dos granulomas é mediada por complexos de histocompatibilidade de classe II e linfócitos T CD4+ dirigidos especificamente aos antígenos solúveis do ovo (SEA, do inglês *soluble egg antigen*) (HERNANDEZ et al., 1997). A resposta imune conduzida por células Th2 é essencial à sobrevivência do hospedeiro, porém ela contribui no estágio crônico para o remodelamento vascular e uma subsequente reação fibrótica (BRUNET et al., 1997; FALLON et al., 2000; HERBERT et al., 2004; CROSBY; GRAHAM, 2009).

A presença de ovos e granulomas no pulmão podem induzir a hipertensão pulmonar (CROSBY et al., 2010). Com o desenvolvimento desta, os ovos podem formar êmbolos para a circulação pulmonar tendo como resultado uma lesão vascular que se manifesta pela “*cor pulmonare*” (CROSBY; GRAHAM, 2009). Shaw; Ghareeb (1938) e Lambertucci et al. (2000) realizaram estudos no Brasil e sugeriram que existe uma alta prevalência de hipertensão pulmonar na infecção por *S. mansoni*.

O determinante para o desenvolvimento da esquistossomose é o equilíbrio entre a expressão das citocinas pró e anti-inflamatórias (WYNN et al., 2004; CALDAS et al., 2008). Em estudo recente, foi demonstrado a importância das citocinas Th1 e Th2 no remodelamento vascular pulmonar associado ao número de ovos no órgão, destacando-se a IL-13 por sua ação nas células da musculatura lisa arterial (CROSBY et al., 2010). Um dos marcadores relacionados com a gravidade da doença é o aumento plasmático da molécula de adesão intercelular (ICAM-1), sendo um clássico marcador de ativação endotelial da inflamação (ESTERRE et al., 1998). Pesquisas relacionaram a importância da interação da célula endotelial e dos leucócitos na esquistossomose murina e outros eventos relacionados a esta interação, como a adesão de leucócitos, migração, permeabilidade vascular e a expressão da síntese constitutiva de óxido nítrico endotelial (eNOS), cujo principal produto é o radical livre NO (óxido nítrico) (KUBES et al., 1993; KUROSE et al., 1993). Trabalhos recentes sugeriram que a esquistossomose murina aumenta a

permeabilidade vascular e as interações entre células endoteliais e leucócitos, caracterizada por diminuição da expressão de eNOS e seu produto NO (OLIVEIRA et al., 2011).

Outro fator relevante que deve ser considerado durante a migração dos ovos do *S. mansoni* do intestino para outros tecidos é a movimentação conjunta de bactérias (ONGURU et al., 2011). Para ocorrer a passagem de bactérias e endotoxinas da luz intestinal para a corrente sanguínea, devem ocorrer, de forma isolada ou conjunta, a queda da imunidade, alterações da microbiota e quebra da barreira defensiva da mucosa intestinal (GALEEV et al., 2009; YPSILANTIS et al., 2010). Neste sentido, a ação traumática ocasionada pela migração dos ovos espiculados do *S. mansoni* também pode contribuir para a translocação das bactérias (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Estudo realizado em pacientes com esquistossomose mansônica crônica evidenciou a prevalência de bactérias aeróbias em linfonodos mesentéricos, concluindo que esta presença seria consequência da translocação dos ovos e favoreceria o desenvolvimento de complicações infecciosas pós-operatórias (FERRAZ et al, 2005). Estudo realizado em camundongos infectados com *S. mansoni* demonstrou que antes da postura dos ovos havia secreção de citocinas Th1 pelas células hepáticas, após a presença dos ovos e à presença do SEA, a resposta tende a ser Th2, com decréscimo na secreção de IFN- γ e IL-2, e elevação de IL-4 e IL-5; processo que parece promover imunodepressão na fase crônica da doença (ARAÚJO et al., 1977; ELIAS et al., 2005). Para Lima et al. (2012) a imunodepressão na fase crônica poderia facilitar a translocação dos ovos e permitir o desenvolvimento da sepse. Em um estudo realizado com pacientes em estágio crônico da esquistossomose, achados clínicos durante a endotoxemia persistente, demonstraram que não estavam associados à inflamação sistêmica e a outros problemas de saúde (MCDONNELL et al., 2011).

A translocação de ovos de *S. mansoni* e bactérias pelo intestino, fígado, pulmões e rins pode estar associada à estimulação ininterrupta do sistema imunitário (AOKI, 1978; ONGURU et al., 2011). Em consoante, estudos sugerem que moléculas derivadas do *Schistosoma*, em especial ligantes TLR4 (Receptores Toll Like 4) e inúmeras glicoproteínas, são imunossupressoras das respostas Th1, por serem ativamente promovidas pela imunidade Th2 (JENKINS et al., 2005; MARSHALL; PEARCE, 2008). Como por exemplo, os SEA inibem a ativação de

células dendríticas em resposta a LPS (KANE et al., 2004). Isto é mediado pela maturação e produção de IL-12, IL-16 e TNF- α por células dendríticas (VAN RIET et al., 2009). Estes fatos suportam a hipótese de que a esquistossomose aumenta a susceptibilidade à coinfeção por outros patógenos (EVERTS et al., 2010). Entretanto, a imunossupressão oriunda dos antígenos da esquistossomose pode ser clinicamente relevante frente a bactérias não patogênicas na circulação sanguínea (ONGURU et al., 2011).

2.3 LPS

O LPS é um constituinte da parede externa de bactérias Gram-negativas, tais como a *E. coli*, *Salmonella serovars*, *Coxiella burnetii* e demais *Enterobacteriaceae*. (FREUDENBERG et al., 2001). Sua administração é utilizada em pesquisas para indução de choque endotóxico e em muitos estudos é reconhecido como ativador de macrófagos (MARSHALL; CREERY., 1998; CHEN et al., 1996). A partir da administração exógena de LPS pode-se observar padrões correspondentes àqueles observados em pacientes sépticos, mimetizando as respostas do organismo na interação entre infecção/inflamação de fase aguda (MARSHALL; CREERY et al., 1998). Reações como febre, cefaleia, náusea, diarreia, alterações no número de leucócitos, coagulação intravascular disseminada, falência múltipla de órgãos, choque e morte são originadas da interação entre o LPS e as células do sistema imune (MORISON; RYAN, 1987).

A estrutura molecular do LPS é composta por duas partes, sendo uma formada de polissacarídeo e a outra de natureza anfipática, constituída por parte lipídica designada por lipídeo A. Para dissociar os agregados das moléculas de LPS que se formam devido sua parte lipídica na corrente sanguínea, o LPS liga-se a uma proteína ligadora de lipopolissacarídeo conhecida como LBP (CHABY, 1999). O complexo LPS-LBP é então capaz de interagir com monócitos/macrófagos e neutrófilos através dos receptores de superfície celular CD14 (LYNN; GOLENBOCK, 1992).

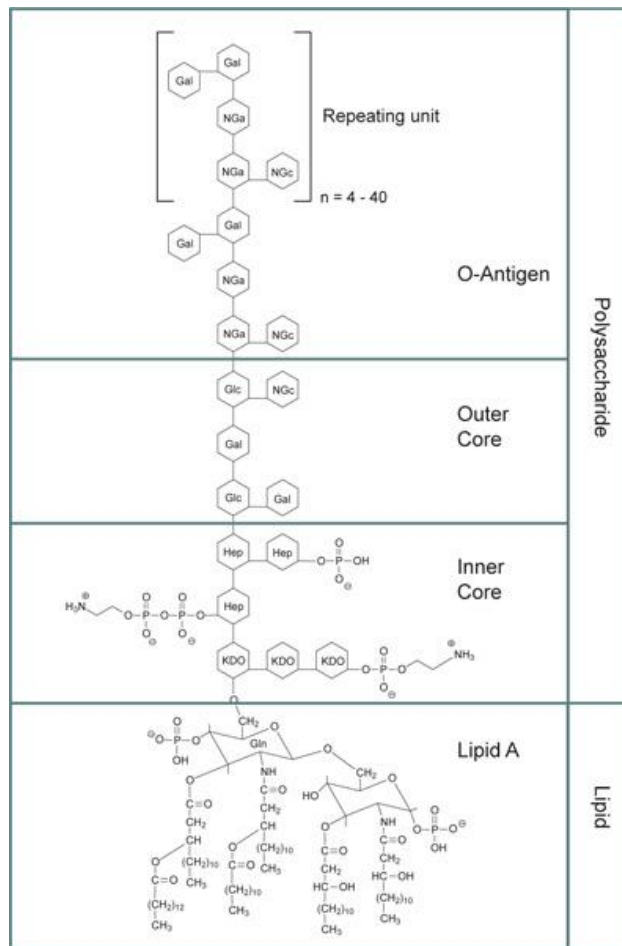


FIGURA 3 – Estrutura molecular do lipopolissacarídeo (LPS). Composto por uma cadeia polissarídea (hidrófila) e uma parte lipídica (lipídeo A- hidrofóbica).

FONTE: Sigma Aldrich.

2.2.1 LPS e a infecção

Após a inoculação de LPS, as células endoteliais são ativadas pela ligação destas ao complexo LPS-LBP e aos padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs), assim como aos mediadores derivados do hospedeiro, dentre estes quimiocinas, citocinas e proteases, resultando, na ativação de vias de sinalização intracelular e na produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6 (NELSON et al., 1989; FATTORI et al., 1994; HACK et al., 2001; MATSUDA; HATTORI, 2007). A resposta do endotélio a esta ativação é uma alteração para um estado pró-inflamatório e pró-coagulante, estando associados ao aumento na

adesão de plaquetas, monócitos e neutrófilos característicos da inflamação (SCHILDBERGER et al., 2013).

A inflamação é a resposta do organismo a estímulos nocivos, portanto pode lesar o tecido e envolve elevado consumo de energia metabólica, aumentando o risco de danos aos tecidos, sepse, insuficiência de múltiplos órgãos e à morte (NATHAN, 2002; BARTON, 2008). Primeiramente, a inflamação tende a resolver a infecção ou reparar o dano e retomar o estado de homeostasia do tecido, para isto é ideal que esta resposta seja ativada rapidamente, destruindo o agente causador da mesma (NATHAN, 2002). Neste aspecto, é muito importante o equilíbrio já que em infecções crônicas (como na esquistossomose), a resposta inflamatória pode causar mais danos para o hospedeiro do que propriamente o agente indutor desta resposta (SEGAL et al., 2000).

