

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA**

**INFLUÊNCIA DA PROTEÍNA INFLAMATÓRIA DE
MACRÓFAGOS CCL3 EM CAMUNDONGOS C57BI/6J
INFECTADOS COM *Fasciola hepatica***

RENATA CRISTINA DE PAULA

**Belo Horizonte
2007**

Renata Cristina de Paula

**Influência da proteína inflamatória de macrófagos CCL3
em camundongos C57Bl/6J infectados com
*Fasciola hepatica***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Parasitologia.

Área de concentração: Helminologia

Orientador : Prof^o Marcos Pezzi
Guimarães - UFMG

Co-Orientadora: Prof^a Déborah A. Negrão-
Correa - UFMG

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Gostaria de agradecer ao programa de Pós Graduação em Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais na pessoa de seu atual coordenador, Prof. Pedro Marcos Linardi, pela oportunidade, apoio e incentivo, fundamentais para a realização deste trabalho.

FINANCIADOR

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do CNPq -Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - através do fornecimento de bolsa de estudo.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho não poderia ser realizado sem a ajuda de inúmeras pessoas. Aproveito esse momento para agradecer a cada uma delas, que dentro de suas possibilidades, fizeram o possível para que eu chegasse ao fim desta jornada.

Agradeço, primeiramente, ao meu orientador Prof. Marcos Pezzi, por abrir as portas de seu laboratório quando eu era ainda uma estudante de graduação. Não me esquecerei dos momentos em que o senhor compartilhou comigo as alegrias, quando eu entrava correndo (correndo mesmo) em sua sala para trazer boas notícias. Já os momentos ruins, foram todos superados e prefiro não lembrar aqui. Agradeço por acreditar em meu potencial e pelo incentivo quando tomei a decisão de entrar para o mestrado. Obrigada por me ajudar a tornar esse sonho possível!

Prof. Déborah, você surgiu no momento em que eu vi todo meu trabalho cair por terra. Chegou com novas idéias e uma grande empolgação, o que me ajudou a levantar depois da queda. Obrigada pelo seu exemplo como profissional e pelo compromisso que demonstrou comigo durante esses dois anos. Obrigada por me estender a mão em todos os momentos em que precisei de “socorro”. Obrigada pelo incentivo, conselhos, por nunca me deixar desanimar. Você foi muito mais que uma co-orientadora, muito obrigada!

Obrigada ao Prof. Dr. Múcio, pela excelente relatoria desta dissertação e pelas inúmeras vezes em que o senhor me ajudou a tirar fotos das minhas “*Fasciolas*”.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Geovanni Dantas Cassali pela ajuda tanto na confecção das lâminas como na interpretação dos resultados referentes à patologia, sem ele seria impossível interpretar parte dos meus resultados. Obrigada!

Obrigada ao Prof. Dr. Mauro M. Teixeira, por me conceder um espaço no laboratório de

Imunofarmacologia para realização de vários ensaios enzimáticos.

Gostaria de agradecer a banca examinadora do projeto que deu origem a essa dissertação. A intervenção de todos foi muito importante. Agradeço ao Prof. Alan pelo interesse e pela imensa boa vontade em colaborar com este trabalho e à Prof. Amália pelas sugestões, conselhos, carinho e compreensão. Muito obrigada!

Agradeço também ao Prof. Walter por permitir que eu entrasse em seu laboratório como estagiária de iniciação científica, se não fosse essa primeira oportunidade eu não teria chegado até aqui. Obrigada!

Ao longo dessa caminhada conheci muitas pessoas nesse departamento e no ICB e não posso deixar de lembrá-las e agradecê-las pelo apoio fundamental neste trabalho e no meu dia-a-dia.

Agradeço muito ao Adriano (Lab. de Imunofarmacologia) pela enorme paciência que teve para me ensinar a trabalhar com cultura de células e para fazermos repetidas vezes nossos ensaios enzimáticos. Adriano, você foi um anjo! Do fundo do meu coração, muito obrigada!

Sumara, você me ajudou muito durante esses dois anos. Gostaria de agradecer imensamente pela sua boa vontade em ajudar, paciência para nos ouvir, pela educação com qual sempre nos recebeu e ainda recebe, pelo interesse em ver os alunos dessa pós-graduação crescerem dentro do departamento, por torcer pelo bem de todos nós, enfim por tudo. Se não fosse você para me socorrer, Sumara, não sei o que seria de mim. Você é muito especial e muito querida, por tudo isso, muito obrigada!

Maria e Hudson, vocês dois foram fundamentais na realização deste trabalho. Hudson, obrigada pela ajuda durante as necropsias, na identificação dos parasitos, pelos conselhos e por me ajudar a conduzir este trabalho da melhor forma possível. Maria, obrigada pela ajuda

nos exames de fezes, na coloração e montagem dos parasitos, pela amizade e pelo carinho durante esses pouco mais de dois anos. Obrigada por compartilharem comigo as dificuldades e as alegrias desta jornada, por dividirem cada descoberta. Podem ter certeza de que uma parte desta dissertação foi feita por vocês. Muito obrigada!

Viviane e Eliane, obrigada pela ajuda nas necropsias, ensaios enzimáticos, cultivos de células, ELISA e também pelos momentos de distração em meio a tanto trabalho. Parte desta dissertação não poderia ter sido feita sem a colaboração de vocês. Continuem assim, interessadas, esforçadas, perseverantes. Vocês têm um belo futuro! Muito obrigada!

Agradeço a todos que fizeram ou fazem parte Laboratório de Helminologia Veterinária. Fátima, Juliana e todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Tenho muito a agradecer também ao José Carlos (GIDE) e ao Gilmar (CEBIO) afinal de contas, se não fossem eles para cuidar dos meus camundongos eu estaria perdida. Muito obrigada!

“Meninas” da Prof. Déborah, vocês me ajudaram muito! Adriana e Ana Teresinha, obrigada pela enorme paciência durante nossos “ELISAS”, vocês duas me ensinaram muito. Agradeço a Cintia pelas dicas e pela boa vontade que sempre demonstrou comigo. Agradeço também a Maria pelos ótimos momentos de descontração. Meninas, sem vocês eu não teria conseguido. Muito obrigada!

Agradeço ao Léo por me “apresentar” à *Fasciola* (já que fui sua estagiária de iniciação científica) e depois pela convivência no lab. do Prof. Pezzi, eu como aluna de mestrado e ele de doutorado. Obrigada pelos caramujos, pelas metacercárias, pelos momentos de descontração.

Os amigos foram essenciais durante esta caminhada. Alguns ajudaram diretamente neste

trabalho, outros foram responsáveis por me fazer esquecer o trabalho. Tenho muito a agradecer a todos vocês. Mas antes de começar com os amigos, tenho de agradecer ao meu amor.

Sydnei, me faltam palavras para agradecer tudo o que fez e ainda faz por mim. Obrigada pela ajuda prática em meus experimentos, pela ajuda durante as inúmeras necropsias, pelas fotos... Mais difícil é saber como agradecer e retribuir pelo carinho, dedicação, conselhos, pela constante preocupação, pelas alegrias, pelos sorrisos, pelo ombro amigo nas horas difíceis, por se alegrar junto comigo a cada conquista e por me ajudar a levantar quando caí, pela generosidade, por estar comigo em todos os momentos. Acho que tudo isso pode ser resumido em uma só palavra: amor! E a única forma através da qual eu poderia retribuir todo esse amor, é amando. Por isso, queria te dizer além de muito obrigada, te amo do fundo do meu coração!

Silvia, agradecer a você é uma tarefa difícil, não sei por onde começar. Agradeço pela sua amizade desde a graduação, foram muitos GD's, trabalhos da FAE, aulas de farmacologia, corridas no ponto de ônibus... Você me guiou para o caminho em que hoje estou quando me apresentou ao Laboratório de Helminologia Veterinária, me ensinou os primeiros passos nesse "mundo científico". Obrigada pelo incentivo, pelos puxões de orelha, por se preocupar comigo, pelos conselhos, pelas longas conversas, pelos lanches intermináveis (precisamos retomar esse hábito...), pelas cervejas, cachaças, caipirinhas, pela força nas horas difíceis, por se alegrar com cada conquista minha como se fosse sua, pela amizade. Você é uma amiga especial, muito obrigada do fundo do meu coração!

Ceres, obrigada pela amizade, pelas palavras amigas nas horas difíceis, por estar sempre preocupada comigo em todos os sentidos. Não me esquecerei dos momentos em que precisei do seu apoio e você sempre esteve lá me estendendo a mão. Você é uma grande amiga e uma pessoa iluminada! Como diria a Silvia: "Você não existe"! Adoro você!

Vivi, você é uma pessoa especial. Obrigada pela amizade, pelas conversas, pelas cervejinhas, pelas noites divertidas de vídeo-game, pelos livros de imunologia, por me incentivar, por me ouvir. Você e o Léo foram muito importantes durante esses anos. Obrigada por tudo!

Ana Flávia, Carla, Ceres, Fernanda, Kelly Key, Priscila e Sydnei, a “Família Mexicana”. Esses dois anos de mestrado foram muito árduos, mas se não fossem todos vocês, eles seriam impossíveis. Obrigada a todos por tornarem essa caminhada mais leve e divertida. Obrigada especialmente a Ceres e Kelly Key que também dividiram comigo quase quatro anos de graduação. Adoro vocês! O Sydnei é uma história à parte, de colega de mestrado se tornou meu namorado, meu amor, meu companheiro, meu amigo, meu cúmplice. Mais uma vez, obrigada por tudo!

Jozi e Thales, obrigada por estarem sempre dispostos a ajudar em todos os momentos e em tudo. Obrigada pela preocupação, pelo carinho, pela amizade, pelos almoços deliciosos... Vocês são duas pessoas maravilhosas! É claro que a união de vocês dois pessoas tão boas só poderia ter gerado um fruto tão especial: a Carol. Carol, você é a criança mais meiga e encantadora que eu conheci, obrigada por me tornar uma pessoa melhor e por me fazer descobrir sentimentos e emoções novas. “Pessoa”, você é um anjo lindo que surgiu na minha vida. Adoro você!

Aos queridos amigos: Sheila, Wander, Walzi e Lê, obrigada pelos momentos divertidos que vivemos, pela força, pelo carinho, pela preocupação, pelas noites intermináveis jogando Master (ainda bem que mudamos de jogo...), pela amizade. Vocês são maravilhosos!

Diana e Rízia, minhas novas companheiras de apartamento e de profissão, obrigada por me ajudarem nessa etapa final, que foi muito cheia de percalços. Obrigada por agüentarem meus momentos de stress, por me ajudarem a esquecer as dificuldades e por se tornarem minhas mais novas amigas. Meninas, vocês são “ótimas”!

É claro que nada do que fiz até hoje em minha vida seria possível se não fosse minha família.

Pai e Mãe, agradeço por terem me educado dentro de regras e princípios nos quais me baseio para construir minha vida profissional e pessoal. Tudo o que me tornei até hoje devo a vocês e continuarei neste caminho para que a cada dia mais vocês se orgulhem de mim. Amo vocês!

Agradeço a meus irmãos queridos: Ana Lúcia, Edivaldo e Júnior por me apoiarem, me entenderem e me ensinarem a ser uma pessoa melhor. Amo vocês!

Obrigada também aos meus avós, tios e primos que sempre me apoiaram e acreditaram em meu potencial. Amo todos vocês!

Por fim, agradeço a Deus, pois sem Ele não haveria absolutamente nada a agradecer!

"É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final. Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder. Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver ..."

Martin Luther King

RESUMO

Fasciola hepatica é um helminto que parasita fígado e vias biliares de bovinos, ovinos e caprinos, entre outros, com marcantes prejuízos para a pecuária das regiões sul e sudeste do Brasil devido à sua patogenia. As lesões hepáticas estão intimamente relacionadas à migração das formas imaturas do parasito e à conseqüente resposta inflamatória produzida pelo hospedeiro nos locais de migração. Sabe-se que a quimiocina CCL3, produzida e secretada por macrófagos ativados, é crucial na atração de diversos tipos celulares para um foco inflamatório, bem como pelo recrutamento de mais macrófagos para o mesmo em inúmeras doenças. Para avaliar a importância de CCL3 na infecção por *F. hepatica*, camundongos C57Bl/6J divididos em dois grupos foram infectados por via oral com dez metacercárias de *F. hepatica* sendo um grupo formado por camundongos capazes de produzir CCL3 selvagens e o outro grupo formado por camundongos geneticamente deficientes para a produção desta quimiocina. Os animais vieram a óbito principalmente entre o 23º e o 25º DAI, sendo necropsiados, e a busca pelo parasito realizada em todos os órgãos. A taxa de mortalidade no grupo de camundongos não deficientes para CCL3 foi maior do que a dos animais deficientes. Os camundongos capazes de produzir CCL3 apresentaram baço aumentado de tamanho quando comparados aos animais deficientes. Em ambos os grupos experimentais, os animais necropsiados na maioria das vezes, apresentavam hemorragia na cavidade abdominal. Ensaio imunoenzimáticos demonstraram que, os camundongos não deficientes para CCL3 produzem maior nível de IL-4, IL-10 e IL-13 que os animais deficientes. A atividade celular de neutrófilos e eosinófilos também foi menor no fígado dos camundongos deficientes quando comparada aos animais normais. O fígado dos animais CCL3^{+/+}, à necropsia, apresentava diversas alterações, sendo mais freqüente o encontro de áreas necro-hemorrágicas. Nos animais geneticamente modificados, as áreas lesionadas no fígado eram menos extensas e apresentavam lesões focais, subcapsulares e de consistência firme ao corte. Este trabalho

demonstrou que CCL3 tem participação no processo de formação de lesão em camundongos infectados por *F. hepatica*, já que animais deficientes em CCL3 apresentam menor mortalidade e menores lesões hepáticas em consequência de um perfil de resposta imunológica diferente daquele dos camundongos não deficientes.

Palavras-chave: *Fasciola hepatica*, CCL3, resposta imunológica, camundongos C57Bl/6J.

ABSTRACT

Fasciola hepatica is a trematode parasite that inhabits the liver and gallbladder ducts of hosts, including bovine, ovine and human. The hepatic injuries are associated with direct lesion as well as the intensity of the inflammatory reaction induced by the parasite during the migration of the immature forms and establishment of adult worms. Macrophage inflammatory protein (CCL3), produced and secreted mainly by activated macrophages, has a crucial role in the recruitment of pro-inflammatory cells to the lesion site. Therefore, in the present work we evaluated the immune response induced by *F. hepatica* infection (10 metacercariae/mice) in C57BL/6J mice genetically deficient in CCL3 production (CCL3KO) versus the wild type mice (WT). A significantly higher number of immature worms were recovered from WT mice compared to CCL3KO mice. Consequently, the liver lesion induced by *F. hepatica* was less extensive in CCL3KO infected mice. In addition, antigen-stimulated spleen cells recovered from 20 day-infected CCL3KO mice produced significantly lower level of IL-4, IL-13 and IL-10 cytokines and the liver of these mice showed significantly lower eosinophil peroxidase and mieloperoxidase activity than the WT-infected mice. The diminished inflammatory response of CCL3KO infected-mice was followed by significantly lower *F. hepatica*-induced mortality rate between 20 and 23 days of infection, however, the mortality increases in CCL3KO infected-mice after 25 days of infection. The results indicated that CCL3 production is crucial to cellular activation and migration to infection site during *F. hepatica* in mice.

Keywords: *Fasciola hepatica*, CCL3, immune response, mice C57Bl/6J.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	Delineamento experimental41
FIGURA 2	Necropsia de camundongos C57Bl/6J infectados por <i>Fasciola hepatica</i> . A e B – Camundongo CCL3 ^{-/-} com a cavidade abdominal repleta de sangue. C e D – Camundongo CCL3 ^{+/+} com cavidade abdominal hemorrágica. Ambos os camundongos vieram a óbito aos 22 DAI.55
FIGURA 3	Necropsia de camundongo C57Bl/6J infectado por <i>Fasciola hepatica</i> . O baço dos camundongos CCL3 ^{-/-} (A) apresenta uma discreta hipertrofia, enquanto que os camundongos CCL3 ^{+/+} (B) apresentam aumento significativo no volume do órgão.56
FIGURA 4	Necropsia de camundongos C57Bl/6J infectados por <i>Fasciola hepatica</i> eutanasiados 20 DAI. A e B - Fígado de camundongo CCL3 ^{-/-} . Lesões focais, subcapsulares e de consistência firme ao corte. C e D - Fígado de camundongo CCL3 ^{+/+} . Lesões de natureza necro-hemorrágica nos lobos hepáticos.57
FIGURA 5	Necropsia de camundongo C57Bl/6J infectado por <i>Fasciola hepatica</i> . Vesícula biliar aumentada de tamanho repleta de líquido enegrecido em seu interior.58

FIGURA 6	Necropsia de camundongos C57Bl/6J infectados por <i>Fasciola hepatica</i> . A – Parasito encontrado vivo entre o estômago e o baço do camundongo. B – Parasito entre o baço e o estômago em maior detalhe. C – Dois parasitos encontrados no interior do parênquima hepático D – Parasito fixado à superfície externa do fígado.60
FIGURA 7	Corte histológico de fígado de camundongo CCL3 ^{-/-} infectado por <i>Fasciola hepatica</i> corado por HE (Aumento de 10X). Lesões focais, ocupando uma pequena parte do local atingido.71
FIGURA 8	Corte histológico de fígado de camundongo CCL3 ^{+/+} infectado por <i>F. hepatica</i> corado por HE (Aumento de 10X). Nota-se lesões extensas provocadas pela migração do parasito.72
FIGURA 9	Infiltrado de polimorfonucleares na região lesionada do fígado de camundongos C57Bl/6J infectados por <i>F. hepatica</i> . A – Camundongo CCL3 ^{-/-} . B – Camundongo CCL3 ^{+/+} . Área de necrose coagulativa (Aumento de 20X).73
GRÁFICO 1	Curva de sobrevivência dos camundongos C57Bl/6J infectados com 10 metacercárias de <i>Fasciola hepatica</i>52
GRÁFICO 2	Número médio de <i>Fasciola hepatica</i> recuperadas em camundongos C57Bl/6J geneticamente deficientes para produção de CCL3 (CCL3 ^{-/-}) e em camundongos não	

	deficientes (CCL3).62
GRÁFICO 3	Produção de citocinas em células de baço oriundas de camundongos C57Bl/6J infectados por <i>Fasciola hepatica</i> aos 20 DAI e estimuladas <i>in vitro</i> com antígeno do parasito. A – Produção de IL-4. B – Produção de IL-13.64
GRÁFICO 4	Produção de IL-10 em células de baço oriundas de camundongos C57Bl/6J infectados por <i>Fasciola hepatica</i> aos 20 DAI e estimuladas <i>in vitro</i> com antígeno do parasito.65
GRÁFICO 5	Produção de IFN- γ em células de baço oriundas de camundongos C57Bl/6J infectados por <i>Fasciola hepatica</i> aos 20 DAI e estimuladas <i>in vitro</i> com antígeno do parasito.66
GRÁFICO 6	Contagem total e diferencial de leucócitos de camundongos C57Bl/6J infectados por <i>Fasciola hepatica</i> 20 DAI. A – Contagem total de leucócitos. B – Contagem diferencial de eosinófilos. C – Contagem diferencial de neutrófilos (segmentados e bastonetes). D – Contagem diferencial de linfócitos. E - Contagem diferencial de monócitos.68
GRÁFICO 7	Atividade enzimática no fígado de camundongos C57Bl/6J infectados por <i>Fasciola hepatica</i> aos 20 DAI. A – Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO). B - Atividade da mieloperoxidase de neutrófilos (MPO).69

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Número e localização de parasitos de *Fasciola hepatica* recuperados durante a necropsia de camundongos C57Bl/6J infectados com dez metarcercárias.

