



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

ROECKSON CARLOS PEIXOTO SILVA

**EFEITOS IMUNORREGULATÓRIOS DO EXTRATO DE *Ascaris suum* E DE SUA
ASSOCIAÇÃO COM N-ACETIL-L-CISTEÍNA SOBRE PERFIL DE ATIVAÇÃO DE
LINFÓCITOS HEPÁTICOS E EXPRESSÃO DE GENES FIBROGÊNICOS NA
HEPATITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**

Recife

2020

ROECKSON CARLOS PEIXOTO SILVA

EFEITOS IMUNORREGULATÓRIOS DO EXTRATO DE *Ascaris suum* E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM N-ACETIL-L-CISTEÍNA SOBRE PERFIL DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS HEPÁTICOS E EXPRESSÃO DE GENES FIBROGÊNICOS NA HEPATITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientadora: Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Coorientadora: Dra. Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque

Recife

202

Catálogo na fonte:
bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

S586e	Silva, Roeckson Carlos Peixoto Efeitos imunorregulatórios do extrato de <i>Ascaris suum</i> e de sua associação com N-acetil-L-cisteína sobre perfil de ativação de linfócitos hepáticos e expressão de genes fibrogênicos na hepatite autoimune experimental / Roeckson Carlos Peixoto Silva. – 2020. 71 f.; il. Orientadora: Valdênia Maria Oliveira de Souza. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas - CCM. Programa de pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2020. Inclui referências e anexos. 1 <i>Ascaris suum</i>. 2. Fibrose. 3. Imunomodulação. 4. Hepatite autoimune. 5. N-acetil-Lcisteína. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de (orientadora). II. Título. 616.988 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2020 - 114)
-------	--



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

ROECKSON CARLOS PEIXOTO SILVA

EFEITOS IMUNORREGULATÓRIOS DO EXTRATO DE *Ascaris suum* E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM N-ACETIL-L-CISTEÍNA SOBRE PERFIL DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS HEPÁTICOS E EXPRESSÃO DE GENES FIBROGÊNICOS NA HEPATITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Aprovado em: 27/02/2020.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Virgínia Maria Barros de Lorena (Examinadora Interna)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Vladia Maria Assis Costa (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. André de Lima Aires (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Aos meus pais, esposa e filho pelo apoio e carinho recebidos durante o transcurso deste projeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido a graça de realizar mais um sonho, por sua misericórdia e onisciência;

Aos meus pais Carlos e Auxiliadora, por terem me norteado durante todos esses anos com sabedoria e destreza. Pelo apoio incondicional, sempre presentes em minha vida desde os momentos mais triviais aos mais importantes. Pelos esforços realizados para que eu pudesse chegar até aqui;

A minha esposa Carla, pelo afeto, resiliência e incentivo sempre presentes para que eu pudesse seguir em frente e lutar por minhas aspirações; e a Rafael, nosso filho amado, um pinguinho de gente que nos trouxe muitas alegrias e tornou-se a razão do nosso viver;

Ao meu irmão Roeverson, a minha sobrinha Rebeca, mais nova integrante da família, e minha cunhada Auricelly, pelo apoio no seio familiar;

A minha orientadora Dra. Valdênia Souza, pelo acolhimento no seu grupo de pesquisa. Pelos ensinamentos compartilhados. Pela oportunidade de crescimento intelectual e profissional, que contribuíram de forma incisiva na minha formação. Pela dedicação e colaboração extrema no decorrer desta pesquisa;

A minha coorientadora Dra. Mônica Albuquerque, pela colaboração e suporte na execução deste projeto;

A Raul Penaforte, meu braço direito, pelo suporte na execução dos experimentos. Pelas horas-extras e “plantões noturnos”. Pela transmissão de boas energias. Pela amizade e cumplicidade na vida profissional e pessoal;

Ao meu amigo Flávio Oliveira, pelo apoio e pelos votos de sucesso sempre presentes;

Aos que fazem o setor de Imunologia do LIKA, colegas de bancada (Patrícia d’Emery, Cássia Nóbrega, Conceição Silva, Gabriela Calixto, Erica Fernandes e Raul Penaforte), e pesquisadores (Vláudia Costa, Mônica Albuquerque, Valdênia Souza, André Aires) pelo apoio nos momentos de dificuldade e pelas risadas entre um experimento e outro;

Ao Dr. Fabrício Souto, pelo suporte realização dos ensaios de biologia molecular; a Dra. Virgínia Lorena, pelo suporte realização dos ensaios de citometria de fluxo; a Dra. Vláudia Costa, pelo suporte na padronização da técnica de isolamento dos linfócitos hepáticos; e ao Dr. André Aires, pelo suporte na confecção dos cortes histológicos;

Aos técnicos do LIKA, Dra. Maria Helena e Luiz Felipe, pelo suporte na manutenção e avaliação dos animais; e a Rafael Padilha, pelo suporte técnico na aquisição das imagens;

Aos membros da comissão avaliadora Dr. André Aires, Dr. Fábio Brayner, Dr. Fabrício Souto, Dr. Wheverton Nascimento, Dra. Virgínia Lorena, Dra. Vláudia Costa e Dra. Valdênia Souza por sua relevante contribuição para o engrandecimento deste trabalho.