O estado inflamatório na presença de LPS é o resultado da expressão das moléculas de adesão endoteliais, com o aumento da migração e da manutenção da atividade celular no tecido lesado, com isto, há perda da capacidade homeostática do endotélio e passagem de líquido, células e proteínas para o espaço intersticial, formando o edema. As atividades dos neutrófilos e das células endoteliais liberam os metabólitos do ácido aracdônico, radicais livres e o fator de ativação plaquetária (CHEN et al., 1996). Esta disfunção endotelial está relacionada a inúmeros processos que envolvem doenças como a aterosclerose, síndromes inflamatórias e sepse podendo gerar a falência múltipla de órgãos (AIRD, 2008). Isto ocorre porque o LPS ativa TLR se liga aos leucócitos e no endotélio os quais conduzem a estimulação via NF- κ B (mediador pró-inflamatório) e por vias da proteína quinase que levam a síntese e liberação de mais mediadores pró-inflamatórios (GUHA; MACKMAN, 2001; BANNERMAN; GOLDBLUM, 2003).

2.2.2 LPS e a sepse

A inoculação de LPS funciona como um gatilho para a resposta imune do hospedeiro, e em modelos experimentais é utilizada como indutor das alterações fisiológicas e metabólicas associadas à sepse (DUARTE et al., 2013). A sepse tem início com uma infecção que leva a um estado pró-inflamatório, com a interação

complexa entre mediadores anti-inflamatórios e pró-inflamatórios e alterações na coagulação e fibrinólise (HOTCHKISS; KARL, 2003; AMARAL; OPAL; VINCENT, 2004). A sepse desde que presente no organismo ativa o processo inflamatório induzindo a vasodilatação, com aumento da síntese de NO (LANDRY; OLIVER, 2001).

A imunopatologia da sepse está relacionada com a interação da resposta imune do hospedeiro ao agente patogênico, esta resposta imune é acionada mediante a detecção de moléculas microbianas pelos PAMPs do sistema imune inato (WIERSINGA, 2011). As alterações no metabolismo provenientes da sepse por bactérias estão relacionadas com a ativação de receptores TLR-4 que estimulam a produção de citocinas via NF- κ B, que desempenham um papel fundamental na iniciação da resposta inflamatória (SCHILLING et al., 2011).

Dessa maneira, o conjunto de mediadores pró-inflamatórios e outras citocinas induzem alterações nos tecidos que levam este de um estado infectado para um estado inflamado (BARTON, 2008). O TNF- α , IL-1 e os outros mediadores levam a uma série de alterações morfológicas e moleculares que determinam o aumento da migração de leucócitos e do fluxo de plasma para o local infectado. Os neutrófilos, na maioria dos casos, chegam dentro de poucas horas no local da infecção, seguido por um influxo de monócitos (NATHAN, 2006). Os neutrófilos agem tanto sobre os microrganismos como no tecido do hospedeiro (NATHAN, 2006). Estas células possuem grânulos carregados com proteases capazes de degradar o material fagocitado e também produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) que desnaturam proteínas, lipídios e danificam o DNA gerando danos significativos tanto ao microrganismo quanto ao hospedeiro (NATHAN; SHILOH, 2000; TKALCEVIC, 2000). Todos os neutrófilos possuem um mesmo destino, morrem por apoptose e o local é tomado principalmente por macrófagos, atraídos pelos mesmos mediadores que os neutrófilos e tendem a contribuir para morte do microrganismo a partir da fagocitose, degradação de proteases, peptidases e ROS (BARTON, 2008).

Inicialmente a sepse é caracterizada clinicamente por pele quente e seca devido à vasodilatação periférica, culminando em febre, hipotensão, taquicardia, confusão mental, ansiedade e taquipneia. A evolução do quadro leva a hipoperfusão que resulta em acidose láctica, piorando a perfusão tecidual gerando um grau de cianose nas extremidades e disfunção orgânica dos tecidos periféricos (CASTRO; BORTOLOTTI; ZUGAIB, 2008; FRACASSO, 2008).

Em decorrência da sepse ocorre a hipertensão pulmonar que prejudica ainda mais o débito cardíaco, gerando disfunção ventricular direita. O deslocamento do septo interventricular para a esquerda, ocasionado pela dilatação ventricular direita, também pode dificultar o enchimento diastólico e, conseqüentemente, o preenchimento do ventrículo esquerdo, agravando ainda mais o quadro da disfunção dos tecidos periférico (AZEVEDO et al, 2007).

Desta forma, avaliamos o processo inflamatório tecido pulmonar estimulado por LPS com infecção crônica por *S. mansoni*, considerando que estudos realizados por Kane et al. (2004) concluíram que os antígenos oriundos dos ovos de *S. mansoni* possuem a capacidade de suprimir a resposta do organismo ao LPS em murinos e pesquisas realizadas com macrófagos circulantes do sangue periférico de pacientes com esquistossomose tiveram capacidade de resposta reduzida frente a exposição ao LPS (VAN DER KLEIJ et al., 2004). A partir das considerações expostas nesta revisão de literatura indaga-se como será o processo inflamatório pulmonar após a inoculação do LPS em organismos com doença inflamatória crônica.

3 OBJETIVOS

O objetivo de nosso estudo é analisar o perfil do processo inflamatório pulmonar em murinos infectados pelo *Schistosoma mansoni* e estimulados com LPS. A fim de alcançar este objetivo propõe-se:

- a) Quantificar a celularidade do infiltrado inflamatório pulmonar nos grupos experimentais;
- b) Quantificar a concentração de óxido nítrico do lavado intraperitoneal presente nos grupos experimentais;
- c) Avaliar as características morfológicas pulmonares nos grupos experimentais;
- d) Mensurar o diâmetro dos granulomas pulmonares na fase crônica da infecção experimental por *S. mansoni*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizados 42 camundongos da linhagem *Swiss* fêmeas, pesando de 25g a 40g, provenientes do Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisa René Rachou/*FioCruz*, da cidade de Belo Horizonte, MG, sendo 18 animais infectados com cercárias (cepa BH/LE) de *S. mansoni* e 24 animais não infectados. Estes os animais foram transportados para a sede da UNIFAL-MG e passaram por um período de aclimação de 45 dias antes do início dos experimentos.

Os animais foram mantidos em condições ambientais controladas de acordo com o ciclo circadiano em estante ventilada e climatizada ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$), em caixas de polipropileno, com no máximo 18 animais por caixa e separados por grupos, com livre acesso a ração e água, por 120 dias (contados a partir da data de infecção com as cercárias).

4.1 Grupos experimentais

Os camundongos foram divididos em 4 grupos:

- a) Grupo Controle/Salina - animais tratados com salina 0,9% (1ml/kg) e analisados após 6 horas (n=6) e 24 horas (n=6);
- b) Grupo Schisto - animais infectados com 25 cercárias de *S. mansoni* e analisados 120 dias após da infecção (n=6);
- c) Grupo LPS - animais inoculados com LPS (1mg/kg) e analisados após 6 horas (n=6) e 24 horas (n=6);
- d) Grupo LPS/Schisto - animais infectados com 25 cercárias de *S. mansoni* e após 120 dias da infecção, inoculados com LPS (1mg/kg) e analisados após 6 horas (n=6) e 24 horas (n=6).

4.2 Delineamento experimental

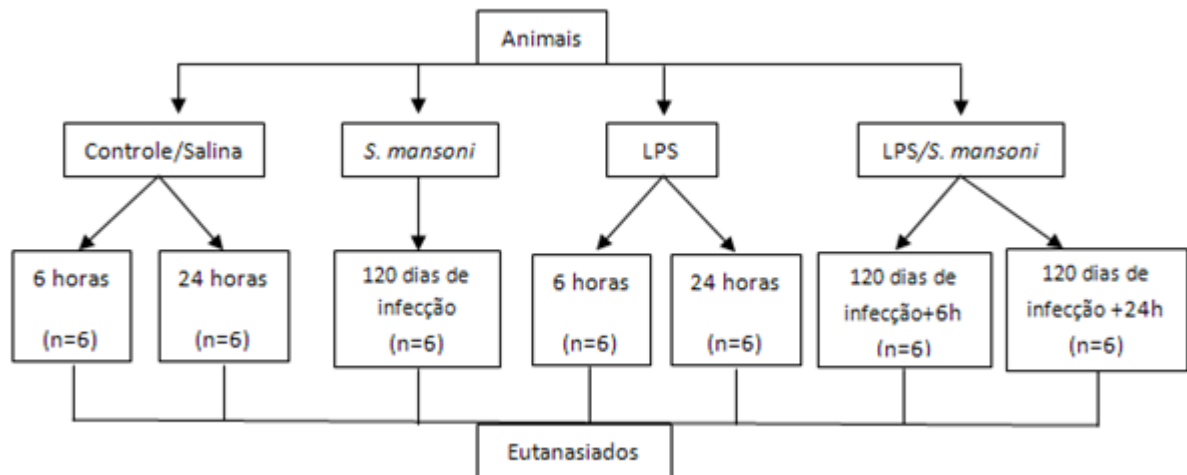


FIGURA 4 - Esquema do delineamento experimental.
FONTE: Do autor.

Os seis animais de cada grupo foram analisados quanto à 1) celularidade pulmonar, 2) concentração de óxido nítrico, 3) medidas da diagonal maior dos granulomas pulmonares e 4) análise histopatológica pulmonar, conforme a figura 4.

Os procedimentos foram realizados no Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) nos laboratórios do Departamento de Patologia, Parasitologia e do laboratório Biologia Molecular da UNIFAL-MG.

Conforme a figura 4 o presente estudo conta com quatro grupos experimentais, sendo que utilizamos a infecção dos murinos com cercárias de *S. mansoni* para induzir a esquistossomose e a inoculação do LPS a fim de estimular o processo inflamatório. Para o grupo Controle/Salina tratamos os camundongos com solução salina a 0,9% (1mL/Kg do animal) via intraperitoneal.

4.2.1 Infecção dos animais com cercárias de *Schistosoma mansoni*

No Centro de Pesquisa René Rachou/*FioCruz*, 18 camundongos foram infectados com 25 cercárias de *S. mansoni* com o seguinte procedimento:

As cercárias (cepa BH/LE) de *S. mansoni* foram obtidas a partir de caramujos

infectados com miracídios que são obtidos a partir dos ovos eliminados com as fezes de camundongos previamente infectados. Os caramujos liberaram a forma infectante - a cercária - a partir do contato com luz intensa (luz artificial de lâmpada fluorescente de 100 W).

Imediatamente as cercárias foram coletadas com seringa e colocadas em tubos de ensaio, como descrito por Magalhães (1969). As cercárias dos tubos de ensaio foram contadas, separadas imersas em salina e injetadas no camundongo na região peritoneal.