.....59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Albumina de Soro Bovino
CCL3	<i>Chemokine (C-C Motify) Ligand 3</i>
CCL3^{+/+}	Camundongos capazes de produzir CCL3
CCL3^{-/-}	Camundongos deficientes para a produção de CCL3
CD4⁺	Linfócitos que expressam determinante antigênico CD4
CD8⁺	Linfócitos que expressam determinante antigênico CD8
CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
DAI	Dias após a infecção
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme lynked immunosorbent assay</i>
EPO	Peroxidase de eosinófilos
BSF	Soro Fetal Bovino
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HE	Hematoxilina-eosina
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN-γ	Interferón gama
IgE	Imunoglobulina tipo E
IgG	Imunoglobulina tipo G
IL	Interleucina
MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
MPO	Mieloperoxidase de neutrófilos
OPD	ortofenilenodiamina
PBS	<i>Phoshate buffer saline</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Th1	Resposta imunológica por linfócitos tipo 1
Th2	Resposta imunológica por linfócitos tipo 2
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
$\gamma\delta$TCR⁺	Linfócitos que expressam receptor TCR
%	Porcentagem
μg	Micrograma
μl	Microlitro
μm	Micrômetros
°C	Graus Celsius
cm	Centímetro
dl	Decilitro
g	Gravidade
g	Gramas
h	Horas
kg	Quilograma
mg	Miligrama
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Micromolar
mm³	Milímetro cúbico
W	Watts

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
1.1. ASPECTOS GERAIS	23
1.2. REVISÃO DE LITERATURA	24
1.2.1. <i>Distribuição e Epidemiologia</i>	24
No Mundo	24
No Brasil	25
Fasciolose humana	27
1.3. MORFOLOGIA E BIOLOGIA	27
1.4. PATOLOGIA E SINTOMATOLOGIA CLÍNICA	30
1.5. IMUNOLOGIA	33
1.6. PROTEÍNA INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS 1 α – (MIP-1α / CCL3)	35
1.7. CCL3 E ESQUISTOSSOMOSE	37
2. OBJETIVOS	39
2.1. OBJETIVO GERAL	39
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3. METODOLOGIA	40
3.1. OBTENÇÃO DE METACERCÁRIAS	40
3.2. OBTENÇÃO DE ANTÍGENO BRUTO DE <i>F. hepatica</i>	41
3.3. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	41
3.4. INFECÇÃO DOS ANIMAIS	42
3.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	42
3.6. CINÉTICA DA INFECÇÃO POR <i>FASCIOLA HEPATICA</i> EM CAMUNDONGOS C57BL/6J	44
3.6.1. <i>Mortalidade</i>	44
3.6.2. <i>Necropsia para avaliação das alterações macroscópicas e recuperação de parasitos</i>	44
3.6.3. <i>Identificação dos Parasitos</i>	45
3.6.4. <i>Exames de Fezes</i>	46
3.7.1. <i>Contagem Total e Diferencial de Leucócitos</i>	47
3.7.2. <i>Avaliação da Resposta Humoral</i>	48
3.7.3. <i>Quantificação de citocinas</i>	49
<i>Cultura e Estimulação de Células</i>	49
<i>Ensaio para quantificação de citocinas</i>	49
3.7.4. <i>Infiltração Celular no Fígado dos Camundongos infectados</i>	50
<i>Atividade de peroxidase de eosinófilo (EPO) e Mieloperoxidase (MPO)</i>	50
3.7.5. <i>Histopatologia hepática</i>	53
3.8. <i>Análise estatística</i>	53
4. RESULTADOS	54
4.1. CINÉTICA DA INFECÇÃO	54
4.1.1. <i>Mortalidade</i>	54
4.1.2. <i>Alterações Macroscópicas</i>	56
4.1.3. <i>Local de Recuperação de Parasitos durante a necropsia</i>	62
4.1.4. <i>Exames de Fezes</i>	64
4.2. CONTAGEM DE PARASITOS E ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA FASE AGUDA DA INFECÇÃO POR <i>FASCIOLA HEPATICA</i> EM CAMUNDONGOS C57BL/6J	64
4.2.1. <i>Concentração de citocinas</i>	66

4.2.2. Avaliação da Resposta Humoral	70
4.2.3. Contagem Total e Diferencial de Leucócitos	70
4.2.4. Análise da Composição do Infiltrado Celular nos Locais Lesionados Pelo Parasito	70
4.2.5. Histopatologia Hepática	73
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS

Fasciola hepatica (Linnaeus, 1758) é um trematódeo causador de uma parasitose denominada fasciolose e que acomete o fígado e as vias biliares principalmente de bovinos, ovinos, caprinos e eqüinos (QUEIROZ et al., 2002). A fasciolose é uma enfermidade de grande importância veterinária por causar elevadas perdas econômicas. Além dos prejuízos à pecuária, a fasciolose constitui uma zoonose sendo que o homem pode tornar-se hospedeiro acidental deste trematódeo (MULLER et al., 1998).

O prejuízo econômico atribuído à fasciolose é decorrente da condenação, em abatedouros, de fígados dos animais infectados, infecções bacterianas secundárias, à queda na produção e qualidade do leite, carne e lã, perda de peso, abortos, queda na fertilidade, atraso no crescimento e altas taxas de mortalidade dos animais (REID et al., 1972; OAKLEY et al. 1979; DAEMON & SERRA FREIRE, 1992; QUEIROZ et al., 2002). Na década de 50, Battle et al. (1951) atribuíram à fasciolose uma perda anual próximo a 100 mil dólares, somente no Estado da Flórida, nos Estados Unidos da América. Babalola & Schillhorn van Veen (1976) após levantamento realizado em matadouros de Buachi, Nigéria, afirmaram que a perda anual devido à condenação de fígados foi estimada em aproximadamente 206 mil dólares. Ogurinde & Ogunrinde (1980) observaram na Nigéria em uma população bovina de 10 milhões de cabeças, a incidência média anual da doença de 2,5%; índice de mortalidade de 1% e índice de condenação hepática de 7%, o que determinou uma estimativa de perda anual de 53 mil dólares. Estima-se que as perdas relativas à fasciolose alcancem a cifra de US\$ 3,2 bilhões anuais em todo o mundo (YOKANANTH et al., 2005).

A condenação do fígado dos animais acometidos pela infecção ocorre devido às lesões encontradas neste órgão. A infiltração celular nos focos inflamatórios acontece em resposta a quimiocinas e citocinas secretadas pelas células presentes nos locais da injúria (MAURER & STEBUT, 2004). A resposta inflamatória pode influenciar a formação das lesões nesses locais, resultando em um efeito prejudicial ao hospedeiro como acontece no caso da infecção por *Schistosoma mansoni* (SOUZA et al., 2005).

1.2. REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1. Distribuição e Epidemiologia

No Mundo

A relação entre *F. hepatica* e os ruminantes data de longos anos sendo descrito o encontro de ovos do parasito em coprólitos e intestinos mumificados de humanos, bovinos e cavalos que datavam de 3500 AC a 200 DC na Alemanha (Dittmar & Teegen, 2003). Posteriormente, também foi relatado o encontro de ovos de *F. hepatica* em coprólitos humanos em outros países da Europa, dentre os quais: França, Holanda, Dinamarca, Alemanha, Áustria, Polônia, Suíça. Nos países do Novo Mundo, ainda não existem relatos do encontro de ovos de *F. hepatica* em coprólitos (MAS-COMA et al., 2005).

A prevalência da fasciolose é bastante variada na Europa e é relatada a infecção em rebanhos bovinos na Espanha (29,5%), França (12,6%), Reino Unido (10%) e Itália (5%) (GONZÁLEZ-LANZA et al., 1989; POGLAYEN et al., 1995; TAYLOR, 1989; citados por TORGERSON & CLAXTON, 1999; MAGE et al., 2002). Na região nordeste da Espanha,

Paz-Silva et al. (2003) observaram o parasitismo em 30,4% dos ovinos examinado através de exames coproparasitológico.

No norte da África, em Marrocos, a prevalência de *F. hepatica* foi estimada em 10,4% em bovinos e 17,1% a 23,8% em cabras (TORGERSON & CLAXTON, 1999). Yilma & Mesfin (2000) relataram que 51,2% do gado bovino na Etiópia estava contaminado por *F. hepatica*.

Os países da América do Norte que registraram maior índice de fasciolose entre os anos de 1986 e 1994 foram os Estados Unidos e o Canadá. Nos Estados Unidos, a prevalência da fasciolose bovina variou entre 5,9% (Colorado) e 68% (Flórida). No Canadá foi encontrada uma prevalência superior a 68% de fasciolose no gado leiteiro (TORGERSON & CLAXTON, 1999).

Na América do Sul, o Chile merece posição de destaque, uma vez que no ano de 1985, foi observada uma prevalência da infecção superior a 94% no rebanho bovino (TORGERSON & CLAXTON, 1999).

Na região andina, Villavicencio & Vasconcellos (2005) relataram prevalência da fasciolose hepática entre 20 e 60% dos bovinos nas propriedades rurais.

No Brasil

A fasciolose no Brasil tem sido diagnosticada geralmente nas regiões Sul e Sudeste, acometendo freqüentemente bovinos, caprinos, ovinos e eqüinos, embora existam relatos de infecção em roedores e outros mamíferos (SINCLAIR, 1972; SERRA-FREIRE, 1995).

O Estado do Rio Grande do Sul apresenta alto índice de prevalência da fasciolose em ruminantes. Em um levantamento da infecção feito em matadouros do Estado entre 1918 e

1925, Pecêgo (1925) relatou índices de prevalência anual da fasciolose de 1,9% a 21%. Atualmente, Marques & Scroferneker (2003), descreveram uma prevalência de 10,34% da infecção em exames realizados no fígado e ductos biliares de bovinos provenientes de matadouros de 11 municípios do Estado.

Os primeiros relatos no Estado do Paraná tratam de dois bovinos contaminados por *F. hepatica* (GIOVANNONI & KUBIAK, 1947) e em inquéritos coproparasitológicos realizados nos municípios de Tunas do Paraná e Bocaiúva do Sul, no mesmo Estado, Queiroz et al. (2002) registrou uma prevalência de 8% de fasciolose bovina.

Ribeiro (1949) relatou uma prevalência da fasciolose de 2,93% e 3,4% nos anos de 1946 e 1947, respectivamente, estudando casos de rejeição de fígados de bovinos em abatedouros no Brasil central.

Na região Sudeste, a fasciolose bovina foi descrita nos Estados de Minas Gerais, São Paulo e Rio de Janeiro. Desta região provém o primeiro relato de fasciolose no Brasil, que data de 1921 e foi feito por Lutz (1921), que encontrou exemplares de *Lymnaea ochrostigma* infectados por *F. hepatica* na cidade de Três Rios, Rio de Janeiro. Em relatos mais atuais, foi descrita para bovinos nos Estados de São Paulo e Rio de Janeiro, uma prevalência 6,7% e 13% respectivamente.

Em Minas Gerais, Carvalho (1940) observou um bovino infectado por *F. hepatica* no município de Viçosa. Atualmente, para a cidade de Itajubá, a prevalência encontrada foi de 10,67% (NUNES, 2000). Um levantamento realizado por Lima et al.(2004) demonstrou a prevalência da fasciolose hepática nas seguintes cidades: Belo Horizonte (1,2%), Itabira (0,2%), Divinópolis (0,93%), Poços de Caldas (0,26%) e Varginha (0,4%). Ainda no mesmo trabalho, os autores coletaram moluscos da espécie *L. columella* nos municípios de Belo Horizonte e Itajubá, encontrando nestes uma taxa de infecção de até 5%.

Fasciolose humana

Atualmente acredita-se que o número de pessoas infectadas pelo parasito ou que já foram acometidas pela doença seja de 2,5 milhões de indivíduos em 51 países, em todos os continentes, e que mais de 180 milhões estejam sob risco de contrair a doença (MAS-COMAS et al., 2005). As regiões do globo onde a fasciolose humana é mais freqüentemente relatada são os países Andinos (Bolívia, Peru, Chile e Equador), região do Caribe (Cuba), norte da África (Egito), Europa Ocidental (Portugal, França e Espanha) e Irã e países vizinhos (AKSOY et al., 2005; MAS-COMAS et al., 2005; GULSEN et al., 2006). No Brasil já foram relatados 57 casos de fasciolose humana, sendo a maioria no Estado do Paraná, seguido pelos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Bahia, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, em 2005, registrou quatro casos de fasciolose humana no município de Canutama (AM). Em um inquérito epidemiológico realizado no município entre Novembro de 2004 e Maio de 2005, foram registrados 22 indivíduos acometidos pela doença (Ministério da Saúde, 2005).

1.3. MORFOLOGIA E BIOLOGIA

Fasciola hepatica é um parasito digenético que pertence à classe Trematoda, família Fasciolidae (Railliet, 1895) e sub-família Fasciolinae (Stiles et Hassall, 1898). O parasito adulto possui o corpo achatado dorso-ventralmente e extremidade anterior em formato de cone, terminando com uma ventosa oral. Além da ventosa oral, o parasito possui uma segunda ventosa na superfície ventral do corpo. As ventosas auxiliam na adesão do parasito aos órgãos e tecidos do hospedeiro. O poro genital localiza-se entre as duas ventosas e é uma abertura

comum ao sistema genital masculino e feminino, sendo os parasitos hermafroditas (BENNETT, 1975b). A superfície do corpo é coberta por espinhos que ajudam a fixar o parasito nos ductos biliares. Grupos de papilas sensoriais encontram-se na superfície corpórea do mesmo, sendo mais numerosas na região anterior do corpo, em torno e ao lado das ventosas. Essas papilas podem ter funções mecanorreceptoras e/ou quimiorreceptoras (BENNETT, 1975a). O sistema nervoso central deste parasito compreende um par de gânglios, um à esquerda e outro à direita da faringe, logo abaixo da ventosa oral. Estes gânglios são conectados por comissuras transversais que percorrem toda a superfície dorsal da faringe. Dos gânglios partem três cordões nervosos, um ventral, um lateral e um dorsal. O sistema nervoso periférico compreende corpos celulares e fibras localizadas abaixo do tegumento. O sistema digestório possui faringe, esôfago e ceco, que termina em fundo cego. O sistema excretor é constituído por células-flama que são conectadas por túbulos que lançam seus produtos de excreção para fora do corpo através de um poro situado na porção terminal do corpo (FAIRWEATHER et al., 1999).

O ciclo do parasito foi inicialmente descrito na Alemanha (LEUCKART, 1882 citado por COELHO, 2001) e Inglaterra (THOMAS, 1882 citado por COELHO, 2001) onde o molusco *Lymnaea truncatula* foi apontado como hospedeiro invertebrado.

Os ovos do parasito são eliminados juntamente com as fezes dos hospedeiros vertebrados infectados e precisam estar em contato com a água para que o desenvolvimento do parasito no interior dos ovos tenha continuidade. No meio externo, ainda dentro do ovo, dependendo das condições ambientais, ocorre o desenvolvimento de uma larva, que é chamada miracídio. O miracídio, que é ciliado, após eclodir do ovo nada ativamente em busca de moluscos do gênero *Lymnaea*, que são seus hospedeiros intermediários. O período entre a eliminação do ovo pelo parasito e a eclosão do miracídio varia entre 12 e 14 dias. Depois de penetrar no molusco, o miracídio transforma-se em esporocisto. As células germinativas dos esporocistos

dão origem às rédias que, ainda dentro do molusco, originam um grande número de cercárias. As cercárias deixam o molusco cerca de 45 dias após a penetração do miracídio em seus tecidos, nadam até encontrarem a vegetação (ou mesmo na superfície da água) e transformam-se em formas encistadas denominadas metacercárias (BEHM & SANGSTER, 1999). Os hospedeiros vertebrados se infectam ao ingerirem vegetais e/ou água contaminada com as metacercárias. Ao passarem pelo estômago e entrarem em contato com o suco gástrico, as metacercárias desencistam-se, atravessam a parede do intestino delgado, alcançam o peritônio e penetram no fígado do hospedeiro. O intervalo de tempo entre a contaminação do hospedeiro e a chegada do parasito ao fígado, em ruminantes, é de cerca de 72 horas (SINCLAIR, 1967). O momento em que os parasitos penetram a parede intestinal não está associado a qualquer sintomatologia clínica, já que apenas uma pequena quantidade de células é danificada nesse processo. Os parasitos alcançam o fígado 90 horas após a ingestão das formas infectantes pelo hospedeiro. Em ruminantes, os parasitos penetram no parênquima hepático e permanecem migrando pelo mesmo por até 8 semanas, alimentando-se de sangue e células hepáticas. Durante o processo de migração do parasito, o parênquima hepático é danificado e no caminho percorrido pelos parasitos são encontrados restos celulares, eritrócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos e nestes locais os danos às células hepáticas são evidentes. Ao atingirem os ductos biliares, por volta da 9ª ou 10ª semana de infecção, os parasitos completam seu desenvolvimento e dão início à postura de ovos. O intervalo de tempo entre a eliminação de ovos nas fezes dos hospedeiros vertebrados e o desenvolvimento do parasito até a fase adulta em ruminantes é de aproximadamente 60 a 90 dias (BEHM & SANGSTER, 1999; COELHO, 2001).

Em camundongos o parasito desenvolve-se mais rápido quando comparado aos ruminantes, e as alterações patológicas mostram-se exacerbadas com relação aos seus hospedeiros naturais.

Os parasitos imaturos são encontrados na cavidade abdominal 24h após a ingestão das metacercárias e nos ductos biliares 24 dias após a infecção (DAWES, 1963b,c).

1.4. PATOLOGIA E SINTOMATOLOGIA CLÍNICA

A migração de *F. hepatica* pelo corpo do hospedeiro vertebrado tem início quando a metacercária desencista-se e penetra a mucosa intestinal, alcançando assim, a cavidade abdominal de seu hospedeiro. Não foram encontrados relatos na literatura a respeito dos danos causados pelo parasito durante a penetração na mucosa intestinal e durante a migração pela cavidade abdominal de ruminantes. Não existem também relatos sobre uma resposta imunológica capaz de matar os parasitos antes dos mesmos chegarem ao fígado destes animais (PIEDRAFITA et al., 2001).

Os parasitos imaturos após migrarem pela cavidade abdominal penetram no parênquima hepático e dão início a um processo de migração dentro do mesmo. A ação preênsil das ventosas do parasito imaturo no parênquima hepático e a destruição de hepatócitos decorrente da alimentação do mesmo são responsáveis por grandes danos a este órgão. Os casos de morte do hospedeiro nesta fase, chamada de fase aguda ou fase hepática da infecção, são consequência destas ações do parasito no fígado (BEHM & SANGSTER, 1999). Segundo Acha (1977), a fase aguda da fasciolose corresponde a um quadro de hepatite traumática, devido à migração das larvas do trematódeo pelo parênquima hepático. Essa movimentação provoca extensa destruição de tecidos. Em casos de infecção maciça pode ocorrer ruptura da cápsula hepática acompanhada de hemorragia para a cavidade peritoneal, o que pode ocasionar morte em poucos dias, sem sintomatologia aparente (BEHM & SANGSTER, 1999).

Além dos danos mecânicos induzidos pela migração das formas jovens de *F. hepatica*,

existem aqueles que são provocados pela resposta inflamatória do hospedeiro à presença do parasito e seus metabólitos (DAWES, 1963c). Ao longo dos caminhos percorridos pelo parasito podem ser encontrados restos celulares, eritrócitos, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e macrófagos. Nas lesões mais antigas encontram-se macrófagos e fibroblastos formando granulações fibróticas, tornando o tecido endurecido. Entre a 1ª e 3ª semana após a infecção, os danos no fígado permanecem limitados ao “caminho” percorrido pelo parasito. Ocorre hemorragia subcapsular, degeneração de células hepáticas e presença de infiltrados eosinofílicos nos locais percorridos pelo parasito. Eosinófilos e macrófagos são encontrados nos tecidos adjacentes. Nesta fase pouca sintomatologia clínica é relatada. Com o decorrer da infecção pode-se observar aumento na diversidade de células que compõem o infiltrado inflamatório presente nas lesões e áreas de fibrose começam a ser formadas nestes locais. O fígado apresenta áreas de congestão e hemorragia subcapsular. Essas áreas de fibrose evoluirão para anéis fibróticos concêntricos, formados por tecido fibroso e linfócitos (BEHM & SANGSTER, 1999). Uma biopsia do fígado pode indicar necrose, destruição do parênquima, infiltração de polimorfonucleares com abundância de eosinófilos, granulomas com ou sem ovos, e fibrose (AKSOY et al., 2005).

Reid et al. (1972) afirmaram que o estágio biliar da *Fasciola* (adulta e imatura com mais de oito semanas de idade) afeta muito mais a produtividade dos animais, devido ao hematofagismo intenso, comparada à causada por *Fasciola* com menos de 8 semanas. De acordo com os autores, os sinais clínicos mais frequentes de fasciolose, observados em bovinos com menos de dois anos de idade são: perda de peso, anemia, letargia e palidez das mucosas.

Ainda durante a fase migratória no fígado dos ruminantes, o parasito imaturo pode carrear consigo vários outros patógenos. Dentre eles, *Clostridium novyi* é encontrado com mais

frequência e pode provocar hepatite necrótica conhecida como “black disease” (SINCLAIR, 1967). A hepatite necrótica é uma enfermidade de caráter agudo e a denominação de “black disease” foi dada devido à presença de sangue venoso cianótico no tecido subcutâneo e, aparentemente, na pele. No fígado são observadas áreas necróticas de coloração cinza-amareladas, circundadas por áreas hemorrágicas, decorrentes da ação das toxinas produzidas pelo agente (NASCIMENTO et al., 2004).

Na fase crônica da infecção o parasito localiza-se nos ductos e na vesícula biliar do hospedeiro e inicia ali sua postura de ovos. A descamação e ulceração provocadas pelos espinhos e ventosas nos ductos hepáticos levam a infiltração de várias células, inclusive fibroblastos, que são diretamente responsáveis pelos processos de fibrose ocorridos no fígado (DAWES, 1963a). Nesta fase, os ductos biliares começam a dilatar-se, levando à uma hiperplasia dos mesmos. Entre 16 e 20 semanas após a infecção, observa-se deposição de cálcio nas paredes dos ductos biliares. Essas alterações culminam em hemorragia e necrose da mucosa dos ductos (ROSS et al., 1967; SINCLAIR, 1967; DOW et al., 1968; BORAY, 1969). No início desta fase é relatado o encontro de um pequeno infiltrado inflamatório local. A hiperplasia dos ductos biliares acentua-se com o decorrer da infecção e atinge níveis extremos levando a necrose desses ductos e a um quadro de hemorragia (BEHM & SANGSTER, 1999).

A fasciolose crônica é caracterizada por perda de peso, ascite, desenvolvimento gradual de edema submandibular, anemia, hipoproteinemia, hipoalbuminemia, elevada atividade enzimática no fígado, eosinofilia e em cargas parasitárias muito altas, a infecção pode levar o animal à morte (BEHM & SANGSTER, 1999).