RESUMO

O tratamento com extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (ASC) atenuou o dano hepático na hepatite autoimune experimental (HAE). A associação da N-acetil-L-cisteína (NAC) ao esquema terapêutico resultou em incremento do efeito hepatoprotetor. Entretanto, a imunomodulação e as alterações celulares no fígado não estão esclarecidas. Neste estudo, foram avaliados os efeitos da associação entre o ASC e a NAC, no modelo de HAE induzida por concanavalina A (ConA), no perfil de ativação dos linfócitos (CD28, CD40L, CTLA-4, FoxP3, produção de IL-10 por linfócitos T e B), na expressão de marcadores fibrogênicos (α -SMA, Col1a1, PPAR- γ , ARG1, FIZZ1) e alterações histomorfométricas (leucócitos e colágeno) no fígado. Secundariamente, a produção de TGF- β e a cinética dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-*Ascaris* foi avaliada frente ao tratamento com ASC. Para isso, camundongos BALB/c receberam intravenosamente 20 mg/kg de ConA e 3 grupos de animais foram formados: (1) HAE, recebeu apenas ConA; 2) HAE+ASC+NAC: após 30 minutos da indução da HAE, os animais receberam NAC (200 mg/Kg, 12/12h, por 6 dias, via oral) e ASC (1 mg, via intraperitoneal) após 2 horas; 3) HAE+ASC: receberam somente ASC. Como grupo controle, animais sem HAE receberam PBS. Foi observada alta expressão CD28 e CD40L e sutil aumento de CTLA-4 no grupo HAE, porém no grupo HAE+ASC houve diminuição da expressão destas moléculas. Em relação ao grupo controle, houve menor expressão de ARG1 no grupo HAE+ASC+NAC. Em comparação ao grupo HAE, houve aumento da expressão de Col1a1, porém diminuição da expressão de FIZZ1 no grupo tratado com ASC, com ou sem NAC. Houve maior frequência de linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e CD4⁺IL-10⁺, bem como redução do infiltrado inflamatório e produção de colágeno, no grupo HAE+ASC+NAC. Não houve diferença entre os grupos nos níveis de linfócitos B produtores de IL-10, expressão de α -SMA e PPAR- γ . O ASC induz TGF- β e estimula a produção precoce de IgG1 e tardia de IgG2a. Os resultados apontam que ASC favorece a imunossupressão na HAE por limitar a expressão de moléculas coestimulatórias em linfócitos T e diminuir a expressão do gene fibrogênico FIZZ1, bem como por estimular níveis mais altos de IgG1 e TGF- β , sugerindo uma via adicional de controle da resposta Th1 na HAE. Entretanto, associação com a NAC foi necessária para a expansão de linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e T CD4⁺IL10⁺ e atenuação do processo inflamatório e da deposição de colágeno.

Palavras-chave: *Ascaris suum*. Fibrose. Imunomodulação. Hepatite autoimune. N-acetil-L-cisteína.

ABSTRACT

Treatment with adult worm extract from *Ascaris suum* (ASC) attenuated liver damage in experimental autoimmune hepatitis (EAH). The association of N-acetyl-L-cysteine (NAC) to the therapeutic regimen resulted in an increase in the hepatoprotective effect. However, immunomodulation and cellular changes in the liver are unclear. In this study, the effects of the association between ASC and NAC were evaluated in the model of EAH induced by concanavalin A (ConA), in the lymphocyte activation profile (CD28, CD40L, CTLA-4, FoxP3, production of IL-10 by T and B lymphocytes), in the expression of fibrogenic markers (α -SMA, Col1a1, PPAR- γ , ARG1, FIZZ1), and in histomorphometric changes (leukocytes and collagen) in the liver. Secondly, the production of TGF- β and the kinetics of the IgG1 and IgG2a anti-*Ascaris* isotypes were evaluated against treatment with ASC. For this, BALB/c mice received 20 mg/kg of ConA intravenously and 3 groups of animals were formed: (1) EAH, received only ConA; 2) EAH+ASC+NAC: after 30 minutes of EAH induction, the animals received NAC (200 mg/Kg, 12/12h, for 6 days, orally) and ASC (1 mg, intraperitoneally) after 2 hours; 3) EAH+ASC: received only ASC. As a control group, animals without EAH received PBS. High CD28 and CD40L expression and a subtle increase in CTLA-4 were observed in the EAH group, but in the EAH+ASC group there was a decrease in the expression of these molecules. In relation to the control group, there was a less expression of ARG1 in the EAH+ASC+NAC group. In comparison to the EAH group, there was an increase in Col1a1 expression, but a decrease in FIZZ1 expression in the group treated with ASC, with or without NAC. There was a higher frequency of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ and CD4⁺IL-10⁺ T lymphocytes, as well as reduced inflammatory infiltrate and collagen production, in the EAH+ASC+NAC group. There was no difference in the levels of IL-10 producing B lymphocytes, expression of α -SMA and PPAR- γ between groups. ASC induces TGF- β and early production of IgG1 and late IgG2a. The results indicate that ASC favors immunosuppression in EAH by limiting the expression of costimulatory molecules in T lymphocytes and decrease the expression fibrogenic FIZZ1 gene, as well as for stimulating higher levels of IgG1 and TGF- β , suggest that an additional Th1 response control route exists in EAH. However NAC was necessary for the expansion of CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T lymphocytes, production of IL-10, attenuation of the inflammatory process and collagen deposition.