4.2.2 Preparo e inoculação da solução de LPS

O LPS foi obtido por meio do lipopolissacarídeo proveniente de *E. coli* do tipo O26:B6 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA). Foi preparada uma solução na qual 100mg de LPS foram diluídos em 10ml de solução salina a 0,9%. Esta solução foi dividida em eppendorfs em alíquotas de 100 μ L. A estas alíquotas foram adicionados 900 μ L de solução salina a 0,9%, assim obteve-se 1mg/ml de solução. Desta solução foi injetado via intraperitoneal 1ml/kg do animal, nos animais dos grupos LPS e LPS/Schisto.

4.3 Dosagem do óxido nítrico

Após a remoção do lavado peritoneal, as células recolhidas foram mantidas em cultura por 48h a 36°C com atmosfera de CO₂. Os sobrenadantes destas culturas foram coletados, colocados em placas de 24 poços mantidas em estufa de CO₂.

Após 48h de incubação a produção de nitrito foi avaliada, pela reação de Griess, para determinar a produção de NO (GREEN *et al.*, 1982). Para medir a produção de nitrito 100 μ L das amostras do sobrenadante foram incubados com 100 μ L do reagente de Griess em placas de 96 poços, em triplicata e foi realizada a leitura no leitor de ELISA com absorvância de 540nm. Os resultados, expressos em μ M, foram determinados após a extrapolação de valores obtidos a partir da curva

padrão, composta por diferentes concentrações de nitrito de sódio (NaNO_2). O reagente de Griess foi preparado no momento do uso, homogeneizando partes iguais da solução de sulfanilamida 1% em H_3PO_4 2,5% (MERCK®) e de naftilenodiamina 0,1% em água bidestilada.

4.4 Avaliação morfológica pulmonar por microscopia óptica

Após decorridos 120 dias da infecção crônica por *S. mansoni* - intervalo de tempo necessário para maior deposição de ovos nos pulmões (CROSBY et al., 2010) - e após 6 ou 24 horas da inoculação de LPS, os animais foram anestesiados e eutanasiados com Tribromoetanol (TBE) (250mg/Kg de peso corporal), injetado intraperitonealmente. Por meio de uma incisão no tórax foram retirados os pulmões e imediatamente fixados em formaldeído tamponado, em frascos identificados e armazenados por 48 horas para o procedimento histológico e posterior avaliação morfológica por microscopia óptica.

4.4.1 Procedimento histológico

No procedimento histológico os pulmões que passaram pela fixação durante 48h foram fragmentados em 3 cortes transversais, para serem desidratados, diafanizados e incluídos em blocos de parafina. Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo rotativo manual da marca *ZEISS-HYRAX M25*, em quatro secções semiseriadas (1:15) com 5 μm de espessura para cada corte. A coloração das lâminas foi feita por Hematoxilina e Eosina (HE). As técnicas aplicadas obedeceram às normas técnicas de rotina do Laboratório de Patologia da UNIFAL-MG. A análise foi feita por microscopia de luz (OLIMPUS CH30), observando seus aspectos quantitativos e qualitativos.

4.4.2 Quantificação dos parâmetros de celularidade

A quantificação da celularidade foi realizada por meio de contagem de pontos segundo a técnica convencional *point-counting* descrita por Weibel (1990). Nesta técnica utilizou-se uma ocular que contém o sistema de referência de 100 pontos e 50 linhas dispostas em paralelo (FIGURA 5), acoplada ao microscópio de luz.

Para a contagem utilizou-se o aumento de 100X, desconsiderando-se a primeira linha e a primeira coluna para a contagem. Foram contadas as células que estavam sobre os pontos do retículo. Os campos foram selecionados aleatoriamente.

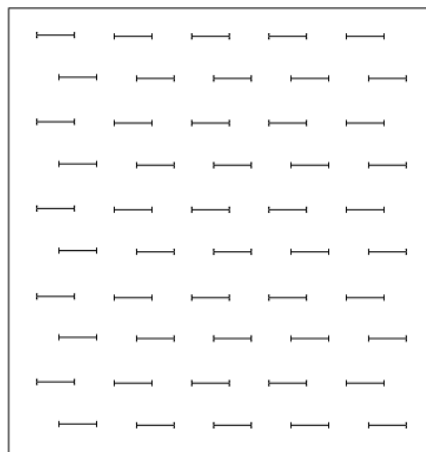


FIGURA 5 - Retículo com 100 pontos e 50 retas utilizado para quantificação dos parâmetros morfométricos e de celularidade.

FONTE: WEIBEL, 1990.

4.4.3 Análise da celularidade

No microscópio de luz, com uma objetiva de 100X foram quantificados no tecido pulmonar as células polimorfonucleares (PMNs – predominantemente neutrófilos) e mononucleares (MNs - macrófagos, linfócitos) do processo inflamatório. Foram analisados dez campos aleatórios para a quantificação das

células presentes no septo e espaço alveolar, desconsiderando-se as áreas ocupadas pelos granulomas.

4.4.4 Determinação do tamanho dos granulomas

Em microscópio de luz com câmera acoplada os dez primeiros granulomas pulmonares que contem o ovo de *S. mansoni* no centro foram selecionados e a medida de sua diagonal maior foi feita com objetiva de 20X. Utilizou-se para as medidas o programa Axion Vision. Para cada animal foram medidos 10 granulomas e obtida a média do grupo.

4.4.5 Análise microscópica

As lâminas foram analisadas e descritas em microscópio óptico com as objetivas de 10X, 20X e 40X, quanto a característica 1) dos alvéolos (preservados ou não); 2) do infiltrado inflamatório (discreto, moderado ou intenso) e tipos de células MN ou PMN; 3) dos vasos sanguíneos (dilatados ou não; hiperêmicos ou não) e 4) da presença de granulomas (predomínio de células).

4.6 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para comparação de duas médias, foi aplicado o teste “t” de Student. Para a comparação de três ou mais médias aplicou-se a análise de variância (One-way). Utilizou-se o programa Graphpad Prism 6 para a elaboração dos gráficos. O nível de significância foi estabelecido em 95% ($p < 0.05$).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UNIFAL-MG (n° 451/2012).

5 RESULTADOS

5.1 Quantificação da celularidade

A contagem das células PMN em 6 horas mostrou aumento significativo ($p < 0,001$) nos grupos LPS ($15,10 \pm 4,36$) e LPS/Schisto ($10,73 \pm 0,95$) quando comparado com o grupo Controle/Salina ($2,23 \pm 1,02$) (GRÁFICO 1A). O grupo LPS ($15,10 \pm 4,36$) quando comparado com os grupos LPS/Schisto e Schisto ($4,13 \pm 1,60$) mostrou aumento ($p < 0,001$) das células PMN (GRÁFICO 1A). No grupo LPS/Schisto ($10,73 \pm 0,95$) o número de células PMN aumentou ($p < 0,001$) quando comparado com o grupo Schisto ($4,13 \pm 1,60$) (GRÁFICO 1A). Em relação as células MN houve aumento significativo ($p < 0,001$) no grupo Schisto ($9,45 \pm 0,66$), quando comparado com o grupo Controle/Salina ($3,83 \pm 0,65$) (GRÁFICO 1A). O grupo Schisto ($9,45 \pm 0,66$) mostrou aumento no número de células ($p < 0,001$) das células MN quando comparado com o grupo LPS ($4,41 \pm 1,05$) (GRÁFICO 1A).

A contagem de células em 24 horas mostrou aumento significativo das células PMN nos grupos LPS ($5,28 \pm 1,89$; $p < 0,001$), Schisto ($4,13 \pm 1,60$; $p < 0,05$) e LPS/Schisto ($6,26 \pm 0,84$; $p < 0,001$) em comparação ao grupo Controle/Salina ($1,85 \pm 0,25$) (GRÁFICO 1B). O número de células PMN aumentou ($p < 0,05$) no grupo LPS/Schisto ($6,26 \pm 0,84$) quando comparado ao grupo Schisto ($4,13 \pm 1,60$) (GRÁFICO 1B). Em relação as células MN, em 24 horas, os grupos LPS ($11,28 \pm 0,84$), Schisto ($9,46 \pm 0,68$) e LPS/Schisto ($11,07 \pm 1,30$) mostrou aumento ($p < 0,001$) em relação ao grupo Controle/Salina ($5,11 \pm 0,53$) (GRÁFICO 1B).

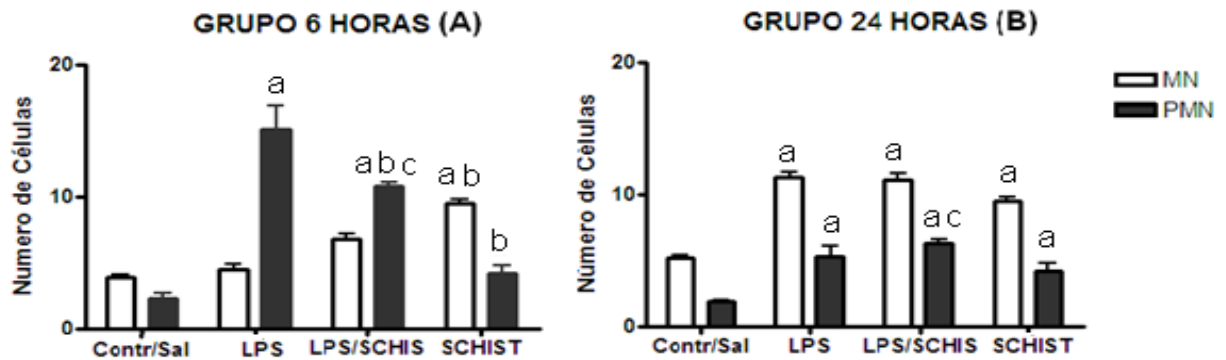


GRÁFICO 1 - Contagem do número de células nos grupos (n=6) em 6h (A) e 24h (B) eutanasiados após a inoculação de LPS e 120 dias após a infecção dos camundongos com cercárias de *S. mansoni*. Valores expressos como média \pm DP. ^a $p < 0,05$ comparado ao Controle/Salina, ^b $p < 0,05$ comparado ao LPS, ^c $p < 0,05$ comparado ao Schist.

FONTE: Do autor.