Em camundongos após a ingestão das metacercárias, as mesmas desencistam-se e as formas jovens podem ser encontradas aderidas à parede do intestino. Este achado é incomum, uma vez que nos procedimentos de necropsia o parasito pode desprender-se da parede intestinal e

ser encontrado na solução usada para lavagem do órgão. Áreas de hemorragia decorrentes da penetração do parasito na parede do intestino podem ser visualizadas e uma extensa destruição de fibras musculares no órgão indica uma possível migração do parasito ao longo do intestino. Morte súbita devido à extensa hemorragia hepática é um achado comum antes de 24 dias de infecção, já que o parasito pode entrar e sair do fígado várias vezes na fase migratória da infecção, e durante seu deslocamento, provocar o rompimento de vasos sanguíneos. A hiperplasia do epitélio dos ductos biliares acontece após quatro semanas de infecção, quando os adultos de *F. hepatica* já estão estabelecidos nos ductos biliares. Os parasitos adultos provocam ulceração na parede dos ductos, porém sem provocar hemorragia (DAWES, 1963a, b).

Em humanos, a fase aguda da infecção por *F. hepatica*, também conhecida como fase hepática ou invasiva, é caracterizada pela penetração do parasito no parênquima hepático e pela migração do mesmo através do fígado em busca dos canais biliares. Os sintomas clássicos nesta fase são: febre, urticária, dor intermitente na parte superior direita do abdômen, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia e eosinofilia. Outras alterações que podem ser observadas são: hepatite, hemorragia subcapsular e necrose hepática. No segundo estágio da doença, ou fase crônica, os sintomas mais comuns são: dor intermitente no quadrante abdominal superior, podendo apresentar ou não colangite ou colestase (PILE et al., 2000; IGREJA et al., 2004; AKSOY et al., 2005).

1.5. IMUNOLOGIA

As alterações mais comuns observadas durante a infecção por helmintos são eosinofilia, aumento nos níveis séricos de IgE e IgG1 (no caso de camundongos), e mastocitose (URBAN et al., 1992; FINKELMAN et al., 1997). Estas alterações são características da resposta imune

controlada por linfócitos T auxiliares do tipo 2 (linfócitos Th2), que expressam o determinante antigênico CD4 (CD4⁺) na superfície celular e secretam, principalmente, as citocinas denominadas interleucina-4 (IL-4), IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13 em resposta à estimulação antigênica. No entanto, os possíveis mecanismos regulados por estas citocinas que são responsáveis pela proteção contra helmintos ou, em alguns casos, pelo aumento da lesão e conseqüentemente da patologia associada à infecção, ainda não foram claramente estabelecidos (MOSSMAN & COFFMAN, 1989).

A infecção por *F. hepatica*, assim como por outros helmintos, é acompanhada por uma elevação dos níveis de IgE, eosinofilia e todas as demais alterações induzidas pela subpopulação de linfócitos Th2 (MULCAHY et al., 1999). A infecção induz uma eosinofilia marcante no sangue periférico e nas células da medula óssea de camundongos, ratos e ovelhas. Em ovelhas, estudos histológicos nos focos inflamatórios presentes no fígado de animais infectados evidenciaram infiltrados de eosinófilos e células CD4⁺ na fase inicial da infecção; na fase crônica surgem também focos inflamatórios formados por infiltrados de células CD8⁺ e células $\gamma\delta$ TCR⁺ (O'NEILL et al., 2000).

Segundo Sinclair (1968), a resposta imune do hospedeiro é importante para a proteção do mesmo contra os danos causados por *F. hepatica*, uma vez que ovelhas infectadas e tratadas com corticóides apresentaram maiores lesões no fígado, além de um desenvolvimento mais rápido dos parasitos. Esses animais desenvolveram a doença de forma mais rápida e grave.

Em camundongos atímicos infectados por *F. hepatica*, observa-se a morte dos mesmos invariavelmente durante a fase de migração do parasito pelo fígado, encontrando-se extensos danos no órgão e ausência de infiltrado celular nos locais das lesões (BEHM & SANSTER, 1999).

Segundo O'Neill et al. (2000), camundongos infectados por *F. hepatica* produzem predominantemente citocinas relacionadas a um perfil de resposta do tipo Th2. Nestes estudos, camundongos C57Bl/6J infectados com 15 metacercárias apresentaram polarização para resposta tipo Th2. Esse tipo de resposta na fasciolose murina parece ser altamente dependente de IL-4, uma vez que camundongos deficientes para a produção desta citocina apresentam uma polarização para o perfil de resposta Th1. Na infecção por *F. hepatica* em algumas linhagens de camundongos observa-se também a produção de anticorpos do tipo IgE e IgG1 independente da carga parasitária do animal (BRADY et al., 1999; O'NEILL et al., 2000). Brady et al. (1999) demonstraram que em camundongos co-infectados por *F. hepatica* e pela bactéria *Bordetella pertussis*, a resposta Th2 induzida por *F. hepatica* é capaz de suprimir a potente resposta Th1 induzida pela bactéria. Foi observado, ainda, um aumento na produção de IL-4 em camundongos infectados por *F. hepatica* e *B. pertussis*, além de uma queda nos níveis de IFN- γ nos mesmos camundongos.

1.6. PROTEÍNA INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS 1 α – (MIP-1 α / CCL3)

Durante um processo inflamatório provocado por uma injúria ou pela presença de algum patógeno, os leucócitos migram para esses locais em resposta a fatores quimiotáticos, como por exemplo, citocinas ou quimiocinas (MENTEN et al., 2002).

Quimiocinas são proteínas com ação quimiotática para outras células envolvidas na resposta imune contra patógenos. As quimiocinas são caracterizadas pela conservação de quatro resíduos de cisteína, e de acordo com a posição das mesmas podem ser divididas em quatro sub-famílias: sub-família CC (onde duas cisteínas estão diretamente ligadas), sub-família CXC (duas cisteínas separadas por um resíduo de aminoácido), C (apenas uma cisteína) e sub-

família CX₃C (duas cisteínas separadas por três resíduos de aminoácidos) (MENTEN et al., 2002; MAURER & STEBUT, 2004).

As quimiocinas da família “Macrophage Inflammatory Protein”-1 (MIP-1) foram descobertas em 1988, quando foram purificadas a partir do sobrenadante de produtos de macrófagos murinos estimulados com endotoxinas e, devido às suas propriedades inflamatórias tanto *in vivo* como *in vitro*, essas quimiocinas foram denominadas como proteínas inflamatórias de macrófagos. Mais tarde, essas proteínas foram desmembradas em duas proteínas distintas: MIP1- α e MIP1- β (MENTEN et al., 2002).

MIP1- α e MIP1- β , tanto humanas quanto murinas, foram isoladas e nomeadas independentemente por diversos grupos de estudo. Uma nova nomenclatura para as quimiocinas e seus receptores foi proposta a fim de padronizar a classificação das mesmas. As quimiocinas foram então divididas em dois tipos: quimiocinas inflamatórias e quimiocinas homeostáticas. As primeiras sendo especializadas em recrutar células inflamatórias para um dado local após estímulo por citocinas ou contato com agentes patogênicos. O segundo grupo seria responsável pelo posicionamento de células do sistema imune adaptativo no que diz respeito à apresentação de antígenos e hematopoiese. A quimiocina MIP1- α é atualmente chamada de CCL3 de acordo com esta nova nomenclatura que será adotada neste trabalho (CYSTER, 1999; ZLOTNIK & YOSHIE, 2000, MOSER & LOETSCHER, 2001).

A quimiocina CCL3 é produzida e secretada por macrófagos ativados para atrair outras células pró-inflamatórias e é também crucial no processo de recrutamento de mais macrófagos para os sítios inflamatórios. As proteínas da sub-família CC, na qual se inclui CCL3, produzem efeito biológico ao se ligarem a receptores de quimiocinas na superfície das células e ativarem uma cascata de eventos intracelulares, que rapidamente desencadeiam nas células diversas funções, como quimiotaxia, degranulação, fagocitose e síntese de alguns mediadores.

As quimiocinas do grupo CCL3 têm papel importante na resposta do hospedeiro em inflamações agudas e crônicas nos sítios de lesão ou infecção, por recrutarem células inflamatórias para estes locais. Essas quimiocinas têm grande importância na patogênese de diversas doenças inflamatórias, tais como, artrite, esclerose múltipla e na formação de granulomas (MAURER & STEBUT, 2004).

Segundo Falcão et al. (2002), experimentos com modelos murinos sugerem que as quimiocinas, dentre elas CCL3, possuem um papel importante na definição do tipo de infiltrado celular e conseqüentemente, no tipo de resposta imune durante o processo de formação de granulomas que ocorre em camundongos infectados e/ou imunizados com antígenos de ovos de *Schistosoma mansoni*.

1.7. CCL3 E ESQUISTOSSOMOSE

SOUZA et al. (2005) desenvolveram um trabalho com camundongos C57Bl/6J geneticamente normais (CCL3^{+/+}) e camundongos geneticamente deficientes para a produção de CCL3 (CCL3^{-/-}) e infectados com *S. mansoni*. Neste trabalho foi demonstrado que, após 14 semanas de infecção, havia diferenças estatisticamente significativas nos parâmetros recuperação de vermes adultos e mortalidade de camundongos entre os grupos experimentais. O grupo de animais geneticamente deficientes para a produção de CCL3 apresentou uma taxa menor de recuperação de parasitos e uma queda na taxa de mortalidade do grupo. Foram propostas duas hipóteses para explicar esses resultados: que CCL3 pode interferir na resposta imune contra o parasito, tornando-a mais eficiente e forma capaz de causar a eliminação de um certo número de parasitos adultos e que a ausência de CCL3 pode agir direta ou indiretamente sobre a sobrevivência de vermes adultos. A diferença entre a carga parasitária apareceu após nove semanas de infecção e foi responsável por uma tendência de camundongos capazes de

produzir CCL3 apresentarem taxas de mortalidade maiores que os animais deficientes para esta quimiocina. Outros estudos sugerem exacerbação da resposta contra antígenos de ovos de *S. mansoni* associada a altas concentrações de CCL3, ou inibição, quando esta é bloqueada por anticorpos anti-CCL3 (LUKACS et al., 1996, OLIVEIRA et al., 1999, FALCÃO et al., 2002). Os autores sugerem não haver diferença entre a fecundidade das fêmeas do parasito em ambos os grupos, porém as do grupo de camundongos deficientes para a produção de CCL3 apresentaram uma taxa de eliminação de ovos menor que as do grupo de camundongos geneticamente normais (SOUZA et al. 2005).

Os prejuízos atribuídos à fasciolose estão relacionados em grande parte à condenação, em abatedouros, do fígado dos animais infectados. As lesões encontradas nesse órgão são conseqüências do processo inflamatório desencadeado pela migração das formas imaturas e adultas do parasito no parênquima hepático e nos ductos biliares, bem como a presença de seus metabólitos. Durante esse processo ocorre a migração de células inflamatórias para o local da injúria, migração essa que pode ser fortemente influenciada pela presença de CCL3 neste local. Elucidar os mecanismos envolvidos na infecção por *F. hepatica* pode contribuir para o desenvolvimento de alternativas terapêuticas, que resultem em modulação da patologia e conseqüentemente redução dos prejuízos econômicos decorrentes da doença.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da quimiocina CCL3 na infecção por *Fasciola hepatica* em camundongos C57Bl/6J.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a sobrevivência dos camundongos C57Bl/6J geneticamente deficientes para a produção de CCL3 (CCL3^{-/-}) em comparação com os camundongos C57Bl/6J não modificados geneticamente (CCL3^{+/+}) após a infecção por *F. hepatica*;
- ✓ Comparar a taxa de recuperação de parasitos em camundongos CCL3^{-/-} e CCL3^{+/+} infectados por *F. hepatica*;
- ✓ Avaliar macro e microscopicamente as lesões hepáticas induzidas pela infecção por *F. hepatica* em camundongos CCL3^{-/-} e CCL3^{+/+};
- ✓ Avaliar a composição do infiltrado celular hepático induzido pela infecção por *F. hepatica* em camundongos CCL3^{-/-} e CCL3^{+/+};
- ✓ Quantificar a produção de citocinas, IL-4, IL-10, IL-13, TNF- α e IFN- γ induzidas pela infecção por *F. hepatica* em camundongos CCL3^{-/-} e CCL3^{+/+};
- ✓ Estimar a produção de IgE total em camundongos CCL3^{-/-} e CCL3^{+/+} infectados por *F. hepatica*.

3. METODOLOGIA

3.1. OBTENÇÃO DE METACERCÁRIAS

O ciclo do parasito foi mantido no Laboratório de Helminologia Veterinária do ICB/UFMG. Para tanto, foram coletadas as fezes de um bovino naturalmente infectado por *Fasciola hepatica*, em uma fazenda na região de Itajubá, Minas Gerais. Através da técnica de quatro tamizes segundo UENO et al. (1975) com modificações, os ovos de *F. hepatica* foram recuperados e acondicionados em placas de Petri com água desclorada. A água foi trocada diariamente a fim de manter a viabilidade dos ovos. Após um período de 12-14 dias de incubação em estufa a 37°C, a eclosão dos ovos foi estimulada por um foco de luz (lâmpada de 60 watts, mantendo uma distância de 50cm entre a placa com os ovos e a lâmpada) durante seis horas, para a emergência dos miracídios. À luz de um microscópio estereoscópico, os miracídios foram recuperados com auxílio de pipeta Pasteur, contados e utilizados para infecção de caramujos da espécie *L. columella* criados e mantidos no moluscário do Laboratório de Helminologia. A infecção foi feita em placas para cultura de células de 24 poços, sendo que em cada poço foi adicionado 3ml de água desclorada, um molusco e três miracídios de *F. hepatica*. A placa foi tampada e os moluscos foram mantidos na mesma durante 12h. Ao final deste tempo, todos os caramujos foram mantidos em cubas plásticas com água desclorada e alimentados com alface *ad libitum*. Após um período de 60 dias, os caramujos foram macerados em placa de Petri para obtenção de cercárias. Essas, foram mantidas na mesma placa por 12h com água e à temperatura ambiente, tornaram-se metacercárias e foram armazenadas em placa de Petri sem água e à temperatura ambiente por no máximo 30 dias, pois após esse período a maioria delas perdia sua capacidade infectiva (MÜLLER et al. 1999).

3.2. OBTENÇÃO DE ANTÍGENO BRUTO DE *F. hepatica*

Os antígenos totais de *F. hepatica* foram obtidos como descrito por Barçante (2004). Para tanto, vermes adultos de *F. hepatica* recuperados do fígado de bovinos naturalmente infectados foram suspensos em 2ml de tampão fosfato (PBS) e sonicados em ultra-som, em cinco ciclos, na potência de 20W, com intervalos de um minuto de descanso. A solução contendo o material antigênico foi centrifugada (700g a 4°C por 10 min). O sobrenadante foi recolhido e foi adicionado 10µl de coquetel de inibidores de proteases para cada mililitro de sobrenadante (Protease Inhibitor Cocktail[®], Sigma Aldrich, EUA). A concentração total de proteínas nas amostras de antígeno foi estimada pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951) com modificações, usando como padrão, concentrações conhecidas de BSA. O antígeno foi aliquotado em amostras de 200µl e estocado à -20°C para utilização na estimulação de células do baço e testes de ELISA.

3.3. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6J geneticamente deficientes na produção de CCL3 (CCL3^{-/-}). Estes animais foram originalmente produzidos por Cook et al. (1995) e para a realização deste trabalho uma colônia de camundongos CCL3^{-/-} foi estabelecida no Biotério do Laboratório de Esquistossomose do Departamento de Parasitologia – ICB – UFMG. Foram utilizados 51 camundongos de ambos os sexos, livres de quaisquer infecções por helmintos. Mais 52 camundongos C57Bl/6J não deficientes em CCL3 (CCL3^{+/+}) de mesmo sexo e idade, obtidos do CEBIO – UFMG foram utilizados como controle. Todos os animais utilizados nos experimentos foram tratados com Praziquantel (Cestox[®], Merck, BRASIL), em dose única de 75mg/kg/camundongo via oral, e Ivermectina (IVOMEC[®], Merial Saúde Animal LTDA, BRASIL) diluída em água e colocada no bebedouro na

proporção de 0,4ml da droga para 500ml de água durante sete dias (Klement et al., 1996). Exame de fezes, pelo método de sedimentação espontânea e “swab” anal, foram realizados para confirmação da ausência de infecção por helmintos nos animais experimentais. Os camundongos foram infectados 10 dias após o fim do tratamento com Ivomec®.

Este trabalho foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais sob protocolo nº 176/06.

3.4. INFECÇÃO DOS ANIMAIS

Com base nos trabalhos de Brady et al., (1999) e O'Neill et al. (2000), os animais experimentais, exceto os do grupo controle, foram infectados com dez metacercárias de *F. hepatica*. As metacercárias foram suspensas em 100µl de água destilada e administradas por via oral, com auxílio de seringa com agulha de ponta romba (gavage) animal. Essas metacercárias tinham 30 dias de idade.

3.5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O trabalho experimental foi dividido em duas etapas: inicialmente foi realizado um estudo comparativo da cinética da infecção por *F. hepatica* em camundongos C57Bl/6J CCL3^{+/+} e CCL3^{-/-}. Posteriormente, uma avaliação das alterações imunopatológicas observadas nestes animais foi realizada após 20 dias após a infecção (DAI) pelo parasito considerada como fase de migração de formas imaturas pelo fígado do hospedeiro, anterior ao início da mortalidade induzida pela infecção parasitária. Todos os procedimentos

Com objetivo de acompanhar a cinética da infecção por *F. hepatica* em camundongos C57Bl/6J foram infectados 59 camundongos, sendo 29 (21 fêmeas e 8 machos) CCL3^{-/-} e 30 (20 fêmeas e 10 machos) CCL3^{+/+}. Os parâmetros avaliados foram: mortalidade dos animais durante o período da infecção, alterações macroscópicas e recuperação de parasitos durante a necropsia, localização dos parasitos no hospedeiro, além da presença de ovos nas fezes dos animais.

Para avaliação dos aspectos imunológicos e patológicos da fase aguda da infecção se fez necessária a infecção de novos animais, uma vez que os camundongos anteriormente infectados tiveram o fígado totalmente dissecado durante a necropsia. Para a recuperação de parasitos aos 20 dias de infecção, foram infectados 12 machos de C57Bl/6J (seis CCL3^{+/+} e seis CCL3^{-/-}). A utilização de animais de mesmo sexo foi proposital para que possíveis diferenças relacionadas ao sexo não influenciassem erroneamente os resultados. A infiltração celular e as alterações histopatológicas hepáticas, bem como alterações da resposta imunológica dos camundongos infectados por *F. hepatica* foram comparativamente avaliadas em 14 camundongos CCL3^{-/-} e 14 camundongos CCL3^{+/+}, sendo nove infectados por *F. hepatica* e cinco não infectados. Por fim, para avaliação histopatológica foram feitos cortes histológicos do lobo caudal do fígado de dois animais infectados de cada grupo experimental.

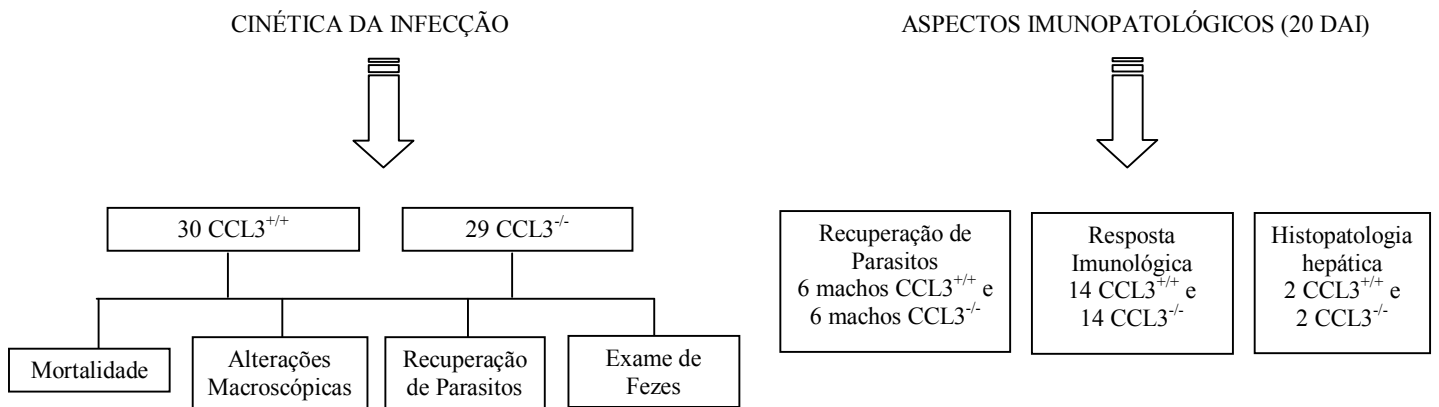


FIGURA 1 – Delineamento Experimental

3.6. CINÉTICA DA INFECÇÃO POR *FASCIOLA HEPATICA* EM CAMUNDONGOS C57Bl/6J

3.6.1. Mortalidade

Durante o período da infecção foi registrada a data do óbito de cada camundongo infectado e estes pontos foram inseridos em um gráfico de curva de sobrevivência. Os camundongos que apresentaram sintomatologia grave como consequência da infecção, foram eutanasiados e esta data foi considerada como o dia da morte do animal.

3.6.2. Necropsia para avaliação das alterações macroscópicas e recuperação de parasitos

Todos os animais infectados que vieram a óbito ou que tiveram que ser eutanasiados foram submetidos à necropsia para avaliação das alterações macroscópicas provocadas pelo parasito bem como recuperação dos mesmos.

A necropsia teve início com a abertura da cavidade abdominal e lavagem da mesma com solução salina 0,9%. O líquido proveniente da lavagem foi examinado com o auxílio de

microscópio estereoscópico nos aumentos de 6X e 12X. Após a lavagem da cavidade abdominal dos animais, todos os órgãos foram retirados e a busca pelo parasito foi realizada nos mesmos, com atenção especial ao fígado e vesícula biliar, já que esses são os órgãos onde os parasitos imaturos e adultos, respectivamente, permanecem alojados. As alterações macroscópicas e a localização de parasitos nos órgãos foram fotografadas.