Keywords: *Ascaris suum*. Fibrosis. Immunomodulation. Autoimmune hepatitis. N-acetyl-L-cysteine.

LISTA DE FIGURAS

Figuras da tese

Figura 1 –	Hepatite de interface.....	18
Figura 2 –	Mecanismos do dano hepático na HAI.....	20
Figura 3 –	Indução da HAE pela ConA através da ativação de linfócitos T.....	25
Figura 4 –	Estrutura da N-acetil-L-cisteína.....	29
Figura 5 –	Formação dos grupos de estudo.....	34

Figuras do artigo 1

Figura 1 –	Esquema de formação dos grupos experimentais.....	43
Figura 2 –	Expressão das moléculas CD40L (A), CD28 (B) e CTLA-4 (C) em linfócitos hepáticos de camundongos BALB/c, 7 dias após indução da hepatite autoimune experimental (HAE) e tratamento com extrato solúvel de <i>Ascaris suum</i> (ASC) ou ASC mais N-acetil-L-cisteína (NAC), avaliada por citometria de fluxo. Os resultados representam a frequência de células duplo-marcadas do pool de 3 animais/grupo. * p < 0.05 em relação ao grupo controle. ** p < 0.05 em relação ao grupo HAE.....	47
Figura 3 –	Frequência de linfócitos hepáticos com potencial supressivo no fígado de camundongos BALB/c, 7 dias após indução da hepatite autoimune experimental (HAE) e tratamento com extrato solúvel de <i>Ascaris suum</i> (ASC) ou ASC mais N-acetil-L-cisteína (NAC), avaliado por citometria de fluxo. Linfócitos T CD4 ⁺ IL10 ⁺ (A), linfócitos T CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ (B), linfócitos B CD45R ⁺ IL10 ⁺ (C). * p < 0.05 em relação ao grupo controle. Os resultados representam a frequência de células duplo-marcadas do pool de 3 animais/grupo. ** p < 0.05 em relação ao grupo HAE. # p < 0.05 em relação aos grupos controle, HAE e HAE+ASC.....	49
Figura 4 –	Expressão relativa do mRNA de Col1a1 (A), α -SMA (B), FIZZ1 (C), ARG1 (D) e PPAR- γ (E) no fígado de camundongos BALB/c, 7 dias após indução da hepatite autoimune experimental (HAE) e tratamento com extrato solúvel de <i>Ascaris suum</i> (ASC) ou ASC mais	

N-acetil-L-cisteína (NAC), avaliado por qPCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. ** $p < 0.05$ em relação ao grupo HAE..... 50

Figuras do artigo 2

Figura 1 – Níveis dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-*Ascaris* (**A**) no plasma de camundongos BALB/c em 8h, 24h e 7 dias após indução da Hepatite Autoimune Experimental (HAE) e tratamento com o extrato solúvel de vermes adultos de *Ascaris suum* (ASC) dosados por ELISA. Níveis de TFG- β (**B**) em cultura de esplenócitos dos grupos HAE e HAE+ASC (72 h; 6×10^6 células/mL), sete dias após de indução da HAE. Os esplenócitos foram cultivados somente com meio (**Basal**) e estimulados com **ConA** (10 ng/mL) ou ASC (20 μ g/mL). Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo HAE para IgG1. # $p < 0,05$ em relação ao grupo HAE para IgG2a. £ $p < 0,05$ em relação ao grupo HAE para TGF- β 58

LISTA DE QUADROS

Quadros da tese

Quadro 1 –	Score para diagnóstico da HAI no Brasil.....	21
Quadro 2 –	Anticorpos conjugados a fluorocromos utilizados para a caracterização de linfócitos hepáticos e expressão de moléculas de interesse por citometria de fluxo.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela da tese

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados.....	38
--	----

Tabelas do artigo 1

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados.....	45
--	----

Tabela 2 – Histomorfometria do fígado após tratamento com ASC ou ASC+NAC.....	50
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANA	Anticorpo antinúcleo
APC	Célula apresentadora de antígeno
ARG1	Arginase-1
ASC	Extrato de vermes adultos de <i>Ascaris suum</i>
AST	Aspartato aminotransferase
CD	Grupo de diferenciação
CHC	Carcinoma hepatocelular
Col1a1	Collagen type I alpha 1 chain
ConA	Concanavalina A
CTLA-4	Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
DC	Célula dendrítica
ELISA	Ensaio imunoenzimático
HAE	Hepatite autoimune experimental
HAI	Hepatite autoimune
HLA	Antígeno leucocitário humano
HSC	Célula estrelada hepática
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
LKA	Anticorpo antimicrosoma de fígado e rim
KC	Células de Kupffer
M1	Macrófago classicamente ativado
M2	Macrófago alternativamente ativado
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal
NAC	N-acetil-L-cisteína
NO	Óxido nítrico
OVA	Ovalbumina
PPAR- γ	Peroxisome proliferator activated receptor gamma
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas de oxigênio
PAS-1	Proteína imunossupressora de <i>Ascaris suum</i> – 1
SARA	Síndrome da insuficiência respiratória aguda