5.2 Dosagem de óxido nítrico

Quanto à dosagem de NO em 6h nos grupos LPS ($5,66 \pm 0,88$) e LPS/Schisto ($9,69 \pm 1,26$) houve um aumento significativo ($p < 0,001$) em relação ao grupo Controle/Salina ($1,57 \pm 0,95$) (GRÁFICO 2A). A dosagem de NO diminuiu no grupo Schisto ($2,07 \pm 0,83$; $p < 0,001$) e aumentou no grupo LPS/Schisto ($9,69 \pm 1,26$; $p < 0,001$) quando comparados ao grupo LPS ($5,66 \pm 0,88$) (GRÁFICO 2A). No grupo LPS/Schisto ($9,69 \pm 1,26$) a concentração de NO foi maior ($p < 0,001$) que no grupo Schisto ($2,07 \pm 0,83$) (GRÁFICO 2A).

Em 24h, a dosagem média de NO não alterou significativamente entre os grupos (GRÁFICO 2B). Quando comparados os grupos de 6h (GRÁFICO 2A) com os grupos de 24h (GRÁFICO 2B) nota-se a diminuição significativa tanto no grupo LPS 24h quanto no grupo LPS/Schisto 24h em relação a esses mesmos grupos em 6h.

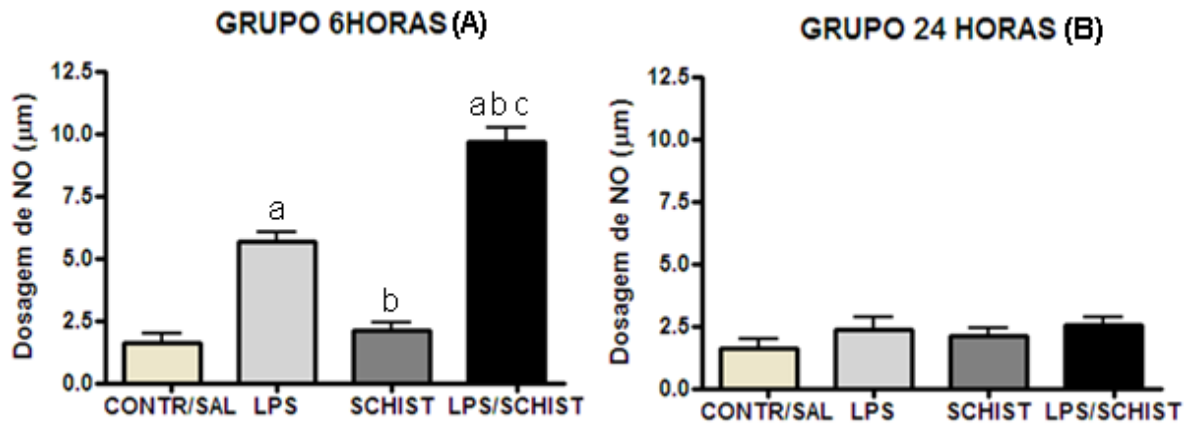


GRÁFICO 2 - Concentração de óxido nítrico (NO) nos grupos (n=6) em 6h (A) e em 24h (B) após a inoculação de LPS e 120 dias após a infecção dos camundongos com cercárias de *S. mansoni*. Valores expressos como média \pm DP. ^a $p < 0,05$ comparado ao Controle/Sal, ^b $p < 0,05$ comparado ao LPS, ^c $p < 0,05$ comparado ao Schisto.

FONTE: Do autor.

5.3 Aspectos microscópicos pulmonares

A partir da análise morfológica pulmonar por microscopia óptica obtivemos os seguintes resultados:

5.3.1 Microscopia do grupo Controle/Salina

Os pulmões dos animais do grupo Controle que foram submetidos a injeção intraperitoneal contendo Salina a 0,9% (1mL/Kg) apresentaram discreto e difuso infiltrado inflamatório de células MN no tecido pulmonar, vasos sanguíneos hiperêmicos e alvéolos preservados com aspecto de normalidade. Estas características foram observadas tanto em 6h (FIGURA 6A) quanto em 24h (FIGURA 7A).

5.3.2 Microscopia do grupo *Schistosoma mansoni*

Os animais com 120 dias de infecção com *S. mansoni* apresentaram em seus pulmões intenso e difuso infiltrado inflamatório, predominando macrófagos, vasos sanguíneos dilatados, granulomas com predomínio de macrófagos e células epitelióides. Focos discretos de células PMN, poucas células gigantes multinucleadas e presença de alvéolos com alterações morfológicas (FIGURA 6D e 7D).

5.3.3 Microscopia dos grupos LPS e LPS/Schisto após 6 horas a inoculação de LPS

No grupo inoculado com LPS (1ml/kg) observamos após 6h infiltrado inflamatório de moderado a intenso e difuso, com predomínio de neutrófilos, no parênquima pulmonar; poucos vasos sanguíneos dilatados e hiperêmicos e alvéolos com alterações morfológicas (FIGURA 6B).

No grupo LPS/Schisto após 6 h foi observado no parênquima pulmonar, alvéolos com alterações morfológicas, diversos granulomas com predomínio de macrófagos, intenso infiltrado inflamatório de PMN e discreta vascularização (FIGURA 6C).

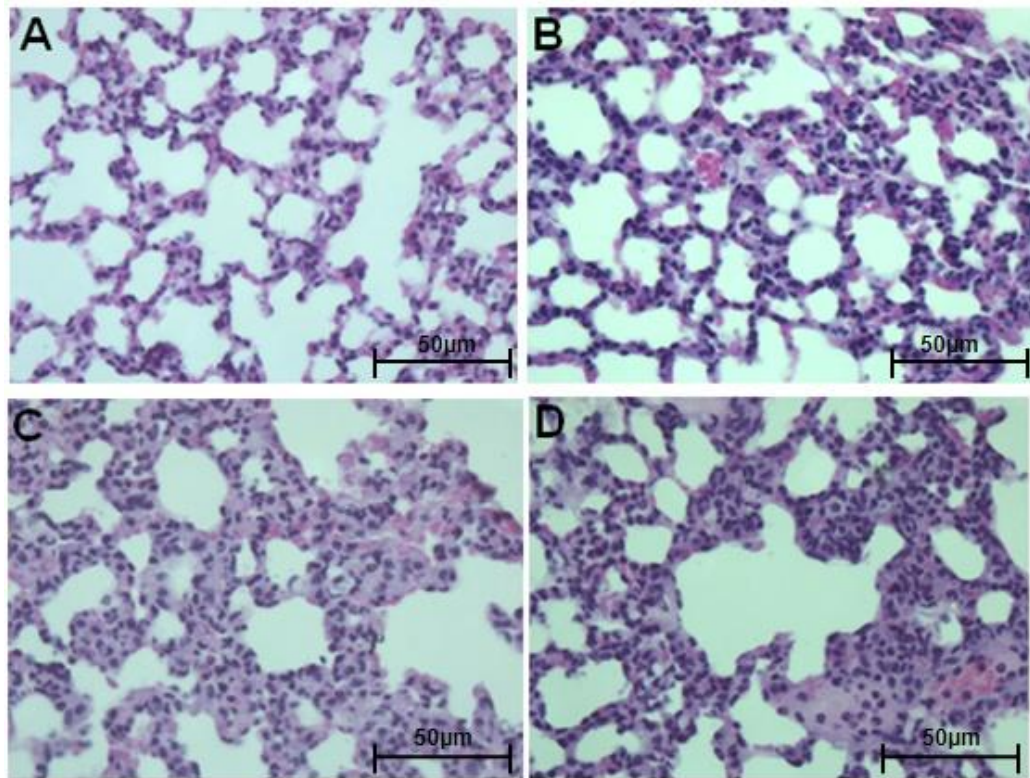


FIGURA 6 - Aspectos histopatológicos nos grupos após 6 horas a inoculação de LPS e 120 a infecção por cercárias de *S. mansoni*. Aumento de 400X.

A-Controle/Salina;

B- LPS;

C- LPS/Schisto;

D- Schisto.

FONTE: Do autor.

5.3.4 Microscopia dos grupos LPS e LPS/Schisto após 24 horas a inoculação de LPS

No grupo LPS, analisados após 24 h, foi observado no parênquima pulmonar alteração morfológica dos alvéolos, infiltrado inflamatório de moderado a intenso e difuso pelo parênquima pulmonar com predomínio de células MN e vasos sanguíneos dilatados e hiperêmicos (FIGURA 7B).

No grupo LPS/Schisto foram observados diversos granulomas com predomínio de macrófagos em torno destes, alterações morfológicas dos alvéolos, infiltrado inflamatório intenso e difuso composto por neutrófilos, macrófagos e linfócitos (FIGURA 7C).

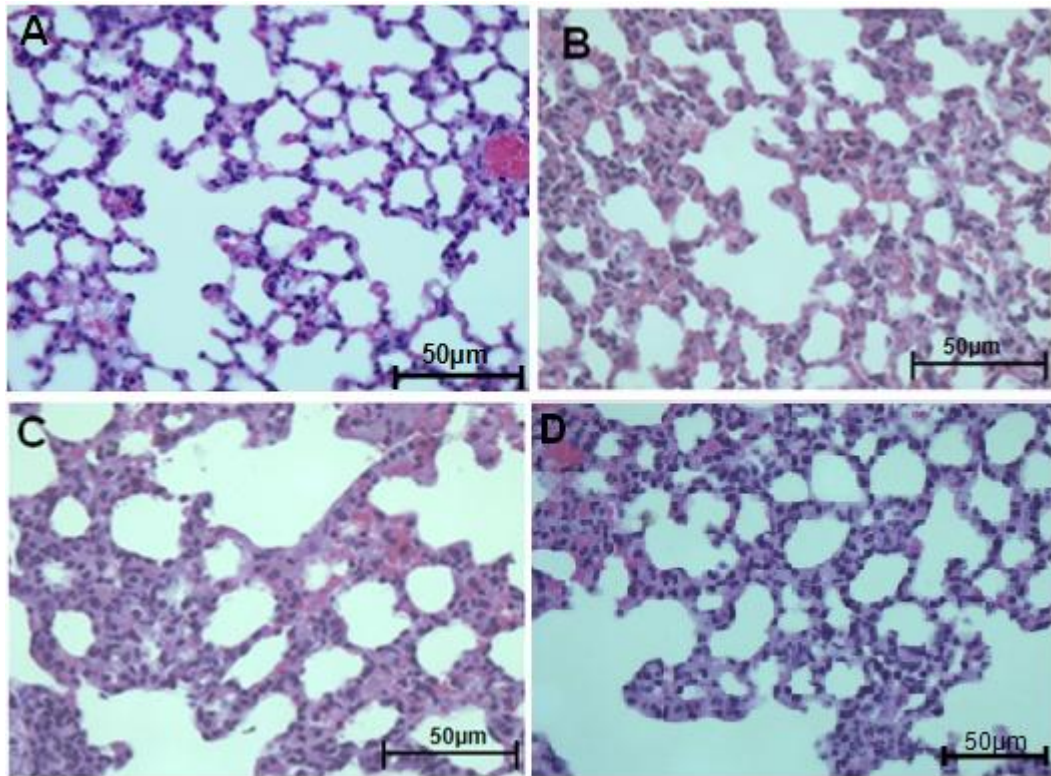


FIGURA 7 - Aspectos histopatológicos nos grupos após 24 horas a inoculação de LPS e 120 a infecção por cercárias de *S. mansoni*. Aumento de 400X.
 A- Controle/Salina;
 B- LPS;
 C- LPS/Schisto;
 D- Schisto.