O fígado foi dissecado com auxílio de estiletes e à luz de microscópio estereoscópico (12X). A cápsula foi removida e o parênquima hepático foi totalmente dissecado, de forma que os parasitos presentes no mesmo fossem recuperados. Os ductos hepáticos foram também inspecionados em busca do parasito que, quando encontrados, foram transferidos para placa de Petri com solução salina 0,9% a fim de que fossem fixados e corados posteriormente.

A parede da vesícula biliar dos camundongos foi rompida com auxílio de pinças e estiletes com o objetivo de encontrar parasitos imaturos e/ou adultos de *F. hepatica*.

Todos os demais órgãos dos camundongos foram dissecados, pois parasitos imaturos ou adultos de *F. hepatica* em migração errática poderiam ser aí encontrados.

3.6.3. Identificação dos Parasitos

Os parasitos encontrados durante a necropsia permaneceram em solução salina 0,9% a uma temperatura de 4°C durante 4 horas e em seguida foram comprimidos entre duas placas de vidro mergulhadas em formol 10% por 24h. Após fixação, os parasitos foram desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, iniciando com álcool 50%, em seguida álcool 70%, 80%, 90% e finalizando com álcool absoluto, sendo que em cada diluição de álcool permaneceram por 50 minutos. Após a desidratação, os parasitos foram transferidos para placas de Petri e foram mantidos em corante Aceto-alúmen de Carmim por 24h. Após este período, foram submetidos novamente ao processo de desidratação descrito acima e mantidos

em creosoto de Faia (Creosoto de Faia[®], VETEC Química Fina LTDA, BRASIL) por um período de 24h. Por fim, os parasitos foram montados em lâminas com Bálsamo do Canadá (Bálsamo do Canadá[®], LabSynth Produtos para Laboratórios LTDA, BRASIL).

3.6.4. Exames de Fezes

As fezes dos animais foram coletadas diretamente da serragem colocada nas gaiolas dos animais duas vezes por semana com intervalos de três dias entre as coletas. Os exames de fezes tiveram início ao 18° DAI e foram realizados a partir de um “pool” de fezes de cada gaiola onde se encontravam separadamente machos e fêmeas de cada grupo. As amostras foram submetidas ao exame dos quatro tamizes segundo UENO et al. (1975) com modificações a fim de detectar a presença de ovos de *F. hepatica*.

3.7. RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDA PELA FASE AGUDA DA INFECÇÃO POR *FASCIOLA HEPATICA* EM CAMUNDONGOS

A infiltração celular, as alterações histopatológicas e a resposta imunológica dos camundongos infectados por *F. hepatica* foram avaliadas através de testes enzimáticos e imunológicos realizados a partir do soro, baço e fígado de camundongos eutanasiados aos 20 DAI. Os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina 150mg/kg/animal (Ketamina Agener[®], Agener União, BRASIL) associado ao cloridrato de xilazina 10mg/kg/animal (Calmium[®], Agener União, BRASIL) sendo o sangue dos animais coletado do plexo braquial com pipetas Pasteur, sem uso de anticoagulantes. Em seguida os animais foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical e o fígado e o baço foram assepticamente removidos e utilizados em ensaios enzimáticos e teste de estimulação *in vitro*, respectivamente.

3.7.1. Contagem Total e Diferencial de Leucócitos

O sangue coletado foi utilizado da seguinte maneira: uma gota do sangue de cada animal foi imediatamente transferida para uma lâmina de microscopia e foi feito esfregaço sanguíneo por extensão. Uma alíquota de 20 μ l deste mesmo sangue foi usada para contagem total de leucócitos e o restante foi acondicionado em tubo para microcentrífuga de 1,5ml para coagulação e colocado em geladeira (4°C) para obtenção de soro. Após a formação e retenção, o coágulo foi removido com auxílio de uma pinça e o material restante foi centrifugado a 700g durante 10 min. e o sobrenadante (soro) foi estocado a -4°C. O soro foi utilizado para quantificação de IgE total.

As alíquotas de 20 μ l de sangue total foram diluídas em 400 μ l de solução de Turk para contagem total de leucócitos. O sangue diluído foi colocado em câmara de Neubauer e com auxílio de microscópio ótico (40X) foi determinado o número de leucócitos/mm³ de sangue de cada camundongo. Para contagem diferencial de leucócitos, foram feitos esfregaços a partir do sangue coletado. Esses esfregaços foram corados pelo método de GIEMSA e a contagem foi realizada com auxílio de microscópio ótico no aumento de 100X. Para cada lâmina examinada foram contados 300 leucócitos que foram diferenciados através de critérios morfológicos em quatro tipos celulares: eosinófilos, neutrófilos, linfócitos e monócitos. A quantidade de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células. Os valores obtidos foram expressos em número de células por mm³ de sangue.

3.7.2. Avaliação da Resposta Humoral

Os níveis de IgE total no soro dos camundongos de diferentes grupos experimentais foi estimado pela técnica de ELISA, utilizando um kit comercialmente disponível e metodologia recomendada pelo fabricante (Mouse IgE ELISA Quantitation Kit, Bethyl Laboratories Inc., EUA). Placas de 96 poços (MaxiSorp[®], NUNC, EUA) foram sensibilizadas com 100µl/poço de anticorpo de captura diluído em “coating buffer” durante 1h em temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem (Tris 50mM, NaCl 0,14M, Tween 20 0,05%, pH 8.0) e o bloqueio foi realizado colocando-se 200µl de solução de bloqueio (Tris 50mM, NaCl 0,14M, Albumina de soro bovino (BSA) 1%, pH 8.0) por 30 min também em temperatura ambiente. Após esse tempo, as placas foram novamente lavadas três vezes com solução de lavagem e foi adicionado 100µl de cada amostra diluída em tampão Tris-NaCl (Tris 50mM, NaCl 0,14M, pH 8.0) por poço na diluição de 1:100. Após 60 min em temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com solução de lavagem e foi acrescentado 100µl anticorpo anti-IgE com peroxidase (HRP) em cada poço da placa. Após uma hora, as placas foram lavadas cinco vezes com solução de lavagem e foi aplicado 100µl do cromógeno ortofenilenodiamina (OPD) e substrato 100µl H₂O₂ em cada poço. Após 30 min em temperatura ambiente, a reação foi interrompida pela adição de 100µl de H₂SO₄ 2M em cada poço. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450nm.

3.7.3. Quantificação de citocinas

Cultura e Estimulação de Células

Os camundongos eutanasiados foram rapidamente mergulhados em álcool 70% e, em capela de fluxo laminar, o baço foi extraído através de uma pequena abertura na parede abdominal e macerado com auxílio de um tamis e um pistilo. O macerado de células resultante foi diluído em meio RPMI de forma que sua concentração final fosse de 1×10^7 células/ml. Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 100µl da suspensão de células em cada poço e essas células foram cultivadas em meio RPMI contendo 5% de soro fetal bovino (BSF - Fetal Bovine Serum[®], Sigma Aldrich, EUA), 2mM de glutamina (L-glutamina[®], Sigma Aldrich, EUA), 100U.I./ml de penicilina K (Penicilina[®], Sigma Aldrich, EUA) e 40µg/ml de gentamicina (Gentamicine[®], Sigma Aldrich, EUA), na presença de antígeno total de *F. hepatica*, na concentração de 50µg/ml. Uma outra alíquota da mesma suspensão de células do baço foi cultivada em placa de 96 poços com o meio anteriormente descrito, porém na ausência de antígeno. O sobrenadante foi recolhido após 48h e armazenado para a quantificação das citocinas IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ e TNF- α (SOUZA et al., 2005).

Ensaio para quantificação de citocinas

A produção de citocinas no sobrenadante de cultura celular obtido do baço foi quantificada pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando-se kits para detecção de IL-4 (Mouse IL-4 DuoSet[®], R&D Systems, EUA), IL-10 (Mouse IL-10 DuoSet[®], R&D Systems, EUA), IL-13 (Mouse IL-13 DuoSet[®], R&D Systems, EUA), IFN- γ (Mouse IFN- γ DuoSet[®], R&D Systems, EUA) e TNF- α (Mouse TNF- α /TNFSF1A DuoSet[®], R&D Systems, EUA), conforme instrução do fabricante. Para cada citocina, placas de 96 poços foram sensibilizadas com

100µl do anticorpo de captura diluído em PBS (NaCl 137mM, KCl 2,7mM, Na₂HPO₄ 8,1mM, KH₂PO₄ 1,5mM, pH 7.4) Entre cada etapa as placas foram lavadas com PBS Tween (PBS + Tween 20 0,1%) três vezes e em seguida foi adicionado a cada poço 200µl de solução de bloqueio, consistindo de PBS contendo 1% de BSA (p/v). Uma alíquota do sobrenadante de cultura de células do baço de cada animal experimental foi diluída em 100µl de PBS (diluição 1:4) contendo 0,1 % BSA e adicionada às placas. Na primeira coluna de placa foram adicionadas amostras contendo concentrações conhecidas da citocina recombinante para a construção de uma curva padrão. As placas foram novamente incubadas durante 12h em geladeira (4°C) e após esse período lavadas, sendo adicionados em seguida a cada poço 100µl do anticorpo de detecção streptavidina conjugado à biotina. Após duas horas a 4°C, as placas foram lavadas três vezes, sendo adicionado a cada poço 100µl de estreptavidina conjugada com peroxidase (Streptavidin - HRP®, Invitrogen Co, EUA) e as mesmas foram incubadas a temperatura ambiente durante 30min. As placas foram novamente lavadas, acrescentou-se 100µl por poço de cromógeno OPD e substrato 100µl H₂O₂ e após um período de incubação de 30min. em temperatura ambiente e ao abrigo da luz a reação foi interrompida adicionando-se 50µl de solução de parada (H₂SO₄ 1M). A leitura foi realizada em comprimento de onda de 492nm. O cálculo da concentração de cada citocina foi estabelecido por interpolação da absorbância de cada amostra na curva padrão.

3.7.4. Infiltração Celular no Fígado dos Camundongos infectados

Atividade de peroxidase de eosinófilo (EPO) e Mieloperoxidase (MPO)

A infiltração e/ou ativação de eosinófilos e neutrófilos no fígado dos camundongos infectados foi estimada por meio de ensaios enzimáticos que mediram a atividade das enzimas

peroxidase de eosinófilos e mieloperoxidase de neutrófilos que indicam indiretamente a atividade e a infiltração local desses dois tipos de célula. Animais não infectados do grupo CCL3^{+/+} e não infectados do grupo CCL3^{-/-} foram utilizados como controle negativo deste experimento.

O fígado de cada um dos animais foi pesado e para cada grama de tecido foi acrescentado 10ml de tampão de extração de citocinas (100ml de PBS, 2,34 g de NaCl, 50µl de Tween 20, 500 mg de BSA, 1,7mg de Phenyl Methyl. Sulfonil Fluoride, 4,48mg de cloreto de benzetônio, 37,2mg EDTA, 20KI de Aprotinina). Esse material foi processado em homogenizador de tecidos (Ultra Turrax DI18[®], IKA Werke GmbH & Co., Alemanha) e o homogenato resultante foi armazenado em tubos de 15ml e utilizado nos ensaios enzimáticos.

A atividade da peroxidase de eosinófilos no fígado dos animais infectados foi medida pela técnica de ELISA sanduíche. Para tanto, 1ml do homogenato de fígado (correspondente a 100mg de tecido) foi acrescido de 1,9ml de PBS. Esse material foi centrifugado (7000g a 4°C por 10min) e o sobrenadante foi descartado. As hemácias presentes no sedimento celular foram lisadas pela adição seqüencial de 1,5ml de solução salina 0,2% seguida de 1,5ml de solução salina 1,6% contendo 5% glicose. A amostra foi submetida a uma nova centrifugação (7000g a 4°C por 10min), o sobrenadante novamente descartado e o sedimento foi ressuspenso em 1,9ml de PBS contendo 5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio – HTAB (Methylammonium bromide[®], Sigma Aldrich, EUA). As amostras foram separadas em alíquotas de 1ml em tubos para microcentrífuga, congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido, centrifugadas novamente (7000g por 10 min.) e o sobrenadante usado para o ensaio enzimático. Em uma placa de 96 poços, adicionou-se 75µl de cada amostra por poço e em dois poços, 75µl de PBS que correspondeu ao branco da reação; em seguida cada poço recebeu 75µl do cromógeno e 100µl de substrato (1,5mM de OPD diluído em tampão Tris-

HCl 0,075mM, acrescido de H₂O₂ 6,6mM). Após um período de 30 min. à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida acrescentando-se 50µl de H₂SO₄ 1M e a intensidade de cor foi estimada através da leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 492 nm (SOUZA et al., 2005).

Para realização do ensaio de MPO foi separada uma alíquota de 1ml do homogenato do fígado de cada uma das amostras e a cada uma delas foi acrescentado 1,9ml de “Buffer” 1 (NaCl 0,1M, Na₃PO₄ 0,02M, Na₂EDTA 0,015M, pH 4,7) a 4°C, que foi em seguida homogeneizado utilizando-se vórtex. Essa amostra foi submetida à centrifugação a -4°C por 10 minutos a 7000g. O sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 1,5ml de NaCl 0,2% a 4°C ao precipitado remanescente e em seguida 1,5ml NaCl 1,6% + glicose 5% a 4°C. A amostra foi novamente homogeneizada em vórtex, em seguida submetida a um novo processo de centrifugação por 10 minutos a 7000g a -4°C. Após desprezar o sobrenadante foi acrescentado 1,9ml de “Buffer” 2 (Na₃PO₄ 0,05M, HTAB 0,5% p/v, pH 6,4), as amostras foram homogeneizadas e duas alíquotas de 1,5ml foram transferidas para tubos de microcentrífuga. Essas amostras foram congeladas e descongeladas três vezes em nitrogênio líquido e em seguida centrifugadas a -4°C por 15 minutos a 7000g. Foi adicionado 25µl das amostras diluídas em “Buffer” 2 na concentração de 1:3 a uma placa de 96 poços, em duplicata e 25 µl de “Buffer” 2 (branco da reação). Adicionou-se 25 µl do cromógeno 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina - TMB (3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina[®], Sigma Aldrich, EUA) e em seguida a placa foi incubada a 37°C por 5 minutos. Por fim, foi acrescentado 100µl de H₂O₂ (0,002%) e a placa foi novamente incubada a 37°C por mais 5 minutos. A reação foi interrompida com a adição de 100µl de H₂SO₄ (1M). A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 450 nm.

3.7.5. *Histopatologia hepática*

Foram infectados com dez metacercárias de *F. hepatica*, dois camundongos CCL3^{-/-} e dois camundongos CCL3^{+/+} para avaliação histopatológica, sendo estes animais eutanasiados ao 20º DAI. Outros cinco camundongos CCL3^{-/-} e cinco CCL3^{+/+} não infectados foram usados como controle. Os cortes histológicos foram realizados a partir do lobo caudal do fígado desses animais. O lobo escolhido foi fixado em solução formalina tamponada 10% (v/v) por 24h. Após este período a peça foi transferida para uma nova solução de formalina tamponada 10% (v/v), permanecendo nesta até o emblocamento em parafina. Os blocos de parafina foram cortados na espessura de 4µm, corados em hematoxilina-eosina (HE) e examinados ao microscópio ótico com auxílio do patologista Prof^o Dr. Geovanni Dantas Cassali do departamento de Patologia do ICB-UFMG.

3.8. *Análise estatística*

Os resultados obtidos foram analisados pelo do programa Prisma 4[®], sendo que para a análise de dois grupos de dados foi utilizado o teste T Student e para comparação de quatro grupos de dados foi feita análise de variância (One Way ANOVA). Valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. CINÉTICA DA INFECÇÃO

4.1.1. Mortalidade

Na ausência de infecção, todos os camundongos C57Bl/6J geneticamente deficientes para produção da quimiocina CCL3 (CCL3^{-/-}) bem como seus respectivos controles não deficientes (CCL3^{+/+}) sobreviveram durante todo o período de avaliação experimental. A infecção com 10 metacercárias de *F. hepatica* resultou em elevada mortalidade de camundongos, tanto em camundongos CCL3^{-/-} como em CCL3^{+/+} (GRÁF. 1). Entretanto, a cinética da sobrevivência foi significativamente diferente entre os camundongos infectados dos dois grupos experimentais, sendo que os camundongos CCL3^{-/-} infectados apresentaram alta taxa de sobrevivência no período entre o 21° e 25° DAI (100%-85,7%) comparado aos camundongos CCL3^{+/+} infectados (72,7%-36,3%). A partir do 25° DAI, houve redução na taxa de mortalidade dos animais CCL3^{+/+}, enquanto que nos animais CCL3^{-/-} a taxa de mortalidade foi bastante elevada entre 25 e 29 DAI. Por volta do 29° DAI, as taxas de sobrevivência dos dois grupos tornam-se muito próximas (42,8% para os camundongos CCL3^{-/-} e 27,2% para os camundongos CCL3^{+/+}) permanecendo assim até o fim da do período de observação (40 DAI), quando todos os animais evoluem para o óbito.

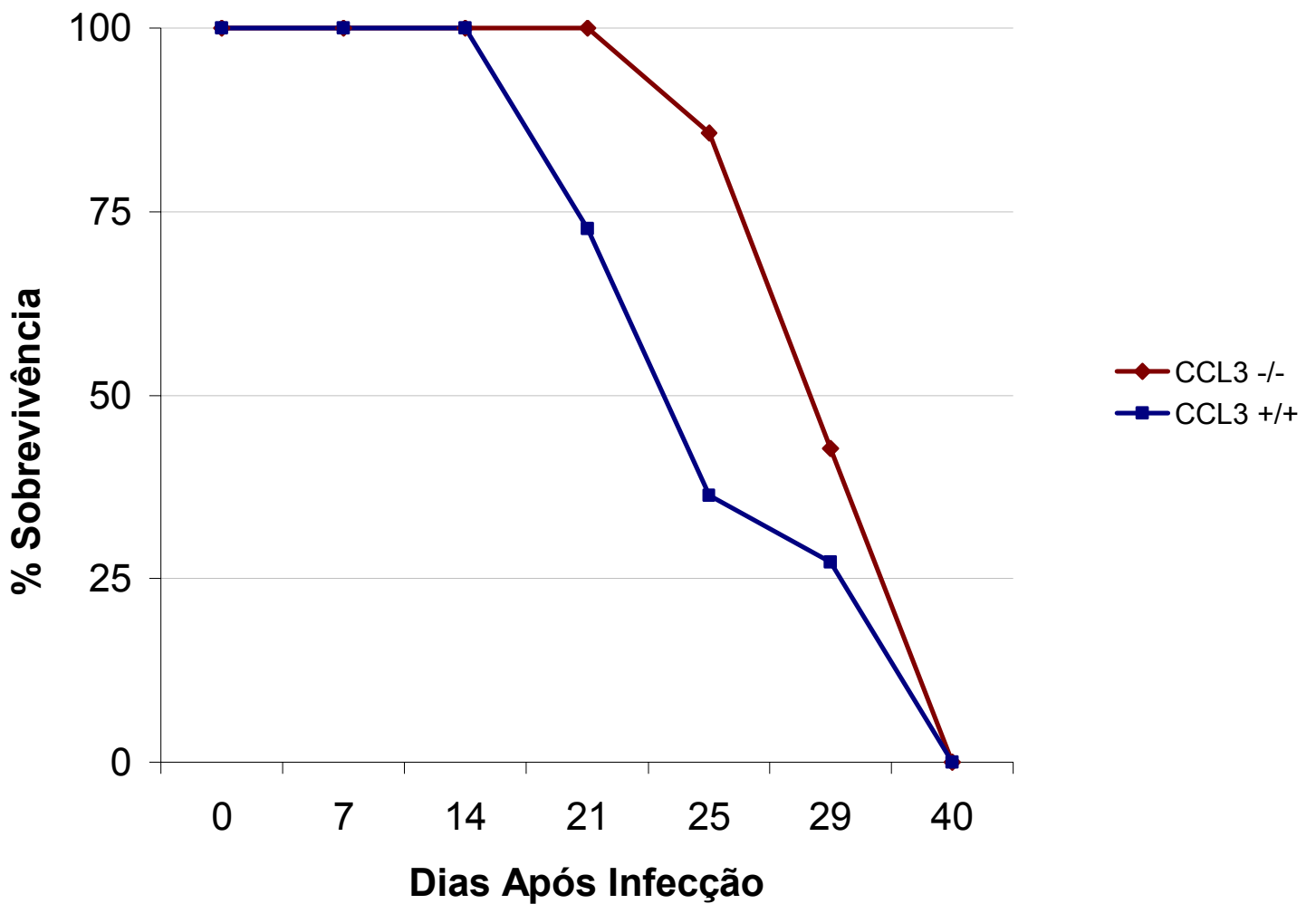


GRÁFICO 1 – Curva de sobrevivência dos camundongos C57Bl/6J infectados com 10 metacercárias de *Fasciola hepatica*. N=59 camundongos (29 CCL3^{-/-} e 30 CCL3^{+/+}).

4.1.2. Alterações Macroscópicas

Na necropsia observou-se presença de sangue na cavidade abdominal em 17,4 % dos camundongos infectados (FIG. 2), sendo que este tipo de alteração foi concomitante ao encontro de pelo menos um parasito nesta cavidade. A presença de sangue na cavidade abdominal foi observada nos animais infectados tanto no grupo $CCL3^{-/-}$ (FIG 2A e B) como no $CCL3^{+/+}$ (FIG 2C e D).