SEC	Célula endotelial hepática
TGF- β	Fator de transformação do crescimento beta
Th	Linfócitos T auxiliar
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Linfócitos T regulatórios
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
α -SMA	Alfa-actina de músculos liso
β -actin	Beta-actina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1	Hepatite Autoimune.....	18
3.2	Hepatite autoimune experimental mediada por Concanavalina A	24
2.3	Imunomodulação por helmintos	25
2.4	<i>Ascaris suum</i> e propriedades imunorregulatórias.....	27
2.5	N-acetil-L-cisteína e suas propriedades modulatórias.....	29
3	OBJETIVOS	32
3.1	Geral	32
3.2	Específicos.....	32
3.3	Secundários.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	Desenho do estudo.....	33
4.2	Preparação da concanavalina A, N-acetil-L-cisteína e extrato de vermes adultos de <i>Ascaris suum</i>	33
4.3	Animais, grupos de estudo e considerações éticas	33
4.4	Métodos de coleta de dados.....	35
4.4.1	<i>Avaliação do desenvolvimento da hepatite autoimune experimental.....</i>	<i>35</i>
4.4.2	<i>Eutanásia dos animais.....</i>	<i>35</i>
4.4.3	<i>Isolamento dos linfócitos hepáticos.....</i>	<i>35</i>
4.4.4	<i>Marcação para ensaio de citometria de fluxo.....</i>	<i>36</i>
4.4.5	<i>Expressão gênica hepática de ARG1, FIZZ1, PPAR-γ, Colla1 e α-SMA.....</i>	<i>37</i>
4.4.6	<i>Confecção e processamento dos cortes histológicos.....</i>	<i>38</i>
4.4.7	<i>Deteção de IgG1 e IgG2a anti-Ascaris.....</i>	<i>38</i>
4.4.8	<i>Cultura de leucócitos esplênicos e dosagem de TGF-β</i>	<i>39</i>
4.5	Análise estatística	39

5	RESULTADOS	41
5.1	Artigo 1: Associação entre o extrato de <i>Ascaris suum</i> e a N-acetil-L-cisteína induz efeito imunossupressor na hepatite autoimune experimental	41
5.2	Artigo 2: Extrato de <i>Ascaris suum</i> induz TGF- β e produção precoce IgG1 na hepatite autoimune experimental (Anexo B)	55
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS....	70
	ANEXO B – CARTA DE DECISÃO DA REVISTA BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA	71

1 INTRODUÇÃO

O tratamento com extrato solúvel de *Ascaris suum* (ASC) atenuou o dano hepático na hepatite autoimune experimental (HAE) induzida por concanavalina A (ConA), com redução do infiltrado inflamatório e indução de um perfil Th2 (IL-4, IL-10, IL-13), contudo apresentou como efeito secundário a indução de fibrose (NASCIMENTO et al., 2014). Quando associado a N-acetil-L-cisteína (NAC), houve um incremento do efeito hepatoprotetor, com indução de um perfil T regulatório (IL-10/TGF- β) e expansão de linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ no baço, e redução da produção de colágeno no fígado (SILVA, 2015). Entretanto, os mecanismos envolvidos na imunomodulação e as alterações celulares no fígado não estão esclarecidas.

O efeito hepatoprotetor do ASC pode estar relacionado com sua capacidade de alterar a expressão de moléculas coestimulatórias em APCs, podendo afetar a ativação de células T (FAQUIM-MAURO; MACEDO, 1998; SILVA et al., 2006). Entretanto, é possível que o ASC também altere a expressão de moléculas dessa natureza em linfócitos T, reduzindo a hiperresponsividade celular na HAE. Além disso, o ASC pode induzir a expansão de linfócitos T com potencial regulatório, como demonstrado em outros modelos experimentais, os quais são importantes fontes de IL-10 e TGF- β (ANTUNES et al., 2014; DE ARAÚJO et al., 2010). Essas citocinas, que são cruciais na supressão da resposta inflamatória, podem favorecer diferenciação e ativação de células fibrogênicas, como células estreladas (HSC) e macrófagos alternativamente ativados (M2) (ANTHONY et al., 2010; SU et al., 2018). Além disso, a imunização com ASC pode induzir a produção de anticorpos IgG1 anti-*Ascaris*, cuja relação com entre o isótipo IgG1 e a ativação macrófagos M2 é conhecida (BUXBAUM; SCOTT, 2005; FAIRFAX et al., 2012; GAZZINELLI-GUIMARÃES et al. 2018).