FONTE: Do autor.

5.4 Dimensão dos granulomas pulmonares

Na mensuração da diagonal maior dos granulomas pulmonares após 120 dias da infecção dos camundongos com cercárias de *S. mansoni* obteve-se as seguintes médias: grupo Schisto ($363,10\mu\text{m} \pm 18,38$), grupo LPS/Schisto 6h ($349,60\mu\text{m} \pm 31,53$) e grupo LPS/Schisto 24h ($342,30\mu\text{m} \pm 55,84$). A partir da análise estatística não foi observada alteração significativa entre os grupos (GRÁFICO 3).

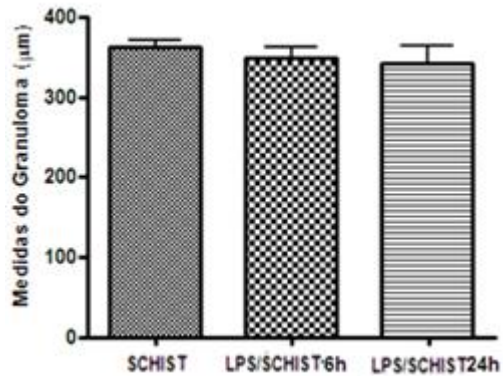


GRÁFICO 3 - Média da medida da diagonal maior dos granulomas pulmonares com ovos no centro 120 dias após a infecção dos camundongos com cercárias de *S. mansoni*. Valores expressos como média \pm DP.

FONTE: Do autor.

5.4.1 Aspectos microscópicos dos granulomas

Foram medidos e analisados os granulomas pulmonares após 120 dias da infecção com cercárias de *S. mansoni* dos grupos Schisto (FIGURA 8A), LPS/Schisto após 6h (FIGURA 8B) e LPS/Schisto após 24h (FIGURA 8C). A análise dos granulomas foram estabelecidas apenas naqueles que continham ovos no centro. Observou-se intenso infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, com células gigantes multinucleadas, halo linfocitário e poucos eosinófilos e início de fibrose em alguns granulomas. As características dos granulomas não mostraram diferenças histopatológicas marcantes entre os grupos.

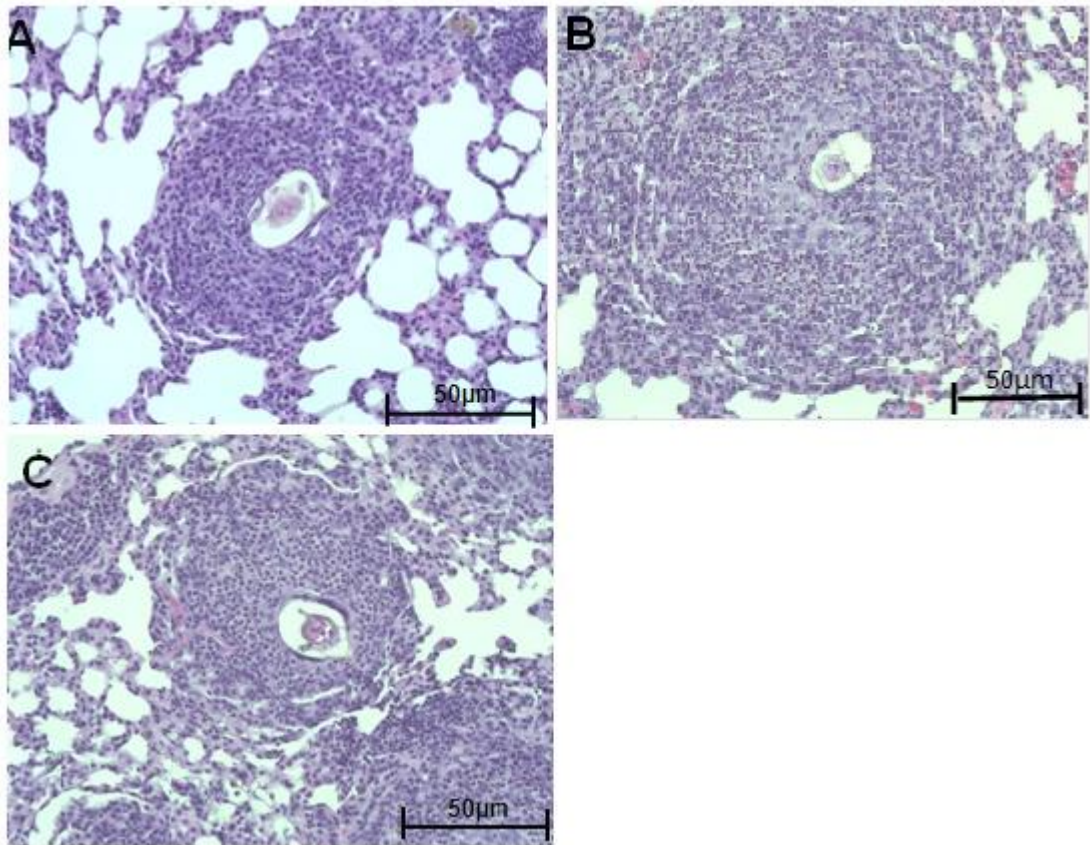


FIGURA 8 - Aspectos histopatológicos dos granulomas pulmonares após 120 a infecção por 25 cercárias de *S. mansoni*, observamos intenso infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos, células gigantes multinucleadas e poucos eosinófilos. Aumento de 200X

A-Schisto;

B- LPS/Schisto 6h;

C- LPS/Schisto 24h.

FONTE: Do autor.

6 DISCUSSÃO

Nosso estudo objetivou analisar o processo inflamatório pulmonar em murinos desencadeado pela presença dos ovos de *S. mansoni* e pela inoculação intraperitoneal do LPS. Adotamos como parâmetros a celularidade do infiltrado inflamatório pulmonar; a concentração de óxido nítrico do lavado intraperitoneal; as características morfológicas pulmonares e o diâmetro dos granulomas pulmonares na fase crônica da infecção experimental por *S. mansoni*, partindo-se da hipótese de que o sistema inflamatório ativado por uma infecção crônica seria mais efetivo para debelar uma infecção aguda secundária. Em seu estudo, Onguru et al. (2011) sugeriram que os antígenos do *Schistosoma* estão envolvidos em mecanismos capazes de controlar a inflamação causada por antígenos microbianos, presentes em uma infecção bacteriana, sustentando nossa hipótese, bem como Casey; Balk; Bone (1993) que estudaram esquistossomose e endotoxemia bacteriana em humanos, e notaram que os níveis sanguíneos da endotoxina foram 10 vezes superiores ao limite que os levariam ao choque séptico, concluindo que os antígenos de *S. mansoni* podem suprimir a resposta do hospedeiro frente à exposição de doses elevadas de LPS, evitando-se o choque séptico.

Em nosso trabalho, após 120 dias da indução da esquistossomose por cercárias em modelo murino, obteve-se o modelo experimental semelhante à fase crônica da esquistossomose em humanos, razão pela qual adotou-se este período de indução, também presente em Crosby et al. (2010) e Fairfax et al. (2012). Para confirmar a esquistossomose foi observada a deposição de ovos no parênquima pulmonar, notando-se também a consequente reação granulomatosa que foi analisada. Alguns estudos afirmam que a implantação dos ovos nos pulmões deve-se primeiramente a sua translocação da luz do intestino para os vasos sanguíneos e destes para fígado. Como resultado ocorre fibrose hepatoesplênica, característica da fase crônica da doença e consequente hipertensão portal e destruição progressiva do sistema venoso o que acarreta a embolização dos ovos e sua chegada aos pulmões (ALI MOHAMED-Q et al., 1999; CROSBY et al., 2010; FAIRFAX et al., 2012).

Na quantificação da celularidade do infiltrado inflamatório pulmonar evidenciou-se um aumento do número de células MN, predominantemente

macrófagos, nos grupos Schisto, LPS/Schisto e LPS, após 6h e 24 horas da inoculação com LPS, quando comparados com grupo Controle/Salina.

No grupo Schisto houve aumento significativo de células MN em relação ao grupo Controle/Salina, concordando com Crosby et al. (2010) que utilizaram imunomarcadores a fim evidenciar a infiltração periovular nos pulmões na fase crônica da infecção e encontraram grande número de macrófagos e linfócitos. O aumento do número destas células está relacionado ao desenvolvimento da resposta imune Th2 estimulada pelos antígenos liberados dos ovos de *S. mansoni* (TURNER et al., 2011; FAIRFAX et al., 2012).

Também no grupo LPS/Schisto (6 horas) foi observado o aumento de células MN quando comparado ao grupo Controle/Salina. Segundo Vella; Pearce (1992) e Crosby et al. (2010), o aumento de MNs pode estar relacionado com o desenvolvimento dos granulomas pulmonares induzidos por ovos de *S. mansoni* no hospedeiro, pois eles induzem inicialmente a resposta imune tipo Th0, que evolui para a Th2, direcionada principalmente por macrófagos alternativamente ativados, linfócitos T e eosinófilos. A presença das células MNs está intimamente ligada a resposta Th2 que está relacionada com o desenvolvimento da doença crônica. As citocinas Th2, IL-4 e IL-13, tendem a ampliar esta resposta granulomatosa, enquanto que IL-10, IL-13 R α 2, IFN- γ e células Treg atuam de forma limitante sobre a inflamação (FALLON et al., 2000; HESSEM et al., 2004; MENTINK-KANE et al., 2004; WILSON et al., 2007; HAMS; AVIELLO; FALLON 2013). A dosagem da expressão destas citocinas nos animais infectados com *S. mansoni* e estimulados com LPS serão desenvolvidos como continuação do presente trabalho em estudo futuro.