Na grande maioria dos camundongos infectados foi observado aumento no tamanho do baço, sugestivo de hipertrofia. O grupo de animais deficientes em CCL3 apresentou aumento discreto no volume do baço (FIG. 3A) quando comparados aos animais não infectados enquanto que esse mesmo órgão no grupo de animais não deficientes em CCL3 mostrou aumento significativo (FIG. 3B) tanto em relação aos animais não infectados como em relação aos animais deficientes para CCL3.

Todos os animais que vieram a óbito em decorrência da infecção pelo parasito apresentaram alterações hepáticas, sendo possível diferenciar macroscopicamente os dois grupos experimentais pelo tipo de lesão encontrada. No grupo de animais $CCL3^{-/-}$, o fígado mostrava-se levemente aumentado de tamanho, com lesões hepáticas focais, subcapsulares, de coloração esbranquiçada, com tamanho variando entre 1 e 5mm de extensão e cerca de 1 e 3mm de largura, de consistência firme ao corte e que se aprofundavam pelo parênquima hepático (FIG. 4 A e B).

O aumento no volume do fígado dos animais $CCL3^{+/+}$ foi mais acentuado que nos animais $CCL3^{-/-}$; além disso, esses animais apresentavam, em sua maioria, o lobo hepático caudal com extensas áreas lesionadas, possivelmente necro-hemorrágicas, que por vezes atingiam quase a totalidade do lobo. Além do lobo caudal, alguns camundongos apresentaram grande parte do

fígado comprometido pelo mesmo tipo de lesão descrita anteriormente (FIG. 4 C e D).

Além das lesões hepáticas, é importante salientar a observação de alterações na vesícula biliar. Os animais $CCL3^{-/-}$ e $CCL3^{+/+}$ infectados por *F. hepatica* apresentaram alterações na vesícula biliar tais como, aumento no volume do órgão e espessamento da parede do mesmo, todavia essas alterações não foram diferentes entre os dois grupos. Também foi observado tanto nos animais $CCL3^{-/-}$ quanto nos animais $CCL3^{+/+}$ escurecimento do líquido no interior da vesícula biliar (FIG. 5).

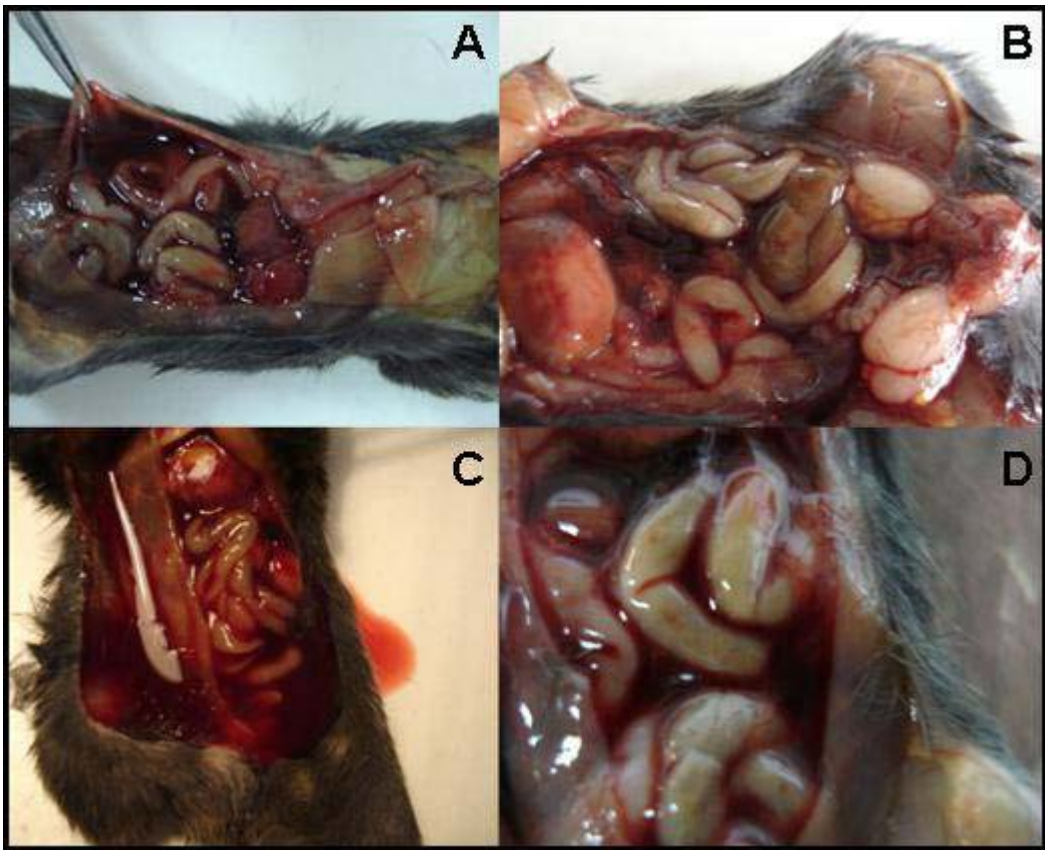


FIGURA 2 – Necropsia de camundongos C57Bl/6J infectados por *Fasciola hepatica*. **A e B** – Camundongo CCL3^{-/-} com a cavidade abdominal repleta de sangue. **C e D** – Camundongo CCL3^{+/+} com cavidade abdominal hemorrágica. Ambos os camundongos vieram a óbito aos 22 DAI.

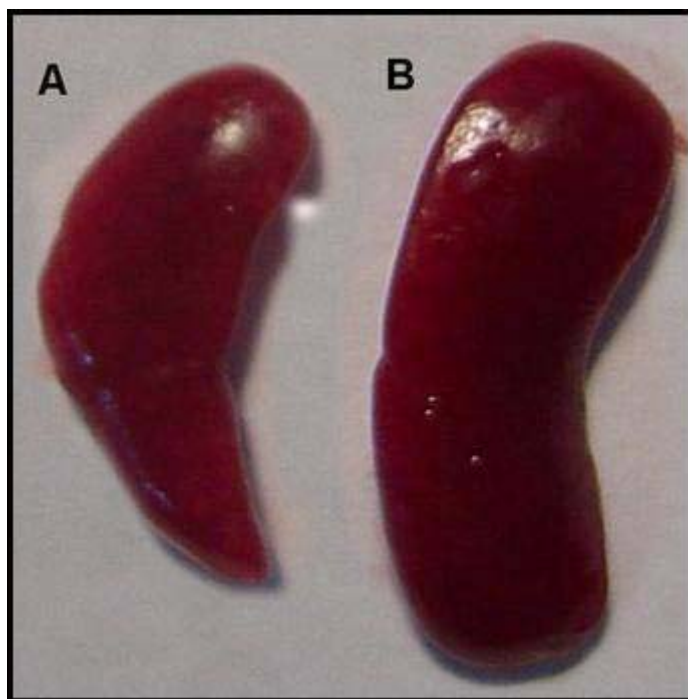


FIGURA 3 –Necropsia de camundongo C57Bl/6J infectado por *Fasciola hepatica*. O baço dos camundongos CCL3^{-/-} (A) apresenta uma discreta hipertrofia, enquanto que os camundongos CCL3^{+/+} (B) apresentam aumento significativo no volume do órgão.

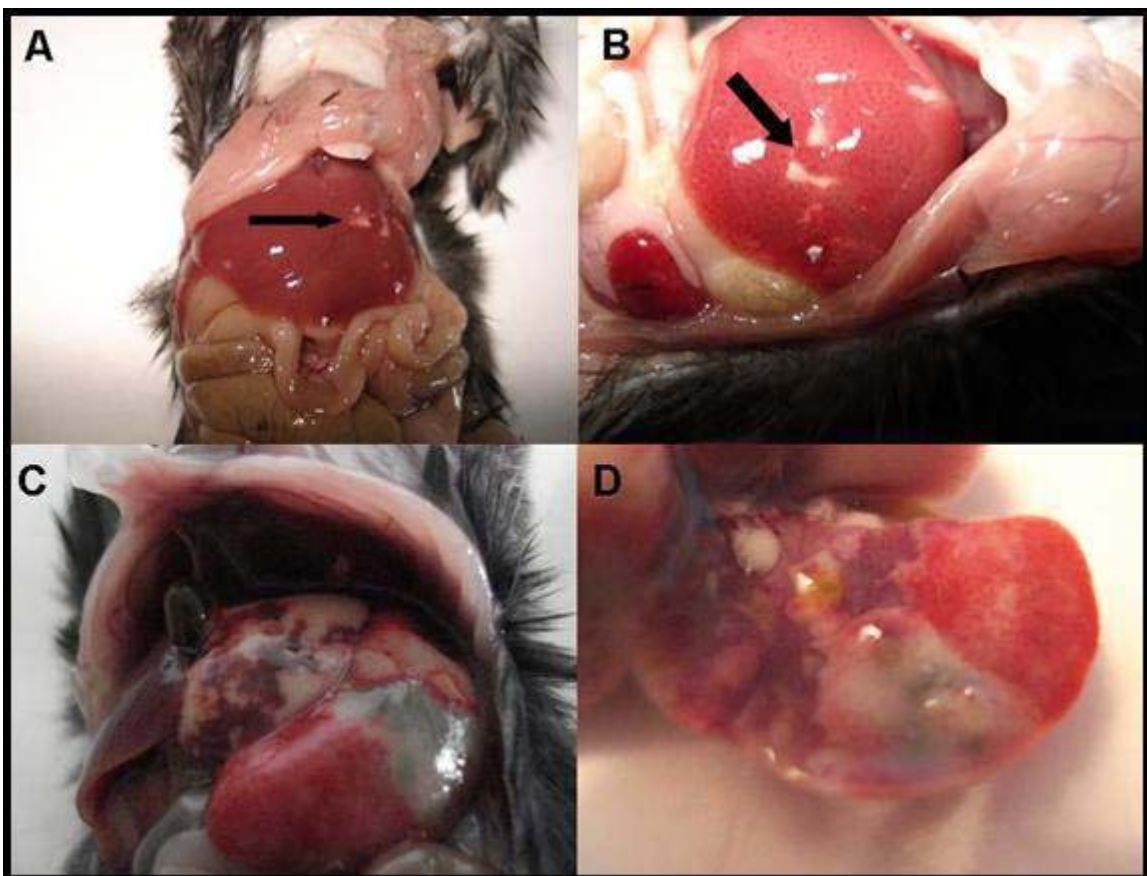


FIGURA 4 – Necropsia de camundongos C57Bl/6J infectados por *Fasciola hepatica* eutanasiados 20 DAI. A e B - Fígado de camundongo CCL3^{-/-}. Lesões focais, subcapsulares e de consistência firme ao corte (seta). C e D - Fígado de camundongo CCL3^{+/+}. Lesões de natureza necro-hemorrágica nos lobos hepáticos.



FIGURA 5 – Necropsia de camundongo C57Bl/6J infectado por *Fasciola hepatica*. Vesícula biliar aumentada de tamanho repleta de líquido enegrecido em seu interior.

4.1.3. Local de Recuperação de Parasitos durante a necropsia

Os parasitos foram encontrados em diferentes locais, sendo a maioria deles (81%) encontrada na cavidade abdominal. É importante ressaltar que os parasitos encontrados na superfície de órgãos como estômago, baço e intestino foram considerados como que encontrados na cavidade abdominal pelo fato de estarem apenas na superfície dos órgãos. Também foram encontrados parasitos no fígado e na vesícula biliar (FIG. 6A e B).

No grupo de animais CCL3^{+/+} foram recuperados ao todo 78 parasitos, sendo 61 na cavidade abdominal (78,2%), 16 no fígado (20,5%) e apenas um parasito na vesícula biliar (1,3%). Já no grupo de animais CCL3^{-/-} foram recuperados da cavidade abdominal 45 parasitos (84,9%), sete no fígado (13,2%) e um parasito na vesícula biliar (1,9%) totalizando 53 parasitos (TAB. 1).

TABELA 1

Número e localização de parasitos de *Fasciola hepatica* recuperados durante a necropsia de camundongos C57Bl/6J infectados com dez metacercárias (n=30 CCL3^{+/+} e 29 CCL3^{-/-}).

Localização dos Parasitos	Número de Parasitos por Grupo	
	CCL3 ^{+/+}	CCL3 ^{-/-}
Cavidade Abdominal	61 (78,2%)	45 (84,9%)
Fígado	16 (20,5%)	7 (13,2%)
Vesícula Biliar	1 (1,3%)	1 (1,9%)
TOTAL	78 (100%)	53 (100%)

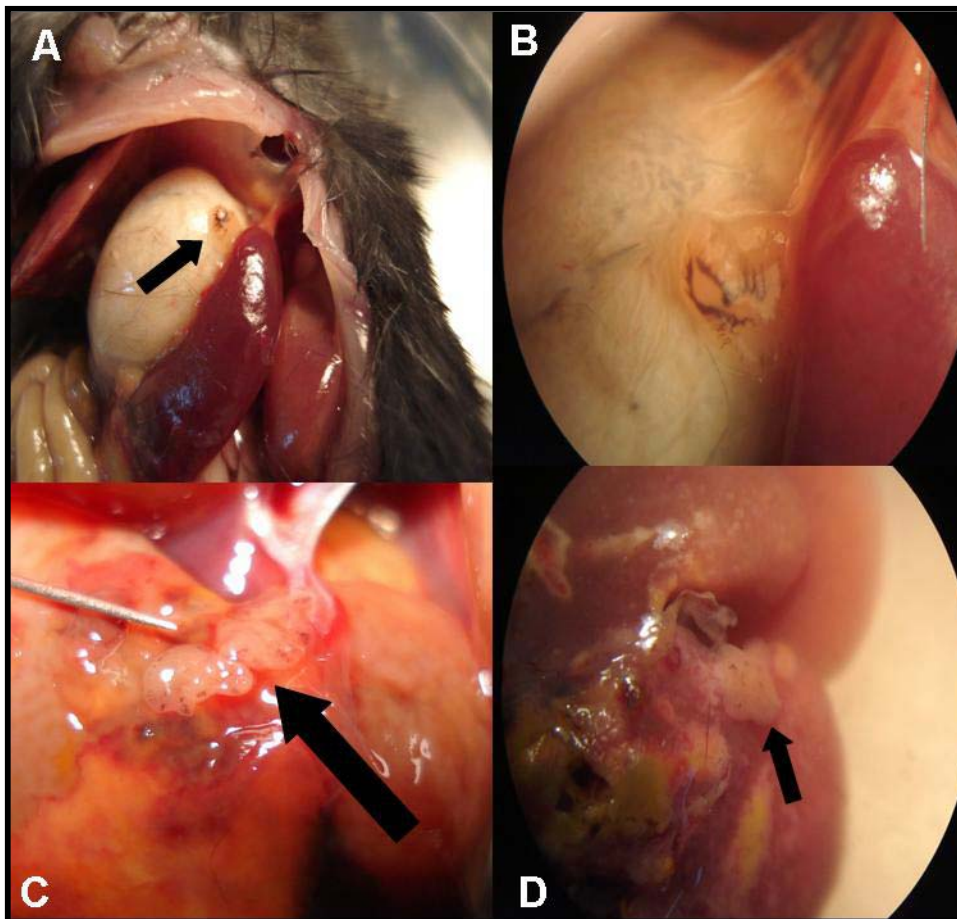


FIGURA 6 – Necropsia de camundongos C57Bl/6J infectados por *Fasciola hepatica*. **A** – Parasito encontrado vivo entre o estômago e o baço do camundongo (seta). **B** – Parasito entre o baço e o estômago em maior detalhe. **C** – Dois parasitos encontrados no interior do parênquima hepático (seta). **D** – Parasito fixado à superfície externa do fígado (seta).

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$) entre os dois grupos de camundongos infectados com relação à localização dos parasitos durante a necropsia. Os parasitos recuperados foram corados e nenhum possuía sistema reprodutor completo, o que significa que todos estavam sexualmente imaturos.

4.1.4. Exames de Fezes

Todos os exames de fezes realizados nos camundongos infectados de ambos os grupos experimentais durante o período da infecção apresentaram resultado negativo.

4.2. CONTAGEM DE PARASITOS E ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA FASE AGUDA DA INFECÇÃO POR FASCIOLA HEPATICA EM CAMUNDONGOS C57BL/6J

Como a mortalidade dos animais infectados inicia-se 20 dias após a infecção, os dados relativos à contagem de parasitos, infiltração celular, produção de citocinas e análise histopatológica foram realizadas com camundongos CCL3^{-/-} e CCL3^{+/+} aos 20 DAI. O GRÁF. 2 mostra que a média de parasitos imaturos de *F. hepatica* recuperados em camundongos CCL3^{-/-} ($1,9 \pm 0,4$ parasitos por camundongo) foi estatisticamente inferior ($p=0,0193$) a média de parasitos recuperados em camundongos CCL3^{+/+} ($3,6 \pm 0,5$ parasitos por camundongo).

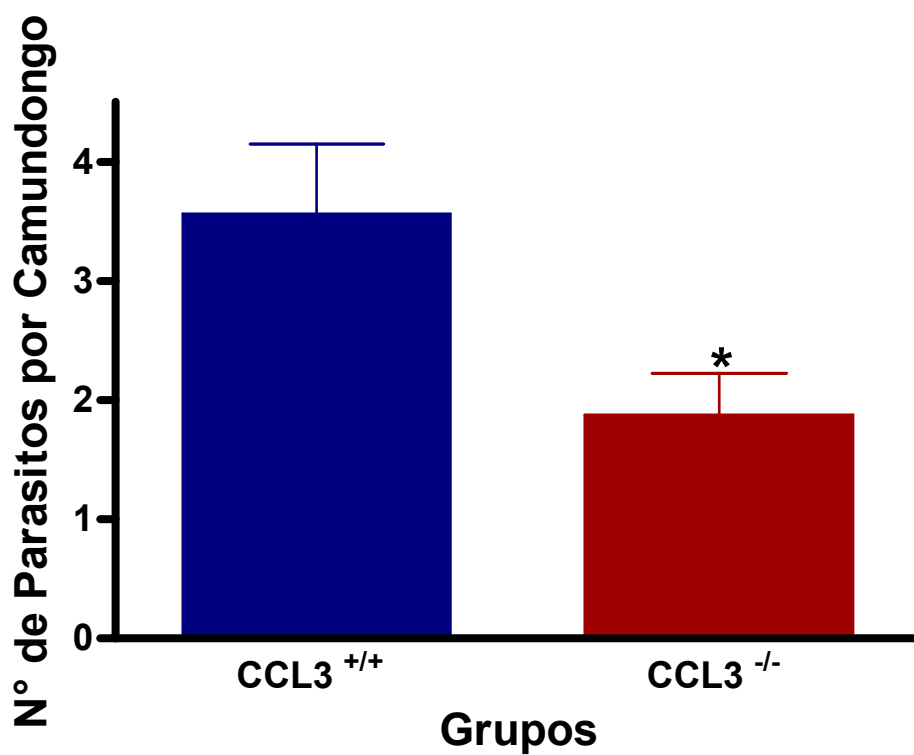


GRÁFICO 2 – Número médio de *Fasciola hepatica* recuperadas em camundongos C57Bl/6J geneticamente deficientes para produção de CCL3 (CCL3^{-/-}) e em camundongos não deficientes (CCL3^{+/+}). Cada barra representa o número médio ± desvio padrão (n=6 camundongos por grupo) de parasitos recuperados de camundongos 20 dias após a infecção com 10 metacercárias/camundongo. * representa um valor $p=0,0193$.

4.2.1. Concentração de citocinas

Os níveis de TNF- α tanto em camundongos não infectados como em camundongos infectados foi abaixo do detectável pelo teste, indicando que não há produção significativa desta citocina pelas células do baço quando estimuladas por antígeno de *F. hepatica*.

A quantificação das citocinas no sobrenadante de células do baço estimuladas *in vitro* com antígeno de *F. hepatica* revelou que os camundongos infectados pelo parasito, sejam eles deficientes em CCL3 ou não, produzem níveis de IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- γ estatisticamente significativos ($p < 0,05$) em comparação aos animais não infectados do mesmo grupo (GRÁF. 3, 4 e 5).

Os animais deficientes em CCL3 mostraram menor produção das citocinas IL-4 ($p = 0,009$) e IL-13 ($p = 0,0035$) (GRÁF. 3), ambas relacionadas ao perfil de resposta do tipo Th2, em relação aos animais capazes de produzir CCL3.

A produção de IL-10 em camundongos CCL3^{-/-} foi estatisticamente menor ($p = 0,0097$) que a produção dessa citocina em camundongos CCL3^{+/+} (GRÁF. 4).

Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) na produção de IFN- γ entre os camundongos infectados deficientes em CCL3 e os camundongos não deficientes (GRÁF. 5).