A NAC pode conduzir a expansão periférica de linfócitos T CD4⁺CD25⁺, como observado na lúpus eritematoso sistêmico, e favorecer o equilíbrio entre células Treg e Th17 hepáticas, como observado na HAE induzida por tricloroetano (LAI et al., 2012; WANG et al., 2019). Na HAE induzida por ConA, a NAC reduziu a expressão de citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-2, IL-6 e IFN- γ) e inibiu a ativação de NF- κ B, atenuando o dano hepático (WANG et al., 2015). Adicionalmente, a NAC pode alterar *in vitro* a expressão de moléculas de superfície (HLA-DR, CD86 e CD40) em células dendríticas, afetando as respostas primárias de linfócitos T, e reduzir a atividade de HSC (KIM et al., 2001; VERHASSELT et al., 1999). Sendo assim, é possível que a NAC juntamente com o ASC

module negativamente a atividade de células hepáticas envolvidas na imunopatogênese da hepatite autoimune.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos de imunomodulação e as alterações celulares no fígado induzidas pelo ASC e por sua associação com a NAC no modelo de HAE induzida por ConA. Para isto, foram avaliados, em um estudo de comparação entre animais controle, animais com HAE e animais com HAE tratados com ASC ou ASC mais NAC: o perfil de ativação dos linfócitos (CD28, CD40L, CTLA-4, FoxP3, produção de IL-10 por linfócitos T e B), a expressão de marcadores fibrogênicos (α -SMA, Col1a1, PPAR- γ , ARG1, FIZZ1) e as alterações histomorfométricas (infiltrado inflamatório e produção de colágeno) no fígado.

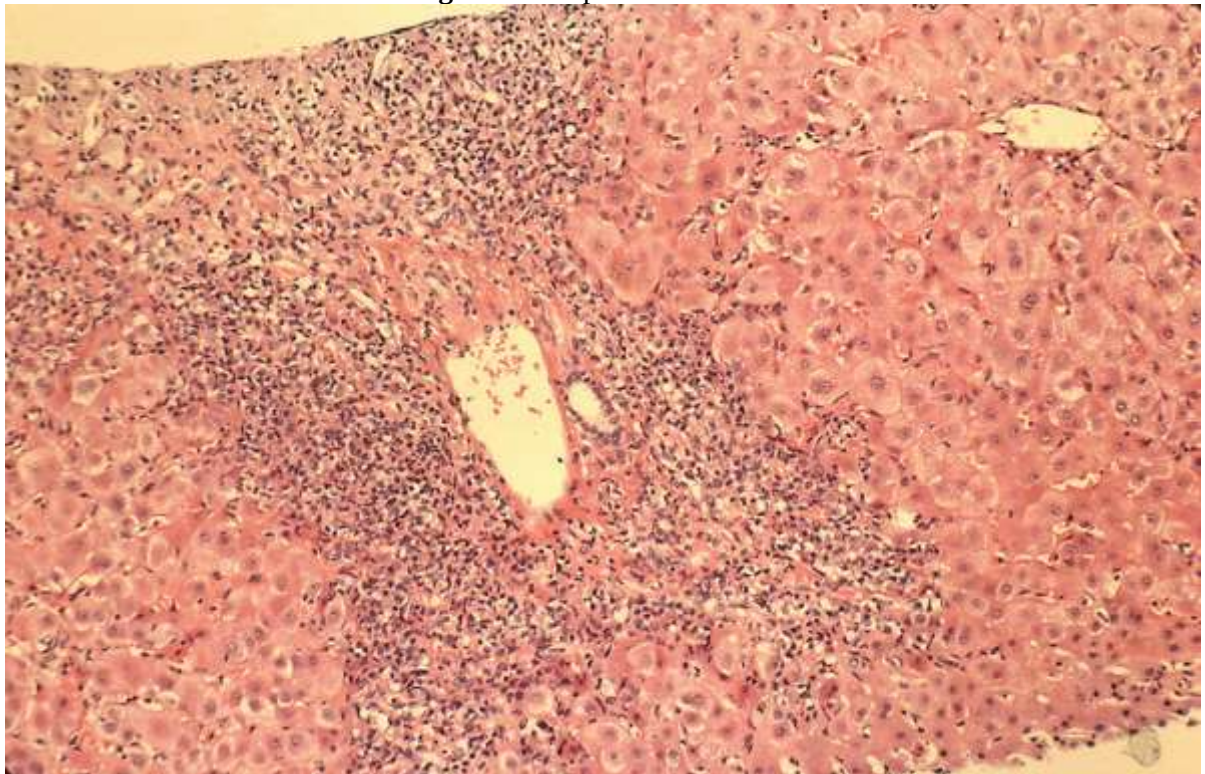
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Hepatite Autoimune

O fígado desempenha funções que vão além do metabolismo de carboidratos, lipídeos, proteínas e vitaminas. Devido sua interface entre o sistema digestivo e a circulação geral do organismo, o microambiente hepático é um local de intercâmbio contínuo de informações imunológicas, continuamente exposto aos antígenos alimentares e microbianos provenientes do intestino. Sua capacidade de tolerância o torna um importante sítio de regulação imune e mediador das imunidades inata e adaptativa. No entanto, falhas nesse mecanismo de tolerância podem resultar no desenvolvimento de doenças autoimunes do fígado, como a hepatite autoimune (HAI) (INVERNIZZI, 2013; RACANELLI; REHERMANN, 2006).

Reconhecida em 1942, a HAI é uma doença inflamatória crônica do fígado, caracterizada pela presença de autoanticorpos circulantes, elevação nos níveis das transaminases séricas, hipergaglobulinemia (principalmente IgG) e um quadro histológico de hepatite de interface (Figura 1) (AMBERG, 1942; LUCEY; VIERLING, 2014; MAKOL; WATT; CHOWDHARY, 2011).