Na contagem de células MN após 24 horas, nossos resultados mostraram aumento destas células nos grupos Schisto, LPS e LPS/Schisto quando comparados ao grupo Controle/Salina. O aumento do número de MN nos animais com esquistossomose sinaliza que houve, nestes modelos, sensibilização da resposta inflamatória, confirmada com um aumento maior no grupo LPS/Schisto em relação do grupo Schisto, porém não significativo. O que está de acordo com os achados de Crosby et al. (2010) e Chia-Hung et al. (2013), pois evidenciaram em seus estudos o aumento principalmente de macrófagos tanto na fase crônica da esquistossomose pulmonar (CROSBY et al., 2010) e o aumento do infiltrado inflamatório pulmonar de MN 24 horas após a estimulação com LPS (CHIA-HUNG et al., 2013).

Na quantificação da celularidade de PMN notou-se um aumento do número destas células nos grupos LPS/Schisto e LPS, após 6h da inoculação com LPS, quando comparados com os grupos Controle/Salina e Schisto. Em 24h esse aumento foi maior nos grupos com LPS em relação ao grupo Controle/Salina; porém no grupo LPS o aumento foi menor do que no grupo LPS/Schisto. Para Oliveira et al. (2011), um dos fatores marcantes da inflamação é a transmigração de leucócitos, evidenciado em nosso trabalho pelo aumento de células PMNs, principalmente no intervalo de 6h, assim como demonstrado nos trabalho de Hui-Jie et al. (2012).

De acordo com Hui-Jie et al. (2012) a diminuição do número de células PMNs, com o avanço do tempo na inoculação de LPS, está relacionada com o aumento de MNs, ao utilizarem marcadores de apoptose para as células PMNs e demonstrarem que as células em apoptose eram reconhecidas e fagocitadas por macrófagos.

A administração intraperitoneal de LPS estimulou o recrutamento de células PMNs, após 6h, nos grupos LPS e LPS/Schisto quando comparados ao grupo Controle/Salina e ao grupo Schisto, concordando com Hui-Jie et al. (2012), que evidenciaram o aumento de células PMNs após 6 horas da inoculação de LPS, em um estudo *in vitro*, e consideram que a migração inicial de células PMNs em direção ao tecido lesado é um fator primordial nas primeiras fases da defesa do organismo, pois estas células são as primeiras a migrarem para o local de infecção (FUJISHIMA; AIKAWA, 1995; MECKLENBURGH et al., 1999; HUI-JIE et al., 2012). Porém, como alertado por Fujishima; Aikawa, 1995, esse recrutamento de células PMNs, apesar de muito importante, pode contribuir para o desenvolvimento da SRIS. Em nossos resultados houve uma diminuição de células PMNs no grupo LPS/Schisto em relação ao grupo LPS, sugerindo um melhor funcionamento dos pulmões devido ao menor comprometimento do parênquima, causando menor liberação de radicais livres pelos leucócitos.

A infiltração de leucócitos está associada, nos pulmões, à inflamação na fase aguda e os macrófagos secretam citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, principalmente o NO, colaborando com o desenvolvimento de doenças pulmonares (LASKI; PENDINO, 1995). Mas, primordialmente são células associadas à defesa do hospedeiro, à remodelação do tecido e ao reparo (CHIA-HUNG et al., 2013). No presente trabalho, sugere-se que a diminuição do número de leucócitos no parênquima pulmonar no grupo LPS/Schisto, após 24h, colaborou com a melhor

resolução da inflamação, concordando com os achados de Casey; Balk; Bone (1993).

Analisamos a dosagem de óxido nítrico (NO) por ser um radical livre que atua como mediador da inflamação e ativa o sistema imunitário, de acordo com Jorens; Vermeire; Herman (1993), Appleton; Tolinson; Willoughby (1996) e Oliveira et al. (1999). Além disso, nos pulmões, de acordo com Asano et al. (1994) e Barbosa et al. (2013), inúmeras células sintetizam e liberam NO, incluindo PMNs, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais e as células do músculo liso vascular e em nosso trabalho ocorreu intensa presença destas células, tornando importante essa dosagem.

A dosagem de NO nos grupos experimentais de nosso trabalho não demonstrou no grupo Schisto alteração em relação ao grupo Controle/Salina, o que está de acordo com Oliveira et al. (2011), ao concluíram que a presença das citocinas oriundas da esquistossomose aumentou a permeabilidade vascular e a interação entre leucócitos-células endoteliais, enquanto reduziu a expressão de eNOS, sugerindo que as moléculas provindas do parasita interagem com as citocinas do hospedeiro, culminando em uma rede complexa de eventos moleculares, não dependente de um único mediador (OLIVEIRA et al., 2011).

No grupo LPS, 6h, a dosagem de NO aumentou significativamente em relação ao Controle/Salina, evento esperado, considerando-se, segundo Andrade; Ritter; Dall-Pizzol (2009), que o LPS induz a produção de espécies reativas de oxigênio; em consequência pode culminar na morte das células endoteliais, e levar à perda da homeostasia e falência múltipla de órgãos, de acordo com Larche et al (2006) e Lee; Slutsky (2010). Paralelamente ao aumento na dosagem de NO, tem-se o aumento do número de células PMNs, considerando-se que estas células expressam iNOS quando induzidas por LPS, o que resulta na produção aumentada de NO, mantendo a vasodilatação e a resistência a vasoconstritores e acarretando alterações no sistema vascular, tecidos e mais grave, disfunção múltipla de órgãos (MECKLENBURGH et al., 1999; LEE; DOWNEY, 2001; CHOPRA; REUBEN; SHARMA, 2009; HUI-JIE et al., 2012).

No grupo LPS/Schisto, 6h, houve aumento na concentração de NO e este aumento está associado a inoculação do LPS, como notado no grupo LPS, sendo este um potente ativador da expressão de iNOS nos macrófagos ativados e em PMNs (FRACASSO, 2008).

A dosagem de NO realizada após 24h da inoculação de LPS não mostrou diferença significativa entre os grupos. Porém, quando comparamos os grupos 6h e 24h notamos significativa diminuição na concentração de NO em 24h. Oliveira et al. (1999) afirmaram que a produção de NO é influenciada pela estimulação antigênica da reação granulomatosa *in vitro*; estando de acordo com nossos resultados, pois os níveis de NO foram mais baixos na associação de LPS/Schisto, 24h, comparado ao grupo LPS/Schisto 6h. O aumento na produção de NO está relacionado com a destruição de agressores e também com o aumento da vasodilatação, provocando queda na pressão sanguínea e o colapso vascular, características do choque séptico (QUEIROZ; BATISTA, 1999). Nossos resultados suportam que a infecção por *S. mansoni* associada à inoculação de LPS influenciou na diminuição da liberação de espécies reativas de oxigênio em 24h, certamente colaborando para uma menor destruição do tecido pulmonar.

A análise morfológica microscópica dos pulmões, no grupo Controle/Salina, tanto após 6h quanto após 24h, mostrou alvéolos preservados e discreto infiltrado inflamatório de MN. No grupo Schisto houve presença substancial de granulomas e moderado infiltrado inflamatório predominantemente MN no parênquima pulmonar. No grupo LPS notou-se intenso infiltrado inflamatório predominando MN após 24h e PMN após 6h e alvéolos com morfologia alterada. Nos grupos LPS/Schisto observa-se a presença de inúmeros granulomas, vasos sanguíneos dilatados e moderado a intenso infiltrado inflamatório PMN após 6h e MN, após 24h. Assim, a avaliação microscópica mostrou lesão pulmonar em todos os grupos com pequena variação intergrupos e também entre os períodos, sendo maior após 24h, e nos grupos com inoculação de LPS. Esses resultados corroboram Ware; Matthay (2000); Wang et al. (2007) que afirmam edema, neovascularização e o acúmulo de leucócitos levam a lesão pulmonar aguda.

As reações granulomatosas que circundam os ovos do parasita representam a principal alteração associada a esquistossomose independentemente do órgão que acometem. A intensidade e a quantidade destas reações estão relacionadas com a morbidade do hospedeiro de acordo com Wynn; Cheever (1995); Stadecker; Hernandez (1998); e Abath et al. (2006). O modelo experimental da resposta granulomatosa no pulmão muitas vezes não é letal para o hospedeiro, dessa maneira permite o acompanhamento, a longo prazo, da inflamação, como citou Wen

et al. (2006) e Fairfax et al. (2012) contribuindo para a escolha metodológica de nosso estudo.

A avaliação histopatológica dos granulomas em nosso trabalho evidenciou a presença predominante de macrófagos, células gigantes multinucleadas, linfócitos em um parênquima alveolar desorganizado, diferindo levemente dos componentes citados por Pesce et al. (2009): macrófagos, linfócitos, eosinófilos, fibroblastos, componentes residuais de vasos sanguíneos, além de resquícios do parênquima pulmonar. Além dos componentes citados, os granulomas no presente estudo estavam dispostos de forma difusa, favorecendo à diminuição substancial do espaço morfofuncional pulmonar.

A medida do maior diâmetro dos granulomas no presente trabalho não mostrou diferença significativa entre os grupos Schisto, LPS/Schisto, após 6h e LPS/Schisto, após 24h. Nossos resultados demonstraram que a indução da inflamação aguda no pulmão não modificou a estrutura, nem o tamanho da reação granulomatosa existente. Acredita-se que o estudo da expressão de citocinas no tecido poderá responder se realmente não houve modificação da resposta granulomatosa após o estímulo com LPS, visto que Rezende et al. (2011) pesquisaram o efeito da vacinação, a partir proteína (rP22), na patologia causada por *S. mansoni*, e mostraram na avaliação histopatológica a redução do tamanho e da fibrose nos granulomas, associada a altos níveis de IL-10 no tecido. Em contrapartida, Fairfax et al. (2012) observaram em seus resultados que camundongos com a produção de IL-10 bloqueada apresentaram inflamação difusa no tecido pulmonar, maior deposição de ovos nos pulmões, áreas com hemorragia, sugerindo hipertensão pulmonar. Investigações futuras sobre a ação das interleucinas na associação da infecção com *S. mansoni* e inoculação de LPS são necessárias e são propostas para a continuação deste trabalho.

Visto a importância da esquistossomose, nossos resultados demonstram a importância de estudos que busquem interpretar as interações que a doença estabelece associada a outras infecções, principalmente visando o desenvolvimento de novos fármacos e/ou vacinas.

7 CONCLUSÃO

A celularidade do infiltrado inflamatório pulmonar inferimos que nos animais com esquistossomose crônica e LPS aumentou a intensidade do processo inflamatório em relação ao grupo Controle/Salina.