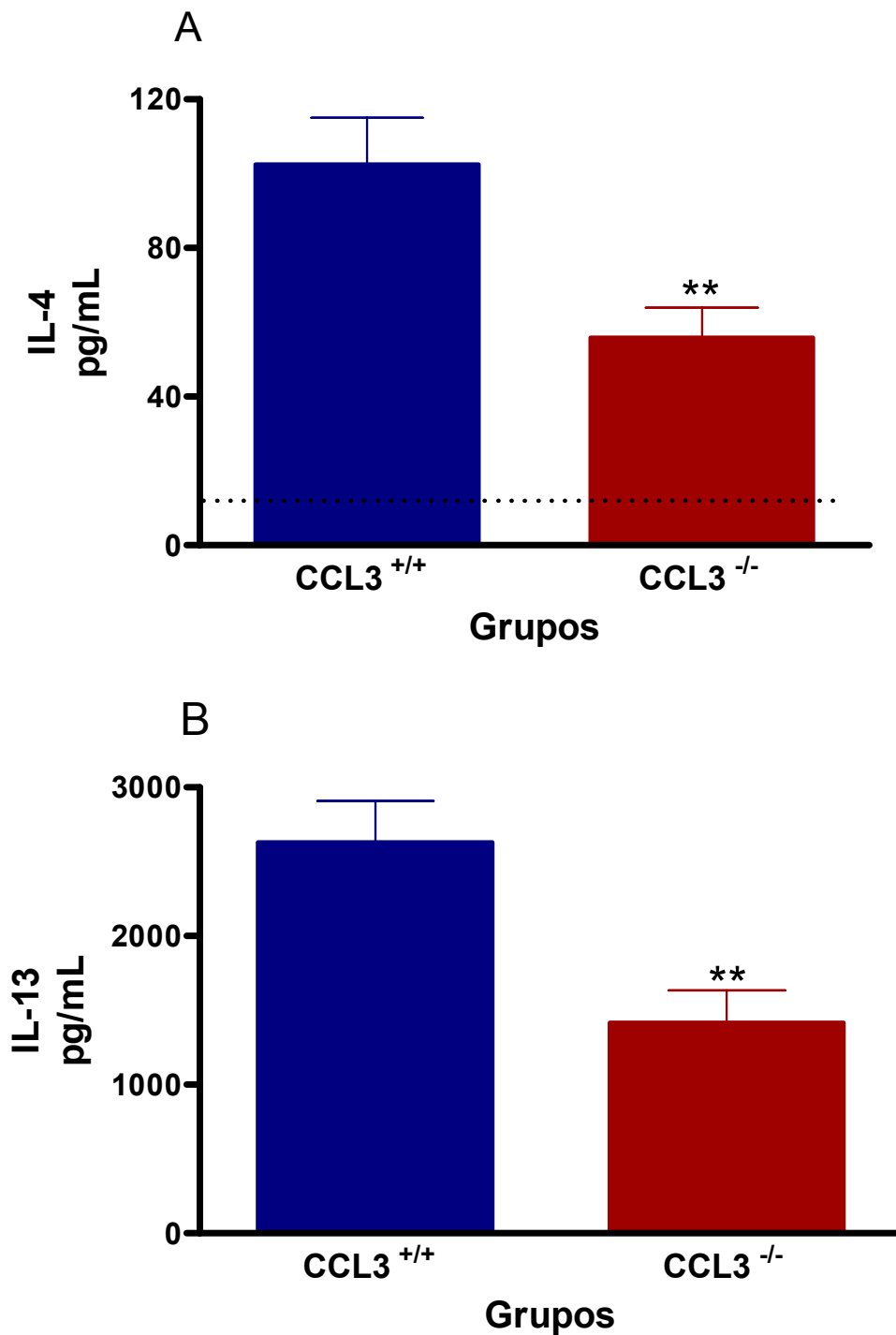


GRÁFICO 3 – Produção de citocinas em células de baço oriundas de camundongos C57Bl/6J infectados por *Fasciola hepatica* aos 20 DAI e estimuladas *in vitro* com antígeno do parasito. A – Produção de IL-4, onde ** representa um valor $p=0,009$. B – Produção de IL-13, onde ** representa valor $p=0,0035$. Cada barra representa o valor médio (pg/ml) \pm desvio padrão (n=9 camundongos infectados por grupo e 5 camundongos não infectados por grupo (controle)) da produção da citocina por grupo de camundongos. A média dos níveis de produção de IL-4 dos camundongos CCL3^{+/+} e CCL3^{-/-} não infectados está representada pela linha tracejada (- - -). Não foi detectada produção de IL-13 em camundongos não infectados.

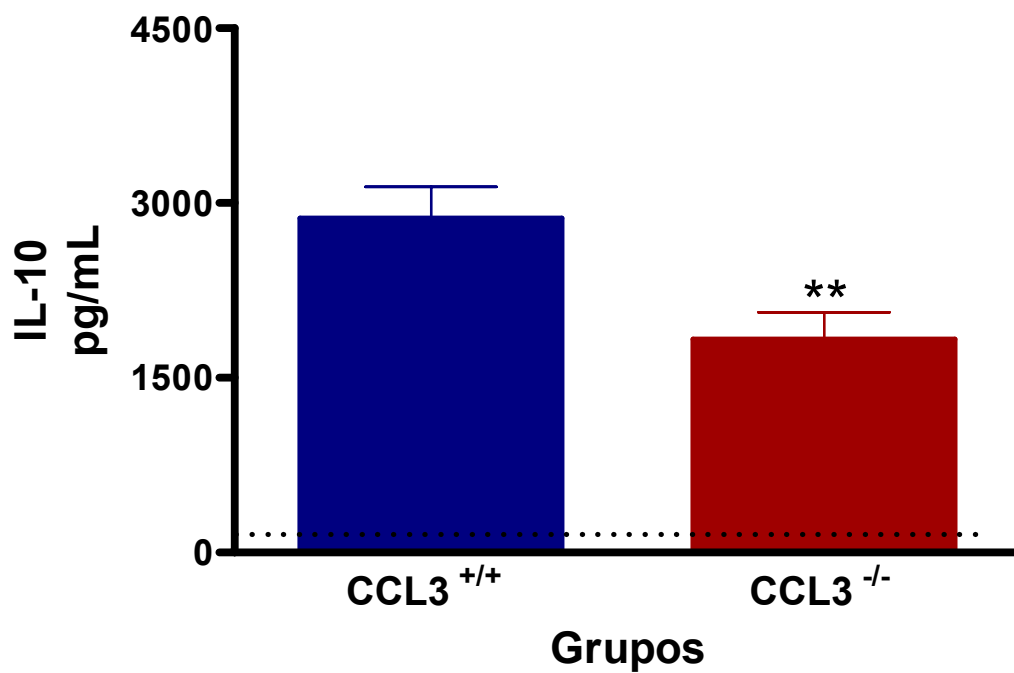


GRÁFICO 4 – Produção de IL-10 em células de baço oriundas de camundongos C57Bl/6J infectados por *Fasciola hepatica* aos 20 DAI e estimuladas *in vitro* com antígeno do parasito. Cada barra representa o valor médio (pg/ml) \pm desvio padrão (n=9 camundongos infectados por grupo e 5 camundongos não infectados por grupo (controle)) da produção de IL-10 por grupo de camundongos. A linha tracejada representa a produção de IL-10 dos camundongos CCL3^{+/+} não infectados. A produção de IL-10 dos animais do grupo CCL3^{-/-} não infectados foi abaixo do nível de detecção do teste realizado. ** representa valor $p=0,0097$

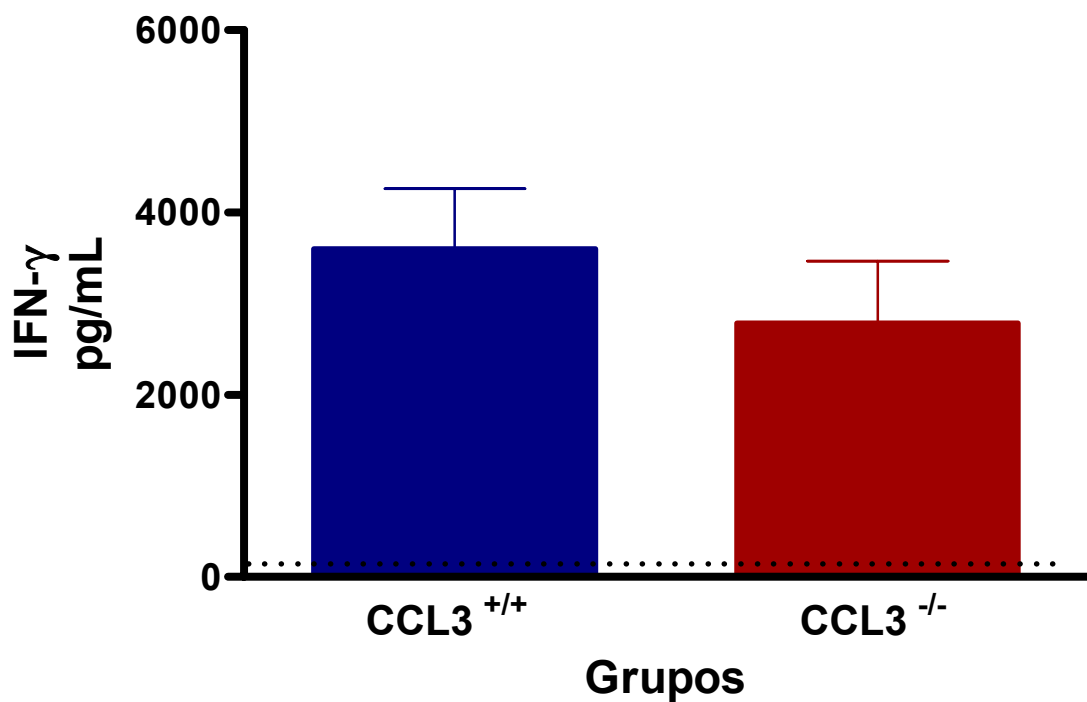


GRÁFICO 5 – Produção de IFN- γ em células de baço oriundas de camundongos C57Bl/6J infectados por *Fasciola hepatica* aos 20 DAI e estimuladas *in vitro* com antígeno do parasito. Cada barra representa o valor médio (pg/ml) \pm desvio padrão (n=9 camundongos infectados por grupo e 5 camundongos não infectados por grupo (controle)) da produção de IFN- γ por grupo de camundongos. A produção de IFN- γ dos camundongos não infectados de ambos os grupos foi abaixo do nível de detecção do teste realizado.

4.2.2. Avaliação da Resposta Humoral

Não houve diferença estaticamente significativa ($p > 0,05$) na produção de IgE total entre os camundongos CCL3^{+/+} e os camundongos CCL3^{-/-} infectados com *F. hepatica*.

4.2.3. Contagem Total e Diferencial de Leucócitos

Os camundongos infectados de ambos os grupos experimentais apresentaram aumento no número total de leucócitos por mm³ de sangue quando comparados aos seus respectivos controles. Todavia não houve diferença entre o número total de leucócitos dos dois grupos infectados (GRÁF. 6A).

Na contagem diferencial de leucócitos foi observado aumento de eosinófilos (GRÁF. 6B), neutrófilos (segmentados e bastonetes) (GRÁF. 6C), linfócitos (GRÁF. 6D) e monócitos (GRÁF. 6E) nos animais infectados dos dois grupos experimentais, porém não foi demonstrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de camundongos CCL3^{-/-} e CCL3^{+/+}, para estes parâmetros ($p < 0,005$, teste T).

4.2.4. Análise da Composição do Infiltrado Celular nos Locais Lesionados Pelo Parasito

Os ensaios enzimáticos demonstraram que em camundongos CCL3^{-/-} a atividade de eosinófilos é menor ($p = 0,0382$) que em camundongos CCL3^{+/+} (GRÁF. 7A). Também observou-se que a atividade de neutrófilos é menor ($p = 0,0001$) no fígado dos camundongos CCL3^{-/-} que no fígado dos camundongos CCL3^{+/+} (GRÁF. 7B).

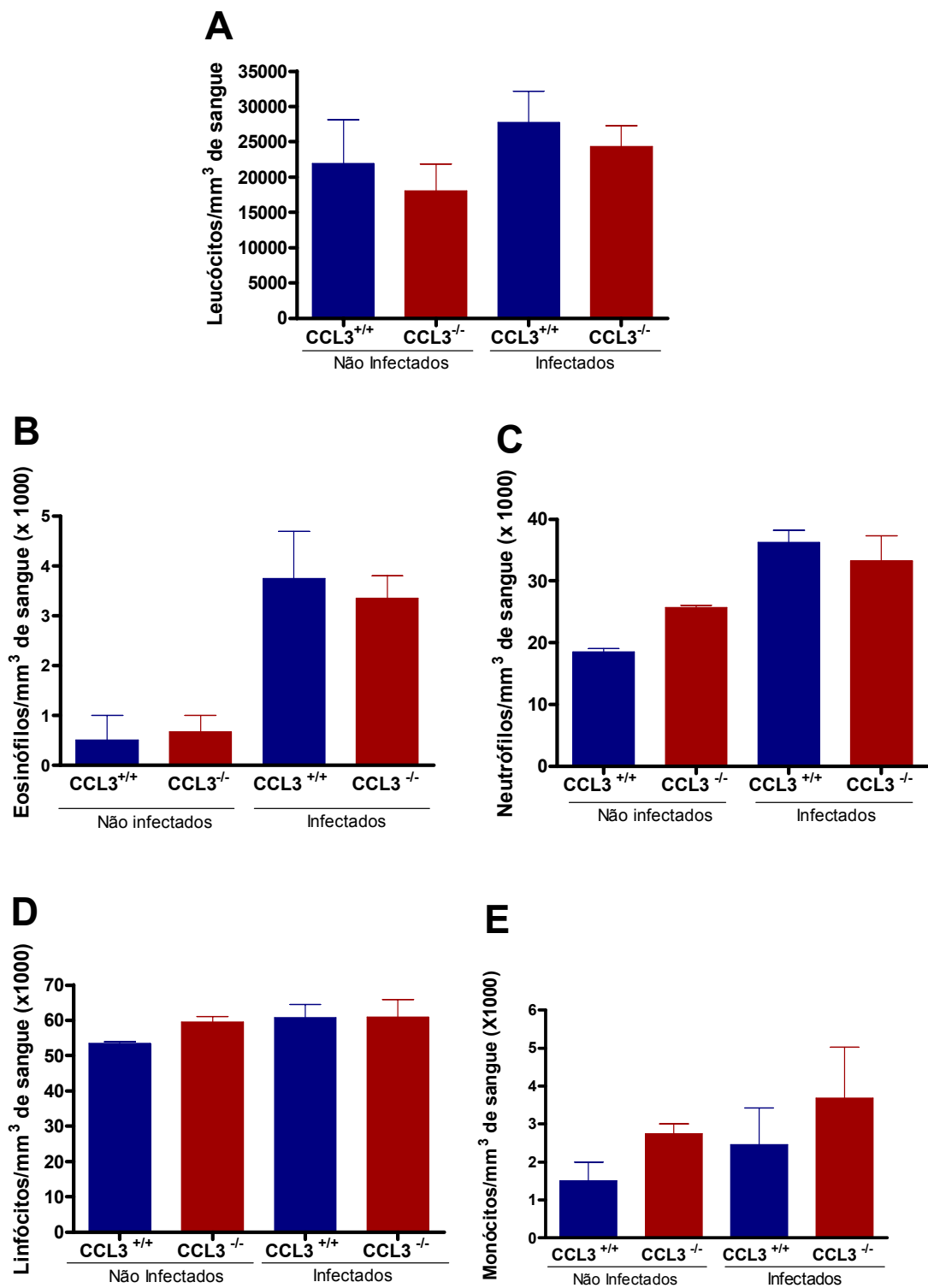


GRÁFICO 6 - Contagem total e diferencial de leucócitos de camundongos C57Bl/6J infectados por *Fasciola hepatica* 20 DAI. A – Contagem total de leucócitos. B – Contagem diferencial de eosinófilos. C – Contagem diferencial de neutrófilos (segmentados e bastonetes). D – Contagem diferencial de linfócitos. E - Contagem diferencial de monócitos. (n=9 camundongos infectados por grupo e 5 camundongos não infectados por grupo (controle))

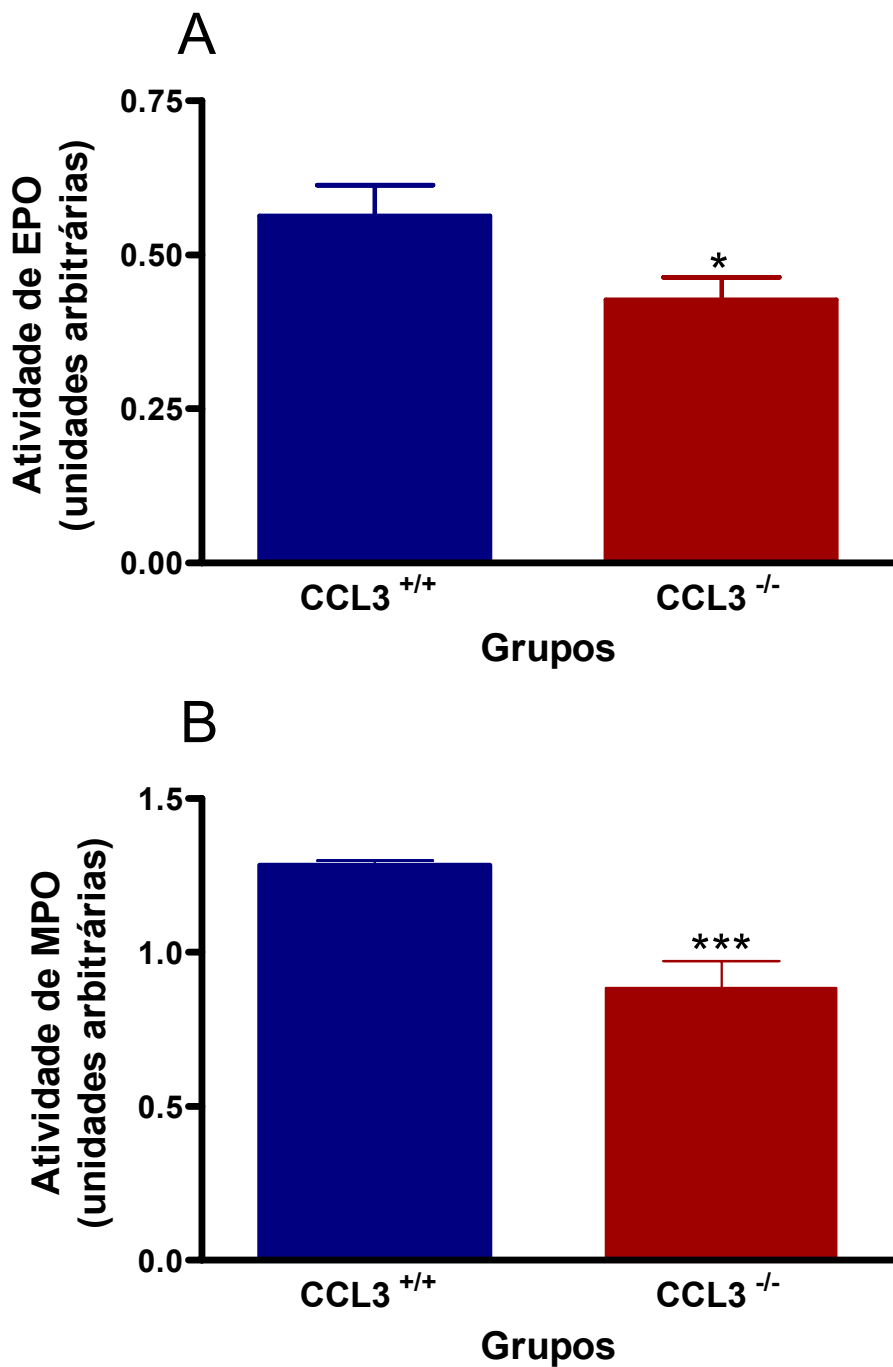


Gráfico 7 - Atividade enzimática no fígado de camundongos C57Bl/6J infectados por *Fasciola hepatica* aos 20 DAI. Cada barra representa o valor médio \pm desvio padrão (n=9 camundongos infectados por grupo e 5 camundongos não infectados por grupo (controle)) da atividade de cada enzima. A - Atividade da peroxidase de eosinófilos (EPO). * representa valor $p=0,0382$. B - Atividade da mieloperoxidase de neutrófilos (MPO). *** representa valor $p=0,0001$.

4.2.5. Histopatologia Hepática

Após a coloração e análise microscópica dos cortes histológicos hepáticos dos camundongos infectados por *F. hepatica* foi possível constatar a diferença no tipo de lesão encontrada nos dois grupos de animais. Os animais CCL3^{-/-} (FIG. 7) apresentaram uma área lesionada inferior quando comparada aos animais CCL3^{+/+} (FIG. 8). Ainda nos mesmos cortes histológicos foi possível confirmar a característica focal das lesões nos camundongos deficientes em CCL3^{-/-} (FIG. 7).

Em ambos os grupos de camundongos foi possível visualizar a presença de infiltrado de células polimorfonucleares em torno dos locais lesionados, porém este era mais significativo nos camundongos CCL3^{+/+} (FIG. 9). Eosinófilos estão presentes no infiltrado celular dos dois grupos experimentais. Também foram observadas áreas de necrose coagulativa adjacentes às áreas de infiltração celular, sendo as áreas de necrose encontradas nos camundongos CCL3^{-/-} (FIG. 9A) eram significativamente menores que aquelas vistas em camundongos CCL3^{+/+} (FIG. 9B).