Figura 1 – Hepatite de interface



Descrição: A placa limitante do trato portal é invadida por um infiltrado de células linfoplasmocitárias. Hematoxilina e eosina; aumento, 200x.

Fonte: Hepcentro, 2002.

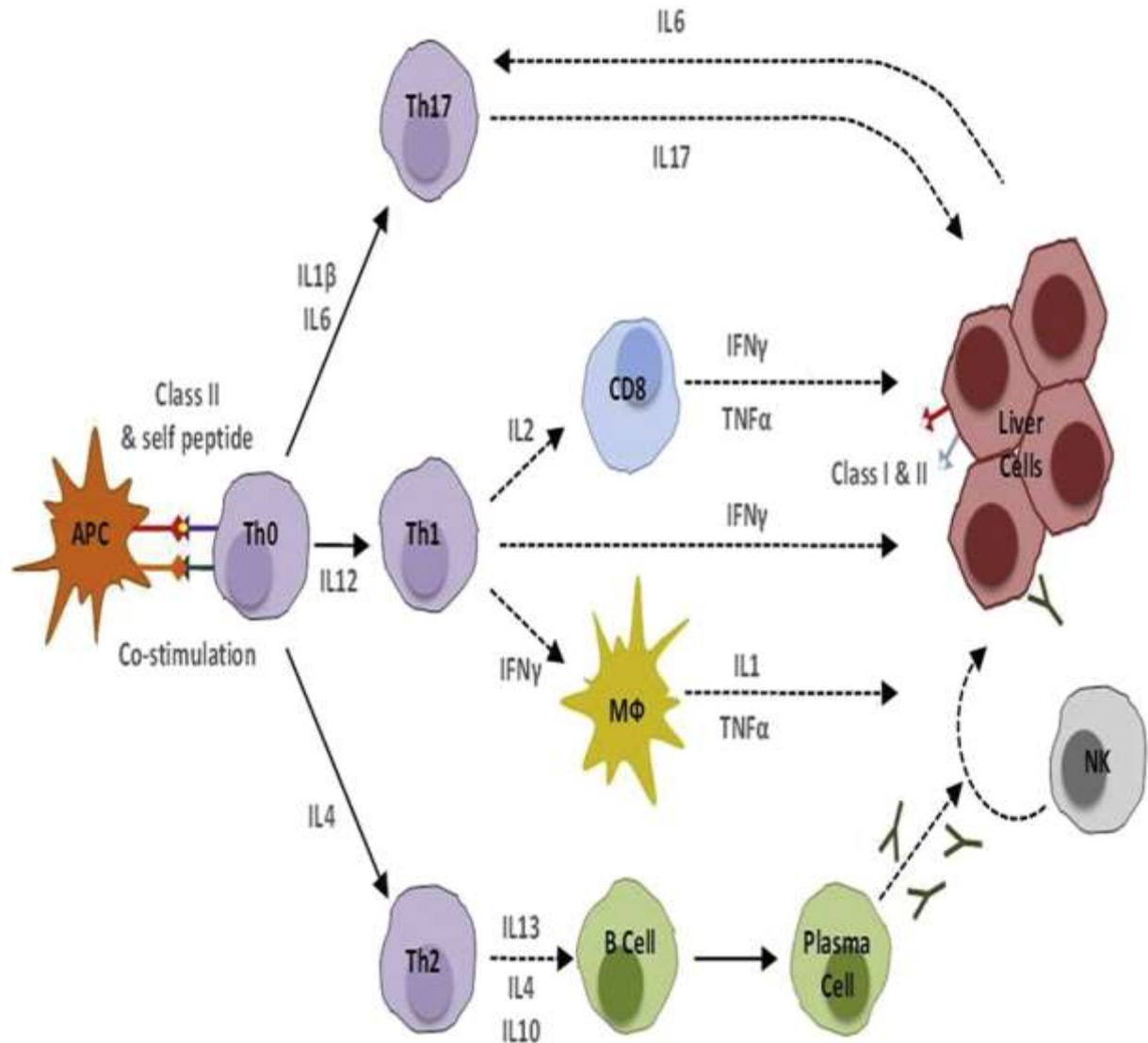
A HAI afeta crianças e adultos de ambos os sexos e todos os grupos étnicos e raciais. Entretanto, a prevalência é superior em caucasianos europeus e indivíduos do sexo feminino (relação homem/mulher 1:4) (MANNS et al., 2010). Na Escandinávia, onde tem sido melhor estudada, a incidência é de 1-2 pessoas por 100 mil habitantes por ano e sua taxa de prevalência é de 11-17 pessoas por 100 mil habitantes por ano, com pico de incidência ocorrendo entre 16-30 anos (LUCEY; VIERLING, 2014). No Brasil a incidência não é plenamente conhecida. Todavia, entre as causas de hepatopatia crônica, sua prevalência é de 3,3% (PORTAL DA SAÚDE, 2018).