A concentração de óxido nítrico do lavado intraperitoneal inferimos que nos animais com esquistossomose crônica e LPS não houve alteração em relação ao grupo Controle/Salina após 24 horas, sugerindo menor destruição do parênquima pulmonar.

Na avaliação, por microscopia óptica, inferimos que nos animais com esquistossomose crônica e LPS as características morfológicas pulmonares foram alteradas, indicando lesão no órgão em relação ao grupo Controle/Salina.

Na mensuração do diâmetro dos granulomas pulmonares inferimos que nos animais com esquistossomose crônica e LPS não houve alteração de tamanho em relação ao grupo Schisto, indicando que a inoculação do LPS não modificou o processo inflamatório crônico.

Assim, a análise do processo inflamatório pulmonar em murinos infectados com *Schistosoma mansoni* e estimulados com LPS, permite concluir que o LPS em animais com esquistossomose mudou o perfil de células nas primeiras 6 horas.

REFERÊNCIAS

ABATH, F. G. et al. Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? *Trends Parasitol*, v. 22, p. 85–91, 2006.

AIRD, W. C. “Endothelium in health and disease”. *Pharmacological Reports*, v. 60, n. 1, p. 139–143, 2008.

ALI, MOHAMED-Q, et al. Susceptibility to periportal (Symmers) fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infections: evidence that intensity and duration of infection, gender, and inherited factors are critical in disease progression. *J Infect Dis.*, v. 180, p.1298-1306, 1999.

ALPERT, J. S.; IRWIN, R. S.; DALEN, J. E. The Pulmonary hipertension. *Curr Probl Cardio.l.*, v. 5, p. 1-39, 1981.

AMARAL, A.; OPAL, S. M.; VINCENT, J. L. Coagulation in sepsis. *Intensive Care Med.*, v. 30, p. 1032–1040, 2004.

AMARAL, R. S. et al. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 101, s.1, p. 79-85, 2006.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. Pathogenesis of schistosomal pulmonary arteritis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 10, p. 305-310, 1970.

ANDRADE, Z. A.; BINA, J. C. The changing pattern of pathology due to *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 80, p. 363-366, 1985.

ANDRADE, Z. A.; PRATA, A. Asynptomatic schistosomiasis studied by needle biopsy of the liver. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 5, p. 236-242, 1963.

ANDRADES, M. E.; RITTER, C.; DAL-PIZZOL, F. The role of free radicals in sepsis development. *Front. Biosci.*, v. 1, p. 277–287, 2009.

AOKI, K. A study of endotoxemia in ulcerative colitis and Crohn’s disease. II. Experimental study . *Acta Med Okayama*, v. 32, p. 207–216, 1978.

APPLETON, I.; TOMLINSON, A.; WILLOUGHBY, D. A. Induction of cyclo-oxygenase and nitric oxide synthase in inflammation. *Advances in Pharmacology*, v. 35, p. 27-78, 1996.

ARAÚJO, F. G. et al. Schistosoma mansoni: impairment of the cell mediated immune response in mice. *Clin Exp Immunol.*, v. 28, p. 289-291, 1977.

ASANO, K. et al. Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 91, p. 10089–10093, 1994.

AZEVEDO, L. C. P. et al. Characterization of an animal model of severe sepsis associated with respiratory dysfunction. *Clinics*, v. 62, p. 491-498, 2007.

BANNERMAN, D. D.; GOLDBLUM, S. E. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide - induced endothelial apoptosis. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, v. 284, p. 899–914, 2003.

BARBOSA, K. P. et al. Reduction of carrageenan induced acute pulmonary inflammation in mice by novel thiazolidinedione derivative LPSF/RA-4. *Eur J Pharmacol.*, v. 12, p. 33, 2013.

BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J. Clin. Invest.*, v. 118, p. 413–420, 2008.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, v. 101, p. 1644-1655, 1992.

BROOKER, S.; CLEMENTS, A. C. A.; BUNDY, D. A. P. Global epidemiology, ecology and control of soil - transmitted helminth infections. *Adv Parasitol*, v. 62, p. 221–261, 2004.

BRUNET L. R. et al. IL- 4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. *Journal Immunology*, v. 159, p. 777–785, 1997.

CALDAS, I. R. et al. Human Schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. *Acta Trop*, v. 108, p. 109–117, 2008.

- CASEY, L. C.; BALK, R. A.; BONE, R. C. Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med.*, v. 119, p. 771-778, 1993.
- CASTRO, E. O.; BORTOLOTTI, M. R. F. L.; ZUGAIB, M. Sepsis e choque séptico na gestação: manejo clínico. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.*, v. 30, p. 631-638, 2008.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). Division of Parasitic Diseases (DPDx). *Schistosoma mansoni*, ATLANTA, USA, 2003. Disponível em: <http://www.cdc.gov_search>. Acessado em: 29 Oct. 2013.
- CHABY, R. Strategies for the control of LPS-mediated pathophysiological disorders. *Discv Drugs Today.*, v. 4, p. 209-221, 1999.
- CHEN, L. et al. Altered regulation of inducible nitric oxide synthase expression in macrophages from senescent mice. *Infection and Immunity*, v. 64, p. 4288-4298, 1996.
- CHIA-HUNG, L. et al. Immunomodulatory effect of chinese herbal medicine formula Sheng-Fei-Yu-Chuan-Tang in lipopolysaccharide-induced acute lung injury mice. *Hindawi Publishing Corporation Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 13, p. 12, 2013.
- CHIRAKALWASAN, N. et al. Treating a case of severe pulmonary hypertension due to Schistosomiasis. *Chest*, v. 130, p. 293-294, 2006.
- CHOPRA, M.; REUBEN, J. S.; SHARMA, A. C. Acute lung injury: apoptosis and signaling mechanisms. *Exp Biol Med.*, v. 234, p. 361-371, 2009.
- COSTELLO, E. K. et al. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*, v. 326, p. 1694-1697, 2009.
- CROSBY, A.; GRAHAM, B. B. Experimental models of pulmonary vascular disease in schistosomiasis. *UK. PVRI Review*, v. 1, p. 44-46, 2009.
- CROSBY A. et al. Pulmonary vascular remodeling correlates with lung eggs and cytokines in murine Schistosomiasis. *Am J Respir Crit Care Med.*, v. 181, p. 279-288, 2010.

DAVIES, M. G.; HAGEN P. Systemic inflammatory response syndrome. *BR Journal Surg.*, v. 84, p. 920-935, 1997.

DEMO, P. Complexidade e Aprendizagem: a dinâmica não linear do conhecimento. *Atlas*, São Paulo, 2002.

DUARTE, S. et al. Apigenin protects endothelial cells from lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation by decreasing caspase-3 activation and modulating mitochondrial function. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 14, p. 17664-17679, 2013.

ELIAS, D. et al. Low dose chronic *Schistosoma mansoni* infection increases susceptibility to *Mycobacterium bovis* BCG infection in mice. *Clin Exp Immunol.*, v. 139, p. 398-404, 2005.

ESTERRE, P. et al. Serum concentrations of sICAM-1, SP- and sL - selectins in patients with *Schistosoma mansoni* infection and association with disease severity. *Parasite Immunol.*, v. 20, p. 369–376, 1998.

EVERTS, B., et al. Functional impairment of human myeloid dendritic cells during *Schistosoma haematobium* infection. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 4, p. e667, 2010.

FALLON, P. G. et al. Schistosome infection of transgenic mice defines distinct and contrasting pathogenic roles for IL-4 and IL-13: IL-13 is a profibrotic agent. *J Immunol*, v. 164, p. 2585–2591, 2000.

FAIRFAX, K. C. et al. IL-10R blockade during chronic *Schistosomiasis mansoni* results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. *PLoS Pathog.* v. 1, p. 8, 2012.

FATTORI, E. et al. Defective inflammatory response in interleukin 6-deficient mice. *J Exp Med.*, v. 180, p. 1243-1250, 1994.

FERRAZ, A. A. B. et al. Gut bacterial translocation and postoperative infections: a prospective study in schistosomotic patients. *Surg Infect.*, v. 6, p. 197-201, 2005.

FRACASSO, J. F. Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. *Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.*, v. 29, p. 119-127, 2008.

FREUDENBERG, M. A. et al. Role of lipopolysaccharide susceptibility in the innate immune response to *Salmonella typhimurium* infection: LPS, a primary target for recognition of Gram-negative bacteria. *Microbes Infect.*, v. 3, p. 1213-1222, 2001.

FUJISHIMA, S.; AIKAWA, N. Neutrophil-mediated tissue injury and its modulation. *Intensive Care Med.*, v. 21, p. 277-85, 1995.

GALEEV, Y. et al. Bacterial scintigraphy at experimental intestinal obstruction. *J. Nucl. Med.*, v. 50, p. 1318, 2009.

GREEN, L. C. et al. Analyses of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.*, v. 126, p. 131-138, 1982.

GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cellular signaling*, v. 13, p. 85-94, 2001.

HACK, C. E. et al. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Critical Care Medicine*, v. 29, n. 7, p. 21-27, 2001.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The Schistosoma granuloma: friend or foe? *Front Immunology*, v. 4, p. 89, 2013.

HERBERT, D. R. et al. Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and down modulates T helper 1 responses and immunopathology. *Immunity*, v. 20, p. 623-635, 2004.

HERNANDEZ, H. J. et al. Differential antigen recognition by T cell populations from strains of mice developing polar forms of granulomatous inflammation in response to eggs of *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Immunol.*, v. 27, p. 666-670, 1997.

HESSEM, P. et al. The pathogenesis of schistosomiasis is controlled by cooperating IL-10-producing innate effector and regulatory T cells. *Journal Immunol*, v. 172, p. 3157-3166, 2004.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N. Engl. J. Med.*, v. 348, p. 138-150, 2003.

HUI-JIE M. A. et al. Sulfur dioxide attenuates LPS-induced acute lung injury via enhancing polymorphonuclear neutrophil apoptosis. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 33, p. 983-990, 2012.

JENKINS, S. J. et al. Schistosome larvae stimulate macrophage cytokine production through TLR4 dependent and -independent pathways. *Int. Immunol.*, v. 17, p. 1409-1418, 2005.

JORENS, P. G.; VERMEIRE, P. A.; HERMAN A. G. L-Arginine-dependent nitric oxide synthase: a new metabolic pathway in the lung and airways. *European Respiratory Journal*, v. 6, p. 258-266, 1993.

KANE, C. M. et al. Helminth antigens modulate TLR initiated dendritic cell activation. *Journal Immunol.*, v. 173, p. 7454-7461, 2004.