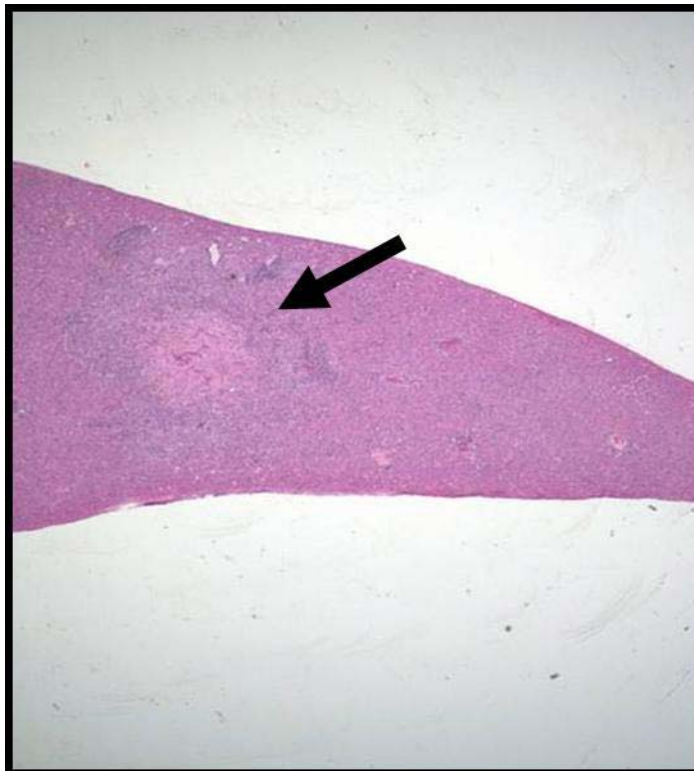


FIGURA 7 – Corte histológico de fígado de camundongo CCL3^{-/-} infectado por *Fasciola hepatica* corado por HE (Aumento de 10X). Lesões focais (seta), ocupando uma pequena parte do local atingido.

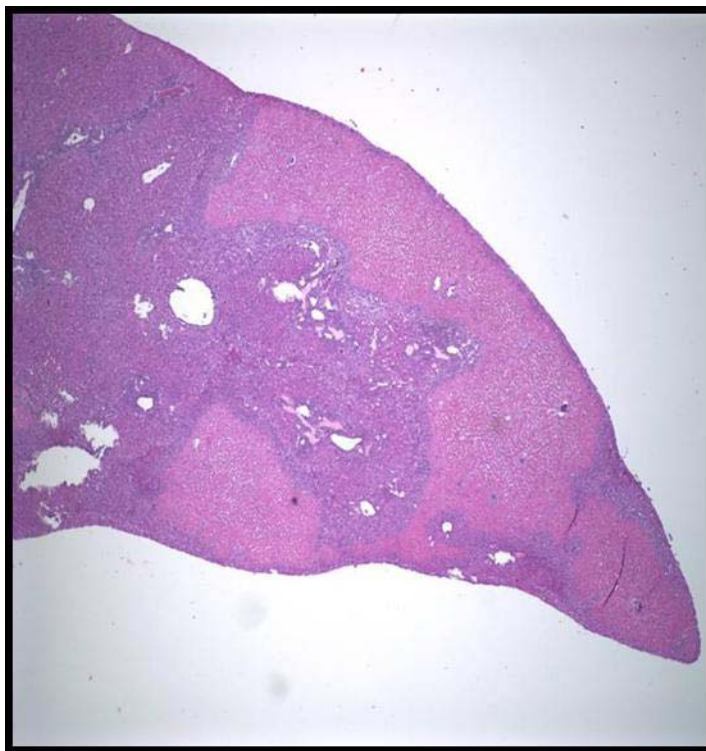


FIGURA 8 – Corte histológico de fígado de camundongo CCL3^{+/+} infectado por *F. hepatica* corado por HE (Aumento de 10X). Nota-se lesões extensas provocadas pela migração do parasito.

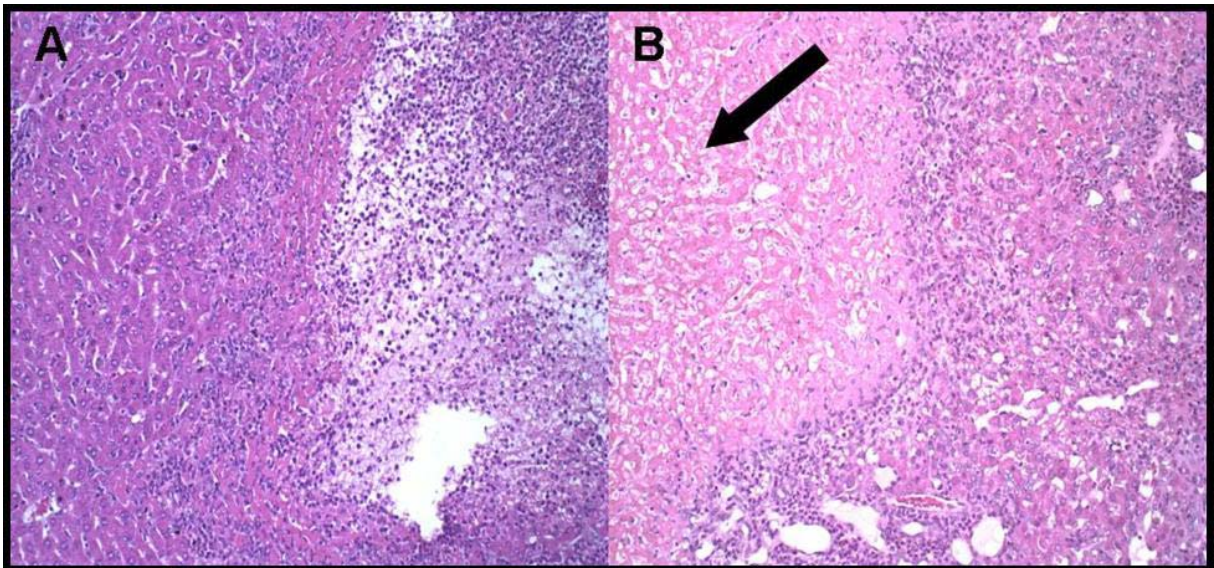


FIGURA 9 – Infiltrado de polimorfonucleares na região lesionada do fígado de camundongos C57Bl/6J infectados por *F. hepatica*. A – Camundongo CCL3^{-/-}. B – Camundongo CCL3^{+/+}. Área de necrose coagulativa (seta) (Aumento de 20X).

5. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados nesta dissertação demonstram que a infecção de camundongos C57Bl/6J, geneticamente deficientes para produção de CCL3 ou não deficientes, com 10 metacercárias de *F. hepatica* resulta em uma alta taxa de mortalidade do hospedeiro, concordando com a observação de Dawes (1963). Camundongos da linhagem BALB/c infectados por *F. hepatica* também apresentam elevada mortalidade, entretanto nesta linhagem de camundongos a mortalidade foi observada após cinco semanas da infecção (MARCET et al, 2002; MARTINEZ-FERNADEZ et al, 2004; LÓPEZ-ABÁN et al 2007). É importante ressaltar que a infecção por *F. hepatica* resultou em elevada mortalidade tanto em camundongos BALB/c infectados com cinco metacercárias (MARTINEZ-FERNADEZ et al., 2004; LÓPEZ-ABÁN et al., 2007) como em camundongos BALB/c infectados com 15 metacercárias, os quais vinham a óbito pouco antes de completarem cinco semanas de infecção (MARCET et al., 2002). Para outros roedores, como *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus*, a infecção com 20 metacercárias de *F. hepatica* não resulta em mortalidade do hospedeiro em condições experimentais (VALERO et al, 1998).

Neste trabalho também foi demonstrado que *F. hepatica* não atinge a maturidade sexual durante a infecção em camundongos C57Bl/6J ou em animais geneticamente deficientes na produção de CCL3. Este resultado foi confirmado pela observação morfológica dos espécimes recuperados durante a necropsia realizada em diferentes momentos da infecção, bem como pela ausência de ovos do parasito nos exames de fezes realizados durante o período experimental da infecção. Não foram encontrados na literatura relatos sobre a eliminação de ovos de *F. hepatica* nas fezes de camundongos C57Bl/6J ou BALB/c infectados pelo parasito. Entretanto, Coelho (2001) observou nas fezes de camundongos da linhagem AKRJ infectados

com três metacercárias por animal, a presença de ovos de *F. hepatica* a partir de 27 dias após a infecção (DAI), indicando que nesta linhagem de camundongo o parasito atingiu maturidade sexual. Em nossos resultados muitos camundongos C57Bl/6J morrem antes de 27 DAI, podendo justificar em parte a ausência de parasitos maduros durante a necropsia destes animais. Entretanto, mesmo nos camundongos C57Bl/6J que foram necropsiados após 29 DAI não foi encontrado *F. hepatica* sexualmente madura, sugerindo a existência de diferenças na linhagem AKRJ que possa suportar o desenvolvimento do parasito (BICALHO, 1993). Em *R. rattus* experimentalmente infectados com *F. hepatica* é possível constatar o desenvolvimento de parasitos adultos bem como a presença de ovos viáveis do mesmo a partir de 12 semanas após a infecção (VALERO et al, 2002), indicando que camundongos podem não ser um bom hospedeiro para estudos de desenvolvimento de *F. hepatica* quando comparados a ratos.

Durante a necropsia dos camundongos C57Bl/6J infectados, tanto em CCL3^{-/-} como CCL3^{+/+}, a maioria dos parasitos (81%) foi recuperada na cavidade abdominal do hospedeiro, sendo também encontrados parasitos no parênquima hepático. Entretanto, a taxa de recuperação de parasitos na vesícula biliar foi baixa, sendo que apenas 1,5% do total dos parasitos recuperados em necropsia atingiram este órgão. Podemos concluir também que a produção de CCL3 pelo hospedeiro não influencia diretamente o processo de migração e desenvolvimento do parasito, uma vez que não houve diferença estatisticamente significativa entre a localização de parasitos de um grupo de camundongos para outro.

Em *R. rattus* necropsiados aos 30, 40, 50, 75, 100 e 150 DAI não foi relatado o encontro de parasitos na cavidade abdominal, aproximadamente 83% dos parasitos foram recuperados dos ductos biliares e 12,5% foram encontrados no parênquima hepático (VALERO et al., 1998). Terasaki et al. (2003) relataram a recuperação de parasitos de *F. hepatica* dos ductos biliares de *Tscherskia triton* necropsiados aos 40, 50, 60 e 90 DAI, enquanto Behm & Sangster (1999) relataram a presença de parasitos adultos nos ductos biliares de coelhos cinco semanas após a

infecção. É possível que a morte precoce dos camundongos C57Bl/6J infectados, aliada as características fisiológicas e anatômicas deste hospedeiro, tenha impossibilitado que a maioria dos parasitos pudesse alcançar os ductos biliares e atingir a fase adulta. A recuperação de *F. hepatica* na cavidade abdominal dos camundongos infectados foi associada à presença freqüente de hemorragia abdominal intensa nos animais necropsiados (FIG. 2). Essa observação está em acordo com o trabalho de Dawes (1963b), que relatada a morte precoce de camundongos C57Bl infectados por *F. hepatica* associada a um quadro de hemorragia abdominal. Outros autores também sugerem que o quadro hemorrágico da fase aguda da fasciolose pode ser consequência do rompimento de vasos sangüíneos durante a migração do parasito pelo parênquima hepático e pela entrada e saída constante do mesmo no fígado durante a fase aguda da infecção (DAWES, 1963a, b; BEHM & SANGSTER, 1999). Também podemos especular que o grande número de parasitos encontrados na cavidade abdominal dos camundongos necropsiados neste estudo seja consequência da saída do parasito do parênquima hepático do hospedeiro após a morte do animal. O abandono do fígado pelos parasitos após a morte dos animais pode ser explicado pelo fato de que este órgão é muito rico em enzimas do tipo hidrolases que desencadeiam rapidamente o processo de autólise, tornando o fígado um ambiente inóspito para o parasito (PEREIRA, 2000).

Apesar da elevada mortalidade em camundongos C57Bl/6J infectados por *F. hepatica*, foi possível demonstrar que a mortalidade induzida pelo parasito aconteceu mais precocemente em camundongos CCL3^{+/+} do que os camundongos CCL3^{-/-}. Essa diferença na cinética da mortalidade pode estar relacionada com a quantidade de parasitos recuperados dos camundongos, uma vez que, aos 20 DAI, o número de parasitos recuperados dos camundongos CCL3^{+/+} foi estatisticamente superior ao dos CCL3^{-/-}. Além da menor quantidade de parasitos, a extensão das lesões hepáticas e a infiltração celular observada no fígado dos camundongos CCL3^{-/-} infectados por *F. hepatica* foi muito menor que em

camundongos CCL3^{+/+}. Esses resultados assemelham-se aos resultados encontrados por Souza et al. (2005) utilizando como modelo experimental a infecção de camundongos CCL3^{+/+} e CCL3^{-/-} com um outro trematódeo, o *Schistosoma mansoni*. Neste trabalho, Souza et al. (2005) relataram que na fase crônica da infecção foi recuperado um número estatisticamente superior de vermes adultos de *S. mansoni* no grupo de camundongos CCL3^{+/+} comparado com o grupo de camundongos CCL3^{-/-}. Além da diferença na quantidade de vermes, também foi observado que a infecção por *S. mansoni* em camundongos CCL3^{-/-} resultou em menor patologia, sendo relatado uma menor área de granuloma hepático e deposição de colágeno. Assim, semelhante ao observado no modelo de infecção por *S. mansoni*, a ausência da produção de CCL3 durante a infecção por *F. hepatica* resultou em menor quantidade de parasitos recuperados e menor lesão hepática, que levou a uma sobrevivência prolongada dos camundongos infectados deste grupo experimental.

Com o intuito de explorar possíveis mecanismos pelos quais CCL3 influencia a sobrevivência dos parasitos neste modelo experimental, a indução da resposta imunológica foi comparativamente examinada nos camundongos C57Bl/6J CCL3^{-/-} e CCL3^{+/+} infectados por *F. hepatica*. As células retiradas do baço de todos os camundongos infectados e re-estimulados com antígenos do parasito produziram níveis estatisticamente elevados das citocinas IL-4, IL-13, IL-10 e IFN- γ comparados aos animais não infectados. A produção de citocinas de perfil Th2 (IL-4 e IL-13), bem como de perfil Th1 (IFN- γ) e citocina anti-inflamatória (IL-10) caracteriza uma resposta imunológica mista, sem a polarização para o perfil Th2. O predomínio da resposta Th2 durante a infecção por *F. hepatica* tem sido descrita em bovinos, ovinos e algumas linhagens de camundongos (MULCAHY et al. 1999; RODRIGUEZ-OSORIO et al. 1999; O'NEILL et al., 2000). Em ratos experimentalmente infectados por *F. hepatica* também ocorre polarização da resposta Th2, com elevação da produção de IL-4 e IL-10 e diminuição da produção de IFN- γ aos 14DAI (CERVI et al,

2001). Uma comparação do perfil da resposta imunológica contra *F. hepatica* em três diferentes linhagens de camundongos, BALB/c, 129SV/ES e C57Bl demonstrou que um predomínio de resposta do tipo Th2, caracterizada por alta produção de IL-4 e IL-5 e baixos níveis de IFN- γ , é frequentemente observado em camundongos infectados, especialmente nas linhagens BALB/c e 129SV/ES (O'NEILL et al., 2000). Entretanto, estes autores também relatam que a infecção por *F. hepatica* em camundongos C57Bl/6J induz produção significativa de IFN- γ , dependendo da dose de metacercárias utilizadas na infecção. Os camundongos infectados com cinco metacercárias demonstraram um perfil misto de produção de citocinas, com produção simultânea de IL-4 e IFN- γ , enquanto que animais infectados com 15 metacercárias apresentaram produção de citocinas com perfil tipicamente Th2. Behm & Sangster (1999) também relatam que a resposta imunológica em camundongos C57Bl/6J infectados por *F. hepatica* apresenta um perfil misto, com produção de IL-4 e IFN- γ . Ainda no mesmo trabalho os autores afirmam que o perfil de resposta apresentado pelos camundongos C57Bl confere alguma resistência imunológica à infecção quando comparado ao perfil apresentado pelas outras linhagens de camundongo. Resultados semelhantes foram encontrados nessa dissertação, onde camundongos C57Bl/6 geneticamente deficientes na produção de CCL3 ou não deficientes produziram altos níveis de IFN- γ , mas também elevação significativa de IL-4 e IL-13.

Apesar da infecção com 10 metacercárias de *F. hepatica* ter induzido de uma resposta imunológica de perfil misto em camundongos C57Bl/6J CCL3^{+/+} bem como em C57Bl/6J CCL3^{-/-}, os camundongos deficientes produziram quantidades significativamente menores ($p < 0,05$) de IL-4, IL-13 e IL-10. A redução seletiva da produção de citocinas da resposta Th2 resultou em diminuição da patologia e diminuição do número de parasitos recuperados. Esses resultados estão de acordo com o trabalho de O'Neill et al (2000) que observaram que camundongos com perfil de resposta Th1 apresentaram lesões hepáticas menores que os

camundongos com perfil de resposta Th2 e que, camundongos com perfil de resposta misto (Th1/Th2) apresentaram lesões hepáticas moderadas.

CCL3 é uma quimiocina inflamatória que interage com células que expressam os receptores CCR1 e CCR5 (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000; MENTEN et al. 2002). Esses receptores são encontrados em diversos tipos celulares, tais como, neutrófilos, monócitos, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B, eosinófilos, células dendríticas, células NK, timócitos, plaquetas, células musculares cardíacas e endotélio, cuja presença e ativação em um local lesionado originam uma resposta inflamatória local (MENTEN et al. 2002; MAURER & VON STEBUT, 2004). Os macrófagos são a principal fonte de CCL3 durante um processo inflamatório e quando os mesmos são ativados por essa quimiocina são capazes de produzi-la em grandes quantidades caracterizando um “feedback” positivo entre a produção de CCL3 por macrófagos e sua ativação (MAURER & VON STEBUT, 2004). Em camundongos, os macrófagos também estão envolvidos no processo de reparo de um tecido lesionado e são encontrados juntamente com fibroblastos em lesões crônicas nos animais infectados por *F. hepatica* (BEHM & SANGSTER, 1999; MENTEN et al. 2002). A presença de neutrófilos e eosinófilos nos sítios inflamatórios é importante no controle de agentes infecciosos e se faz via degranulação dessas células, liberando produtos tóxicos para o parasito e também para as células do hospedeiro. Em consequência da degranulação dessas células, os tecidos do hospedeiro também podem ser lesionados (BEHM & SANGSTER, 1999). Os camundongos CCL3^{-/-} apresentaram atividade de neutrófilos e eosinófilos significativamente menor que os camundongos CCL3^{+/+}, demonstrando que a presença de CCL3 interfere diretamente na migração e atividade destes dois tipos celulares no fígado dos animais infectados e que infiltração e atividade dessas células estão diretamente relacionadas a presença de lesões mais extensas no sítio da infecção. Segundo Behm & Sangster (1999) a presença de fibrose hepática na fasciolose ocorre em virtude da substituição do infiltrado inflamatório presente

nas lesões por macrófagos e fibroblastos. Em nosso trabalho, observamos que o infiltrado inflamatório foi menor no fígado dos camundongos CCL3^{-/-}, uma vez que estes tipos celulares encontram-se menos abundantes nos locais de injúria originam uma área de fibrose menos extensa nos camundongos CCL3^{-/-}. De forma semelhante, Souza et al. (2005) demonstraram que a ausência de CCL3 diminui o recrutamento e a atividade de eosinófilos em camundongos infectados por *S. mansoni* e observaram uma conseqüente diminuição do tamanho do granuloma hepático nos mesmos camundongos.

Podemos inferir que as lesões hepáticas encontradas nos animais infectados por *F. hepatica* são imunomediadas e podem interferir diretamente na sobrevivência do hospedeiro.

Neste trabalho foi possível demonstrar que CCL3 possui um papel relevante durante a fase aguda da infecção por *F. hepatica*. Os camundongos capazes de produzir essa quimiocina apresentaram maior taxa de mortalidade, maior número de parasitos recuperados por animal, maior produção de citocinas (IL-4, IL-13 e IL-10), maior atividade de neutrófilos e eosinófilos no fígado e lesões hepáticas mais extensas que os camundongos deficientes em CCL3. A presença de CCL3 foi responsável por recrutar células inflamatórias para o sítio inflamatório e conseqüentemente pela formação de lesões mais extensas nesses locais. Sabendo-se que as lesões produzidas na infecção por *F. hepatica* ocorrem em razão da resposta imune do hospedeiro à presença do parasito e/ou seus metabólitos (Dawes, 1963c), podemos associar o encontro de lesões hepáticas menos extensas nos camundongos deficientes a dois fatores: 1 – a ausência da ação quimiotática de CCL3 nas células inflamatórias, que resultou na efetiva diminuição da resposta inflamatória local; 2 – os menores níveis de produção de citocinas responsáveis por promover uma resposta imune eficaz.