Embora sua etiopatogênese seja pouco conhecida, semelhante a outras desordens autoimunes, a HAI apresenta causas multifatoriais, com relevante participação de fatores ambientais e falhas nos mecanismos de autotolerância em pessoas geneticamente susceptíveis (MAKOL; WATT; CHOWDHARY, 2011). Os exatos mecanismos pelos quais os danos ao fígado ocorrem não são totalmente compreendidos, no entanto tem sido relatado que a agressão autoimune se inicia com a perda da autotolerância decorrente da lise de hepatócitos por linfócitos T CD8⁺ efetores, após processo infeccioso, resultando na apresentação de autoantígenos; pelo uso de drogas e por mimetismo molecular entre antígenos próprios de agentes exógenos que compartilham determinantes antigênicos comuns (BJÖRNSSON et al., 2010; MAKOL; WATT; CHOWDHARY, 2011). Os linfócitos T regulatórios também desempenham um papel consolidado na manutenção da autotolerância hepática, tendo vista que sua diminuição tem sido relatada na HAI (CARAMBIA; HERKEL, 2010; WANG et al., 2012).

Em trabalho de revisão, Liberal et al. (2013) conclui que a resposta imune na HAI parece ter início com a apresentação de autoantígenos por APCs residentes no fígado (Kupffer, DCs e células sinusoidais) a linfócitos T helper (Th0) (Figura 2). Durante apresentação e sob os sinais coestimulatórios apropriados, os linfócitos Th0 se tornariam ativados e se diferenciariam em diferentes subtipos de acordo as citocinas presentes no meio. Na presença de IL-12 ou IL-4, os linfócitos Th0 se diferenciariam em Th1 e Th2, respectivamente; enquanto o predomínio de IL-1 β e IL-6 favoreceria a diferenciação em Th17. A diferenciação das células em Th1 conduziria um aumento da produção de IL-2 e IFN- γ , com concomitante ativação de linfócitos T CD8⁺ e macrófagos. A diferenciação de Th0 em Th2 conduziria um aumento na produção de IL-10, IL-4 e IL-13, que são importantes na maturação de linfócitos B e na produção de autoanticorpos. Enquanto as células Th17

contribuiriam com a autoimunidade pela produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-17, IL-22 e TNF- α).

Figura 2 – Mecanismos do dano hepático na HAI



Fonte: Liberal et al., 2013.

O processo inflamatório na HAI está associado com aumento da necrose e da apoptose nos hepatócitos. Corpos apoptóticos derivados de hepatócitos podem ativar células estreladas quiescentes e células de Kupffer (KC) e estas populações celulares podem promover inflamação e respostas fibrogênicas. KC estimuladas podem liberar citocinas, quimiocinas, ROS e NO por indução da iNOS, que podem aumentar a apoptose nos hepatócitos e estimular a ativação das HSC. As HSCs quando ativadas, aumentam a expressão de α -SMA e Col1a1 e reduzem a de PPAR- γ , adquirem um fenótipo semelhante a miofibroblastos e estimulam a

produção de mais ROS, aumentando o estresse oxidativo nos hepatócitos (ANTHONY et al., 2010; COHEN-NAFTALY; FRIEDMAN, 2011; LEE; FRIEDMAN, 2011). Também podem promover a inflamação por aumentarem a expressão de citocinas pró-inflamatórias, moléculas de adesão e ativação de linfócitos T e NKT, além de aumentarem a produção de matriz extracelular por deposição de fibrilas de colágeno (HELLERBRAND et al., 1996; WINAU et al., 2007).

Após lesão tecidual, os macrófagos podem se modificar de acordo com diferentes estímulos liberados no meio e se diferenciar em macrófagos classicamente (M1) e alternativamente (M2) ativados. A via de ativação clássica é induzida na presença de um perfil Th1, no qual M1 expressa citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IFN- γ , e iNOS, sendo importantes nas respostas inflamatórias e lesão tecidual. A via alternativa conduz a diferenciação em um perfil M2 na presença de IL-4 e IL-13, sendo importante na resolução da inflamação (IL-10 e TGF- β), na cicatrização de feridas e na geração de colágeno (VAN GINDERACHTER et al., 2006).

Na maioria dos casos, a HAI apresenta início insidioso, caracterizado por sintomas inespecíficos (fadiga, náuseas, dor abdominal, icterícia e artralguas) e espectro clínico amplo, variando desde quadros assintomáticos a agudos e graves. O diagnóstico é realizado pela soma de informações clínicas, bioquímicas, histopatológicas e de resposta ao tratamento. Devem ser afastadas causas virais, tóxicas e metabólicas antes que se possa firmar o diagnóstico. Dessa forma, o diagnóstico é realizado pelo somatório de um score de achados clínicos, laboratoriais e histológicos (Quadro 1). A partir do escore obtido, o diagnóstico de HAI é feito da seguinte forma: a) Pacientes que ainda não tenham sido tratados com imunossupressores: de 10 a 15 (diagnóstico provável de HAI); acima de 15 (diagnóstico definido de HAI); b) Pacientes já tratados com imunossupressores: 12 a 17 (diagnóstico provável de HAI); acima de 17 (diagnóstico definido de HAI). (PORTAL DA SAÚDE, 2018).