KARANJA, D. M. et al. Resistance to reinfection with *Schistosoma mansoni* in occupationally exposed adults and effect of HIV-1 co-infection on susceptibility to schistosomiasis: a longitudinal study. *Lancet*, v. 360, p. 592-596, 2002.

KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Cienc. Cult.*, v. 55, p. 38-43, 2003.

KUBES, P. et al. Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells. *FASEB Journal*, v.13, p. 1293-1299, 1993.

KUROSE, I. et al. Inhibition of nitric oxide production. Mechanisms of vascular albumin leakage. *Circ. Res.*, v. 73, p.164–171, 1993.

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

LANDRY, D. W.; OLIVER, J. A. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med.*, v.345, p. 588-595, 2001.

LARCHE, J. et al. Inhibition of mitochondrial permeability transition prevents sepsis-induced myocardial dysfunction and mortality. *J. Am. College Cardiol.*, v. 48, p. 377-385, 2006.

LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury, *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 35, p. 655-677, 1995.

LEE, W. L.; DOWNEY, G. P. Neutrophil activation and acute lung injury. *Curr Opin Crit Care*, v. 7, p. 1-7, 2001.

- LEE, W. L.; SLUTSKY, A. S. SEPSIS and endothelial permeability. *N. Engl. J. Med.*, v. 363, p. 689-691, 2010.
- LENZI, H. L.; LENZI, J. A.; SOBRAL, A. C. Eosinophils favor the passage of eggs to the intestinal lumen in schistosomiasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.20, p. 433-435, 1987.
- LENZI, H. L. et al. Extracellular matrix in parasitic and infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, supl. III: p. 77-90, 1991.
- LIMA, K. M. et al. Factors influencing the bacterial translocation in mice with chronic schistosomiasis. *Acta Gastroenterol Latinoam*, v. 42, p. 309-320, 2012.
- LYNN, W. A.; GOLENBOCK, D. Lipopolysaccharide antagonists. *Immunol. Today*, v. 13, p. 271-276, 1992.
- MACMICKING, J.; XIE, Q-W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, v. 15, p. 323-350, 1997.
- MAGALHÃES, L. A. Técnica para a avaliação da viabilidade de penetração de cercarias de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. *Hospital*, Rio de Janeiro, v. 75, p. 137-140, 1969.
- MARSHALL, J. C.; CREERY, D. Pre- clinical models of sepsis. *Sepsis*, v. 2, p. 187-197, 1998.
- MARSHALL, F. A.; PEARCE, E. J. Uncoupling of induced protein processing from maturation in dendritic cells exposed to a highly antigenic preparation from a helminth parasite . *Journal Immunol*, v.181, p. 7562-7570, 2008.
- MARTIN G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N. Engl. J. Med.*, v. 348, p. 1546-1554, 2003.
- MATSUDA, N.; HATTORI, Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *Journal of Smooth Muscle Research*, v. 43, p. 117-137, 2007.
- MCDONNELL, M. et al. Systemic toll-like receptor ligands modify B-cell responses in human inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.*, v. 17, p. 298-307, 2011.

MECKLENBURGH, K. et al. Role of neutrophil apoptosis in the resolution of pulmonary inflammation. *Monaldi Arch Chest Dis.*, v. 54, p. 345-349, 1999.

MELO, A. L.; COELHO, P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: NEVES, D. P. et al. *Parasitologia Humana*. São Paulo, Atheneu, ed 11^a, 2005, p. 174-193.

MENTINK-KANE, M. M., et al. IL-13 receptor 2 down modulates granulomatous inflammation and prolongs host survival in schistosomiasis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, v.101, p. 586-590, 2004.

METWALI, A. et al. The granulomatous response in murine *Schistosomiasis mansoni* does not switch to Th1 in IL-4-deficient C57BL/6 mice. *J. Immunol.*; v.157, p. 4546-4553, 1996.

MORISON, D. C.; RYAN, J. L. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann Rev Med*, v. 38, p. 417-432, 1987.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, p. 846-852, 2002.

_____. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 6, p. 173-182, 2006.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 97, p. 8841-8848, 2000.

NELSON, S. et al. Compartmentalization of intra alveolar and systemic lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor and the pulmonary inflammatory response. *J. Infect. Dis.*, v.159, p.189-194, 1989.

OLIVEIRA, D. M. et al. Antigenic stimulation is more efficient than LPS in inducing nitric oxide production by human mononuclear cells on the in vitro granuloma reaction in schistosomiasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v. 32, p. 1437-1445, 1999.

OLIVEIRA, S. D. S. et al. Increased Endothelial Cell-Leukocyte Interaction in murine Schistosomiasis: Possible Priming of Endothelial Cells by the Disease. *PLoS ONE*, v. 6; p. 8, 2011.

ONGURU, D. et al. Short Report: Human Schistosomiasis is associated with endotoxemia and Toll-Like receptor 2- and 4-Bearing B cells. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 84, p. 321-324, 2011.

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

PESCE, J. T. et al. Retnla (relmalpha/fizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity. *Plos Pathog*, v. 54, 2009.

PLATT, T. R.; BROOKS, D. R. Evolution of the schistosomes (Digenea: Schistosomatidea): the origin of dioecy and colonization of venous system. *The Journal of Parasitology*, v. 83, p. 1035-1044, 1997.

POVOA, P. et al. C-reactive protein as a marker of ventilator-associated pneumonia resolution: a pilot study. *Eur. Respir. J.*, v. 25, p. 804-812, 2005.

QUEIROZ, S. L.; BATISTA, A. A. Funções biológicas do óxido nítrico. *Quím. Nova*, v. 22, p. 584-590, 1999.

RASO, P.; NEVES, J. Estudo anátomo-clínico de um caso da forma toxêmica da esquistossomose que evoluiu para a forma hêpato-esplênica em 130 dias (fibrose de Symmers). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 7, p. 256-266, 1965.

REZENDE, C. M. F. et al. Immunization with rP22 induces protective immunity against *Schistosoma mansoni*: Effects on granuloma down-modulation and cytokine production. *Immunology Letters*, v. 141, p. 123-133, 2011.

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

RICHARDS, O. G.; MACP, M. D. Deworming the world. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association*, v. 124, 2013.

ROSS, A. G. P. et al. Schistosomiasis: a clinical perspective. *N. Engl. J. Med.*, v. 346, p.1212-1220, 2002.

SANDEK, A. et al. The emerging role of the gut in chronic heart failure. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, v. 11, p. 632-639, 2008.

SCHILDBERGER, A. et al. Monocytes, peripheral blood mononuclear cells, and THP-1 cells exhibit different cytokine expression patterns following stimulation with lipopolysaccharide. *Hindawi Publishing Corporation. Mediators of Inflammation*, v. 2013, 2013.

SCHILLING, J. et al. Toll-like receptor-mediated inflammatory signaling reprograms cardiac energy metabolism by repressing peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 (PGC-1) signaling. *Circ Heart Fail*, v. 4, p. 474-482, 2011.

SEGAL, B. H. et al. M. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine*, v. 79, p. 170-200, 2000.

SHAW, A. F. B.; GHAREEB, A. A. The pathogenesis of pulmonary schistosomiasis in Egypt with special reference to Ayerza's disease. *J. Pathol.*, v. 46, p. 401-424, 1938.

SIGMA ALDRICH. Disponível em: < <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biology/glycobiology/lipopolysaccharides.html>>. Acessado em: 30 Oct 2013.

STADECKER, M. J.; HERNANDEZ, H. J. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. *Parasite Immunol*, v. 20, p. 217-221, 1998.

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

THOMAS, L. The physiological disturbances produced by endotoxins. *Annu. Rev. Physiol.*, v.16, p. 467-491, 1954.

TKALCEVIC, J. et al. Impaired immunity and enhanced resistance to endotoxin in the absence of neutrophil elastase and cathepsin G. *Immunity.*, v. 12, p. 201-210, 2000.

TURNER, J. D. et al. CD4+CD25+ regulatory cells contribute to the regulation of colonic Th2 granulomatous pathology caused by *Schistosoma* infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 8, p. 1269, 2011.

VAN DER KLEIJ, D. A. H. et al. Responses to Toll-like receptor ligands in children living in areas where *Schistosoma* infections are endemic. *J. Infect. Dis.*, v. 189, p. 1044, 2004.

VAN RIET, E. et al. Combined TLR2 and TLR4 ligation in the context of bacterial or helminth extracts in human monocyte derived dendritic cells: molecular correlates for Th1/Th2 polarization . *BMC Immunol.*, v. 10, 2009.

VELLA, A. T.; PEARCE, E. J. CD4- Th2 response induced by *Schistosoma mansoni* eggs develops rapidly, through an early, transient, Th0-like stage. *J. Immunol.*, v. 148, p. 2283-2290, 1992.

VERMEIRE, J. J. et al., Characterisation of a Rho homologue of *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*, v. 33, p. 721-731, 2003.

YPSILANTIS, P. et al. Bacterial translocation in a rat model of large volume hepatic radiofrequency ablation. *J. Surg. Res.*, v. 16, p. 250-258, 2010.

WANG, X. et al. Airway epithelial dysfunction in the development of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Expert Review of Respiratory Medicine*, v. 1, p. 149–155, 2007.

WARE, L. B.; MATTHAY, M. A. The acute respiratory distress syndrome. *New England Journal of Medicine*, v. 342, p. 1334-1349, 2000.

WEN, H. et al. Severe sepsis exacerbates cell-mediated immunity in the lung due to an altered dendritic cell cytokine profile. *Am. J. Pathol.*, v. 168, p. 1940-1950, 2006.

WEIBEL, E. R.; Morphometry: stereological theory and practical methods, In: Gil, J. (editor), Models of lung disease-microscopy and structural methods, *Marcel Dekker*, New York, p. 199-247, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (W. H. O.) *Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers*. Geneva, 2006.

_____,. *Accelerating work to overcome the global impact of neglected tropical diseases*. Geneva, 2012.

WIENS, M O. et al. Pediatric sepsis in the developing world: challenges in defining sepsis and issues in post-discharge mortality. *Clinical Epidemiology*, v. 4, p. 319-325, 2012.

WIERSINGA, W. J. Current insights in sepsis: from pathogenesis to new treatment targets. *Curr. Opin. Crit. Care*, v.17, p. 480-486, 2011.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol. Cell. Biol.*, v. 85, p. 148-154. 2007.

WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Curr. Opin. Immunol.*, v. 7, p. 505-511, 1995.

WYNN, T. A. et al. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev.*, v. 201, p. 156-167, 2004.