Estudos complementares a este se fazem necessários para elucidar melhor os mecanismos

envolvidos na formação de lesões na infecção por *F. hepatica* no hospedeiro vertebrado. Uma vez esclarecidos esses mecanismos poderemos buscar alternativas terapêuticas que contribuam para modulação da patologia e conseqüentemente redução dos prejuízos econômicos atribuídos à infecção.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Os camundongos C57Bl/6J deficientes em CCL3 quando infectados por *F. hepatica* apresentam menor taxa de mortalidade quando comparados aos animais capazes de produzir CCL3.
- ✓ O número médio de *F. hepatica* recuperadas em camundongos C57Bl/6J CCL3^{+/+} é estatisticamente superior que à dos camundongos CCL3^{-/-}.
- ✓ Camundongos C57Bl/6J CCL3^{+/+} infectados com *F. hepatica* apresentam lesões hepáticas mais extensas do que camundongos CCL3^{-/-}. As lesões nos camundongos CCL3^{+/+} são de natureza necro-hemorrágica atingindo grande parte do fígado, enquanto que as lesões presentes no fígado dos camundongos CCL3^{-/-} são focais.
- ✓ Camundongos C57Bl/6J CCL3^{+/+} infectados com *F. hepatica* apresentam lesões hepáticas com mais infiltrado celular do que camundongos CCL3^{-/-}.
- ✓ As células do baço dos camundongos C57Bl/6J infectados por *F. hepatica* produzem altos níveis de IL-4, IL-10, IL-13 e IFN- γ quando re-estimuladas com antígeno do parasito, todavia a produção de IL-4, IL-10 e IL-13 é mais elevada no grupo de animais CCL3^{+/+}.
- ✓ CCL3 não interfere na produção de IgE em camundongos C57Bl/6J em infecção experimental com *F. hepatica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHA, P. N., SZYFRES, B. Zoonoses y enfermedades transmisibles comunes al hombre y los animales. Organización Panamericana de la Salud. Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud. Publicación Científica n.354, 1977.
- AKSOY, D. Y.; KERIMOGLU, U.; OTO, A.; ERGUVEN, S.; ARSLAN, S.; UNAL, S.; BATMAN, F.; BAYRAKTAR, Y. Infection with *Fasciola hepatica*. *Clin. Microbiol. Infec.*, v. 11, n. 11, p. 859-86, 2005.
- BARÇANTE, J. M. P. Aspectos parasitológicos, clínicos e imunológicos de cães experimentalmente infectados com *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905. 2004. 178 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- BABALOLA, D. A.; SCHILLHORN VAN VEEN, T. W. Incidence of fascioliasis in cattle slaughtered in Buachi (Nigeria). *Trop. Anim. Health. Prod.*, v. 8, n. 4, p. 243-7, 1976.
- BATTLE, E. G., SWANSON, L. E., MURPHY, J. B. Control of fresh-water snails (intermediate hosts of liver flukes) in Florida, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, n. 118, p. 139-41, 1951.
- BECK, A. A. H. Fasciolose. *A Hora Veterinária*, n. 75, p. 65-70, 1993.
- BEHM, C. A.; SANGSTER N. C. Pathology, pathophysiology and clinical aspects. In: *Fasciolosis*. 1ª edição. CAB International, 1999, p.188-224.
- BENNETT, C. E. Surface features, sensory structures, and movement of the newly excysted juvenile *Fasciola hepatica*. *J. Parasitol.*, v. 61, p. 886-891, 1975a.
- BENNETT, C. E. Scanning electron microscopy of *Fasciola hepatica* during growth and maturation in the mouse. *J. Parasitol.*, v. 61, p. 892-898, 1975b.
- BICALHO, R.S., DE MELO, A.L., PEREIRA, L.H. *Schistosoma mansoni* development in the peritoneal cavity of inbred AKR/J mice. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.35, p.411-416, 1993.
- BORAY J.C., HAPPICH .F.A. Standardised chemotherapeutical tests for immature and mature *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Adv. Parasitol.*, n. 7, p. 95-210, 1969.
- BRADY, M. T.; O'NEILL, S. M.; DALTON, J. P.; MILLS, K. H. G. *Fasciola hepatica* Suppresses a protective Th-1 response against *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, v. 67, n. 10, p. 5372-5378, 1999.
- CARVALHO, J. C. M. Contribuição para o conhecimento da fauna helmintológica de Minas Gerais. *Ceres*, v. 1, n. 5, p. 411-423, 1940.
- CERVI, L., CEJAS, H., MASIH, D.T. Cytokines involved in the immunosuppressor period in experimental fasciolosis in rats. *Int. J. Parasitol.*, v.31, n.13, p.1467-1473, 2001.

COELHO, L. H. L. Variação Populacional e Dinâmica de Infecções *Lymnaea columella* por *Fasciola hepatica* no Município de Itajubá, MG. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

COOK, D. N., BECK, M.A., COFFMANN, T.M., KIRBY, S.L., SHERIDAN, J.F., PRAGNELL, I.B., SMITHIES, O. Requirement of MIP-1 alpha for an inflammatory response to viral infection. *Science*, v.286, n.5447, p. 2098-102, 1999.

CYSTER, J. G. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science*. v. 10, n. 286, p. 2098-102, 1999.

DAEMON, E.; SERRA-FREIRE, N. M. Estudos da relação custo-benefício em parasitologia: uma proposta de análise. *Parasitol. al Dia*, v. 16, p. 59-62, 1992.

DAWES, B. On the growth and maturation of *Fasciola hepatica* L. in the mouse. *J. Helminth.*, n.36, p.11-38, 1962.

DAWES, B. Hyperplasia of the duct biliar in fasciolosis and its relation to the problem of nutrition in the liver-fluke, *Fasciola hepatica* L. *Parasitol.*, v. 53, p. 123-133, 1963a.

DAWES, B. The migration of juvenile forms of *Fasciola hepatica* L through the wall of the intestines in the mouse, with some observations on food and feeding. *Parasitol.*, v. 53, p. 109-122, 1963b.

DAWES, B. Some observations of *Fasciola hepatica* L. during feeding operations in the hepatic parenchyma of the mouse, with notes on the nature of liver damage in this host. *Parasitol.*, v. 53, p. 135-43, 1963c.

DITTMAR, K.; TEEGEN, W. R. The presence of *Fasciola hepatica* (liver-fluke) in humans and cattle from a 4,500 year old archeological site in the Saale-Unstrut Valley, Germany. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 1, p. 141-143, 2003.

DONNELLY, S., O'NEILL, S.M., SEKIYA, M., MULCAHY, G, DALTON, J.P. Thioredoxin peroxidase secreted by *Fasciola hepatica* induces the alternative activation of macrophages. *Infect. Immun.*, v. 73, n.1, p. 166-173, 2005.

DOW, C., ROSS, J.G; TOOD, J.R. The histopathology of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Parasitol.*, v.58, p. 129-35. apud BEHM, C.A.; SANGSTER N.C Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. In: *Fasciolosis*. 1ª edição. CAB International, 1999 p.188-224.

ELOI-SANTOS, S., OLSEN, N.J., CORREA-OLIVEIRA, R., COLLEY, D.G. *Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. *Exp. Parasitol.*, v.75, n.2, p. 168-75, 1992.

FALCÃO, P. L.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; FRAGA, L. A. O.; TALVANI, A.; PROUDFOOT, A. E. I.; WELLS, T. N. C.; WILLIAMS, T. J.; JOSE, T. J.; TEIXEIRA, M. M. Plasma concentrations and rolling of macrophage inflammatory protein 1- α during chronic *Schistosoma mansoni* infection in humans. *J. Infect. Dis.*, v. 186, n. 1, p. 1696-1700, 2002.

FAIRWEATHER, I.; THREADGOLD, L. T.; HANNA, R. E. B. Development of *Fasciola*

hepatica in the mammalian host. In: *Fasciolosis*. 1ª edição. CAB International, 1999 p.47-111.

FINKELMAN, F.D., SHEA-DONOHUE, T., GOLDHILL, J., SULLIVAN, C.A., MORRIS, S.C., MADDEN, K.B., GAUSE, W.C., URBAN, J.F.JR. Cytokine regulation of host defense against parasitic gastrointestinal nematodes: lessons from studies with rodent models. *Annu Rev. Immunol.*, v.15, p.505-533, 1997.

GIOVANNONI, M.; KUBIAK, G. V. L. Fauna parasitológica paraense, IV. Lista prévia da ocorrência de helmintos em animais domésticos. *Arq. Biol. Tecnol.*, v. 2, p. 225-32, 1947.

GONZÁLEZ-LANZA, C., MANGA-GONZÁLEZ, Y., DEL-POZO-CARNERO, P., HIDALGO-ARGUELLO, R. Dynamics of elimination of eggs of *Fasciola hepatica* (Trematoda, Digenea) in the faeces of cattle in the Porma basin, Spain. *Vet Parasitol.*, v. 34, p. 35-43 apud TORGERSON, P.; CLAXTON, J. Epidemiology and Control. In: *Fasciolosis*. 1ª edição. CAB International, 1999 p.113-149.

GULSEN, M.; SAVAS, M. C.; KORUK, M.; KADAYIFCI, A.; DEMIRCI F. Fascioliasis: a report of five cases presenting with common bile duct obstruction. *Neth. J. Med.*, v. 64, n. 1, p. 17-9, 2006.

IGREJA, R. P.; BARRETO, M.G.; SOARES, M. S. Fasciolíase: relato de dois casos em área rural do Rio de Janeiro. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 37, n. 5, p.416-7, 2004.

KLEMENT, P.; AUGUSTINE, J. M.; DELANEY, K. H.; KLEMENT, G.; WEITZ, J. I. An oral ivermectin regimen that eradicates pinworms (*Syphacia* spp.) in laboratory rats and mice. *Lab. Anim. Sci.*, v. 46, n. 3, p. 286-290, 1996.

LIMA, W. S., CORDEIRO, E. M. C., SILVA, M. E. Prevalência de helmintos de bovinos da região campos das vertentes – Minas Gerais. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13, p.258, 2004.

LOPÉZ-ABAN, J., CASANUEVA, P., NOGAL, J., ARIAS, M., MORRONGO, P., DIEZ-BANOS, P., HILLYER, G.V., MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R., MURO, A. Progress in the development of *Fasciola hepatica* vaccine using recombinant fatty acid binding protein with the adjuvant adaptation system ADAD. *Vet. Parasitol.*, v.30, p.287-296, 2007. In press

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v. 193, n. 1, p. 265-75, 1951.

LUKACS, N. W.; STANDIFORD, T. J.; CHENSUE, S. W.; KUNKEL, R. G.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. C-C chemokine-induced eosinophil chemotaxis during allergic airway inflammation. *J. Leukoc. Biol.*, v. 60, n. 5, p. 573-578, 1996.

LUTZ, A. Sobre a ocorrência de *Fasciola hepatica* no estado do Rio de Janeiro. *Bol. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 1, n. 1, p. 9-13, 1921.

MAGE, C.; BOURGNE, H.; TOULLIEU, J.M.; RONDELAUD, D.; DREYFUSS, G. *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi*: changes in prevalences of natural infections in cattle and in *Lymnaea truncatula* from central France over the past 12 years. *Vet. Res.*, v.33, p.439-447, 2002.

MARCET, R., DIAZ, A., ARTEAGA, E., FINLAY, C.M., SARRACENT, J. Passive

protection against fasciolosis in mice by immunization with a monoclonal antibody (ES-78 MoAb). *Parasite Immunol.*, v.24, 103-108, 2002.

MARQUES, S. M. T.; SCROFRENEKER, M. L. *Fasciola hepatica* infection in cattle and buffaloes in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. *Parasitol. Latinoam.*, v. 58, p. 169-172, 2003.

MARTINEZ-FERNANDEZ, A.R., NOGAL-RUIZ, J.J., LOPEZ-ABAN, J., RAMAJO, V., OLEAGA, A., MANGA-GONZALEZ, Y., HILLYER, G.V., MURO, A. Vaccination of mice and sheep with Fh12 FABP from *Fasciola hepatica* using the new adjuvant/immunomodulator system ADAD. *Vet. Parasitol.*, v.15, p.287-298, 2004.

MAS-COMA, S.; BARGUES, M. D.; VALERO, M. A. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.*, v. 35, n. 11-12, p. 1255-1278, 2005.

MAURER, M.; VON STEBUT. E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, v.36, p. 1882-1886, 2004.

MENTEN, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. Macrophage inflammatory protein-1. *Cytokine Growth Factor Rev.*, v. 13, n. 6, p. 455-481, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim eletrônico epidemiológico. Detecção de casos humanos de *Fasciola hepatica* no Estado do Amazonas. Disponível em <http://portalweb05.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/bol_epi_5_2005.pdf> Acesso em 17 de Novembro de 2005.

MOSER, B.; LOETSCHER, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat. Immunol.*, v. 2, n. 2, p. 123-128, 2001.

MOSMANN, T. R.; COFFMAN, R. L. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.*, n. 46, p. 111-147, 1989.

MULCAHY, G., O'CONNOR, F., CLERY, D., HOGAN, S.F., DOWD, A.J., ANDREWS, S.J., DALTON, J.P. Immune responses of cattle to experimental anti-*Fasciola hepatica* vaccines. *Res. Vet. Sci.*, v.67, p.27-33, 1999.

MÜLLER, G.; BERNE, M. E. A.; RAFFI, L. L.; JESUS, L. P.; PAULSEN, R. M. M.; SINKOC, A. L. Influência da temperatura na longevidade infectiva de metacercárias de *Fasciola hepatica*. *Rev. Bras. Agroc.*, v. 5, n. 3, p. 164-165, 1999.

NASCIMENTO, R.A.P., LOBATO, F.C.F., ABREU, V.L.V., Martins, N.E., Assis, R.A., Carvalho Filho, M.B. Evaluation of vaccines against *Clostridium novyi* type B. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.56, n.1, p.1-6, 2004.

NUNES, R.F. Prevalência e dinâmica da infecção por *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) em bovinos, no município de Itajubá – Minas Gerais. 2000. 73f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

OAKLEY, G. A.; OWEN, B.; KNAPP, N. H. Production effects of subclinical liver flukes infection in growing dairy heifers. *Vet. Rec.*, v. 104, n. 22, p. 503-507. 1979.

OGURINADE, A., OGUNRINADE, B. I. Economic importance of bovine fascioliasis in Nigeria. *Trop. Anim. Health. Prod.*, v. 12, n. 3, p. 155-160, 1980.

O'NEILL, S. M.; BRADY, M. T.; CALLANAN, J. J.; MULCAHY, G.; JOYCE, P.; MILLS, K. H. G; DALTON, J. P. *Fasciola hepatica* infection downregulates Th1 responses in mice. *Parasite Immunol.*, n. 22, p. 147-155, 2000.

OLIVEIRA, D. M.; SILVA-TEIXEIRA, D. N.; GOES, A. M. Evidence for nitric oxid action on *in vitro* granuloma formation through pivotal changes in MIP1- α and IL-10 release in human schistosomiasis. *Nitric. oxide*, v. 6, n. 2, p. 162-171, 1999.

PAZ-SILVA, A.; SANCHEZ-ANDRADE, R.; SUAREZ, J. L.; PEDREIRA, J.; ARIAS, M.; LOPEZ, C.; PANADERO, R.; DIAZ, P.; DIEZ-BANOS, P.; MORRONDO, P. Prevalence of natural ovine fasciolosis shown by demonstrating the presence of serum circulating antigens. *Parasitol. Res.* v. 91, n. 4, p. 328-331, 2003.

PECÊGO, O. Fiscalização sanitária de carnes e derivados. Estatística de verificação e apreensões e a sua importância. *Rev. Soc. Bras. Med. Vet.*, v. 2, n. 8-10, p. 375-389, 1925.

PEREIRA, F.E.L.; BOGLIOLO, L. Inflamações. In: *Patologia*. 6ª edição. Guanabara Koogan, 2000. p.113-148.

PIEDRAFITA, D.; PARSONS, J. C.; SANDEMAN, R. M.; WOOD, P. R.; ESTUNINGSIH, S. E.; PARTOUTOMO, S.; SPITHILL, T. W. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity to newly excysted juvenile *Fasciola hepatica* in vitro is mediated by reactive nitrogen intermediates. *Parasite Immunol.*, v. 23, n. 9, p. 473-82, 2001.

PILE, E.; GAZETA, G.; SANTOS, J. A. A.; COELHO, B.; SERRA-FREIRE, N. M. Ocorrência de fasciolose humana no município de Volta Redonda, RJ, Brasil. *Rev. Saude Pública*, v. 34, n. 4, p. 413-414, 2000.

POGLAYEN, G., CAPELLI, G., MARTINI, M., ZAMPICCOLI, R. Epidemiologia delle parassitosi dell'apparato digerente del bovino nella provincia autônoma di Trento. *Atti. Soc. Ital. Buiat.*, v. 27, p. 483-489 apud TORGERSON, P.; CLAXTON, J. Epidemiology and Control. In: *Fasciolosis*. 1ª edição. CAB International, 1999 p.113-149.

QUEIROZ, V. S.; LUZ, E.; LEITE, L. C. & CIRIO, S. M. *Fasciola hepatica* (Trematoda, Fasciolidae) estudo epidemiológico nos municípios de Bocaiúva do Sul e Tunas do Paraná (Brasil). *Acta. Bio. Par.*, n. 31, p. 99-111, 2002.

REID, J. F.; DOYLE, J. J.; ARMOUR, J.; JENNINGS, F.W. *Fasciola hepatica* infection in cattle. *Vet. Rec.*, v. 90, n. 17, p. 486-487, 1972.

RIBEIRO, P. A. Incidência das causas de rejeição de bovinos no Brasil Central, prejuízos causados pelas mesmas nos anos de 1946/47. *Rev. Fac. Med. Vet.*, v. 4, n. 1, p. 167-183, 1949.

RODRIGUEZ-OSORIO, M., GOMEZ-GARCIA, V., ROJAS, J., RAMAJO-MARTIN, V. Humoral immune response and antigenemia in sheep experimentally infected with *Schistosoma bovis*. Cross-reactivity with *Fasciola hepatica* antigens. *J. Parasitol.*, v.85, p. 585-587.

ROSS, J.G.; DOW, C.; TODD, J.R. A study of *Fasciola hepatica* infections in sheep. *Vet. Rec.*, v.80, p. 543-6. apud BEHM, C.A.; SANGSTER N.C Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. In: *Fasciolosis*. 1ª edição. CAB International, 1999 p.188-224.

SERRA-FREIRE, N. M. Fasciolose hepática. *A Hora Veterinária*, n. 1, p. 13-18, 1995.

SINCLAIR, K.B. Pathogenesis of *Fasciola* and other liver-flukes. *Helmint. Abst.*, n.36, p.115-134. apud BEHM, C.A.; SANGSTER N.C Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. In: *Fasciolosis*. 1ª edição. CAB International, 1999 p.188-224.

SINCLAIR, K.B. The effect of corticosteroid on the plasma protein of lambs infected with *Fasciola hepatica*. *Res. Vet. Sci.*, n.9, p.181-183. apud BEHM, C.A.; SANGSTER N.C Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. In: *Fasciolosis*. 1ª edição. CAB International, 1999 p.188-224.

SINCLAIR, K.B. The pathogenicity of *Fasciola hepatica* in sheep. *Br. Vet. J.*, n.128, p.249-259. apud BEHM, C.A.; SANGSTER N.C Pathology, Pathophysiology and Clinical Aspects. In: *Fasciolosis*. 1ª edição. CAB International, 1999 p.188-224.

SOUZA, A. L.; ROFFE, E.; PINHO, V.; SOUZA, D. G.; SILVA, A. F.; RUSSO, R. C.; GUABIRABA, R.; PEREIRA, C. A.; CARVALHO, F. M.; BARSANTE, M. M.; CORREA-OLIVEIRA, R.; FRAGA, L. A.; NEGRAO-CORREA, D.; TEIXEIRA, M. M. Potential role of the chemokine macrophage inflammatory protein 1 α in human and experimental schistosomiasis. *Infect. Immun.*, v. 73, n. 4, p. 2515–2523, 2005.

TAYLOR, S.M. Control of fasciolosis in the British Isles. *Magy. Noorv. Lapja*, v.44, p.651-655 apud TORGERSON, P.; CLAXTON, J. Epidemiology and Control. In: *Fasciolosis*. 1ª edição. CAB International, 1999 p.113-149.

TERASAKI, K., NODA, Y., SHIBAHARA, T., ITAGAKI, T., FUKUDA, K., TSUCHIYA, K. Experimental fascioliasis in the rat-like hamster, *Tscherskia triton*, and other rodent hosts. *Parasitol. Int.*, v.52, p.147-154, 2003.

THOMAS, A.P. Liver fluke in sheep. *Nature*, v.26, p.606-8, 1882. apud COELHO, H.L. Variação Populacional e Dinâmica de Infecções *Lymnaea columella* por *Fasciola hepatica* no Município de Itajubá, MG. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

TORGERSON, P.; CLAXTON, J. Epidemiology and Control. In: *Fasciolosis*. 1ª edição. CAB International, 1999 p.113-149.

UENO, H.; ARANDIA, R.; MORALES, G.; MEDINA, G. Fascioliasis of livestock and snail host for *Fasciola* in the altiplano region of Bolivia. *Natl. Inst. Anim. Health. Q.*, v. 15, p. 61-67, 1975.

URBAN, J. F. JR.; MADDEN, K. B.; SVETIC, A.; CHEEVER, A.; TROTTA, P. P.; GAUSE, W. C.; KATONA, I. M.; FINKELMAN, F. D. The importance of Th2 cytokines in protective immunity to nematodes. *Immunol. Rev.*, v. 127, n. 20, p. 205-220, 1992.

VALERO, M.A., MARCOS, M.D., FONS, R., MAS-COMA, S. *Fasciola hepatica* development in the experimentally infected black rat *Rattus rattus*. *Parasitol. Res.*, v.84, 188-194, 1998.

VALERO, M.A., PANOVA, M., COMES, A.M., FONS, R., MAS-COMA, S. Patterns in size and shedding of *Fasciola hepatica* eggs by naturally and experimentally infected murid rodents. *J. Parasitol.*, v.88, p.308-313, 2002.

VILLAVICENCIO, A. A.; VASCONCELLOS, M. C. First report of *Lymnaea cousini* Jousseume, 1887 naturally infected with *Fasciola hepatica* (Linnaeus, 1758) (Trematoda: Digenea) in Machachi, Ecuador. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 100, n. 7, p. 735-7, 2005.

YILMA, J. M.; MESFIN, A. Dry season bovine fasciolosis in northwestern part of Ethiopia, *Rev. Med. Vet. Toulouse*, v. 151, n. 6, p. 493-500, 2000.

YOKANANTH, S.; GHOSH, S.; GUPTA, S. C.; SURESH, M. G.; SARAVANAN, D. Characterization of specific and cross-reacting antigens of *Fasciola gigantica* by immunoblotting. *Parasitol. Res.*, v. 97, p. 41-48. 2005.

ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, v. 12, n. 2, p. 121-127, 2000.