QUADRO 1 – Score para diagnóstico da HAI no Brasil

PARÂMETRO	SCORE
Sexo feminino	+2
Relação fosfatase alcalina/AST (TGO) (ou ALT/TGP)	
< 1,5	+2
1,5-3,0	0
> 3,0	-2

Continua

Conclusão

PARÂMETRO	SCORE
< 1,0	0
FAN, AML ou anti-LKM1	
> 1:80	+3
1:80	+2
1:40	+1
< 1:40	0
Antimitocôndria positivo	-4
Marcadores de hepatites virais	
Reagente	-3
Não reagente	+3
Consumo de fármacos hepatotóxicos atual ou recente	
Presente	-4
Ausente	+1
Consumo médio de álcool	
< 25 g/dia	+2
> 60 g/dia	-2
Histologia hepática	
Infiltrado periportal com necrose em saca-bocado	+3
Infiltrado linfoplasmocitário predominante	+1
Hepatócitos em roseta	+1
Nenhum dos critérios acima	-5
Alterações biliares	-3
Outras alterações	-3
Outra doença autoimune (própria ou em familiar de 1o grau)	-2
Parâmetros opcionais	
Positividade de outro anticorpo associado a HAI	+2
HLA DR3, DR7 ou DR13	+1
Resposta ao tratamento imunossupressor	
Completa	+2
Recaída com a diminuição	+3

Fonte: Adaptado do Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas para Hepatite Autoimune, 2018.

Alguns achados laboratoriais comuns na HAI são o aumento sérico das aminotransferases (AST e ALT), cujos níveis podem atingir valores acima de 50 vezes o limite superior da normalidade. Nos casos de doença hepática mais avançada ou com menor atividade necroinflamatória à biópsia, pode ser encontrada elevação menor ou igual a cinco vezes o normal. Os valores da fosfatase alcalina, por outro lado, são normais ou discretamente elevados. A hipergamaglobulinemia é policlonal, com aumento dos níveis da IgG. Graus variáveis de disfunção hepática são caracterizados por hiperbilirrubinemia, alargamento do

tempo de protrombina e hipoalbuminemia (TERRABUIO, 2012). Elevações discretas da γ -glutamilttransferase também são comuns (LEMOS; SCHIAVON; FERRAZ, 2007).

De acordo com o perfil de autoanticorpos produzido, a HAI pode ser classificada em três categorias: **HAI tipo I**) caracterizada pela presença de anticorpos antinúcleo (ANA) e/ou anticorpos antimúsculo liso (SMA); **HAI tipo II**) caracterizada pela presença de anticorpos antimicrosoma de fígado e rim (LKM-1) e baixos níveis de anticorpos LKM-3, com ou sem anticorpos ANA e SMA; e **HAI tipo 3**) caracterizada pela presença de autoanticorpos contra antígenos solúveis do fígado e pâncreas, com ou sem anticorpos ANA e SMA (MANNS et al., 2010).

O prognóstico da HAI depende do grau de atividade da doença e da presença ou não de cirrose. Pode ter uma apresentação aguda e grave, que pode ser confundida com hepatite viral ou tóxica, e, às vezes pode se apresentar como uma insuficiência hepática aguda. Além disso, a doença crônica não diagnosticada pode apresentar uma exacerbação espontânea e manifestar-se de forma aguda e fatal. Sem tratamento mais de 40% dos pacientes com a forma aguda da doença evoluem para óbito em até 6 meses após o diagnóstico e os que sobrevivem, frequentemente, desenvolvem complicações secundárias como cirrose e varizes esofagianas (MANNS et al., 2010). O tratamento convencional consiste de prednisona em monoterapia, na dose de 60 mg/d, ou na dose de 30 mg/d associada à azatioprina 1-2 mg/kg/d, ambos com taxas semelhantes de resposta. O tratamento combinado associa-se à menor ocorrência de efeitos colaterais, quando comparado com a prednisona em monoterapia (TERRABUIO, 2012). Mesmo com o tratamento convencional, a cirrose costuma ocorrer em 40% dos pacientes tratados e é tida como um fator de risco para o desenvolvimentos do carcinoma hepatocelular (CHC) (ROBERTS; THERNEAU; CZAJA, 1996; TEUFEL, 2009; YEOMAN et al., 2008). A inabilidade de suprimir totalmente a atividade inflamatória em até 12 meses de tratamento está relacionada com sua evolução para cirrose em 54% dos casos e morte ou transplante hepático em 15% dos casos (CZAJA, 2009).

Desse modo, devido os relatos de falha terapêutica, toxicidade aos fármacos utilizados e o desenvolvimento de complicações secundárias associadas a HAI, opções terapêuticas que suplementem o tratamento convencional e que utilizam mecanismos de tolerância hepática estão começando a surgir, tais como a geração de células T regulatórias e de citocinas imunossupressoras para tratamento de doenças autoimunes (CARAMBIA; HERKEL, 2010; CZAJA, 2014; WANG et al., 2013).

3.2 Hepatite autoimune experimental mediada por Concanavalina A

A investigação sobre a patogênese da HAI tem sido dificultada pela falta de modelos animais que reproduzam fielmente a condição humana de dano hepatocelular. Desse modo, modelos de estudo em animais experimentais que mimetizem a doença vêm sendo estabelecidos (LONGHI et al., 2010). Entre eles, há um modelo bem aceito que é baseado na administração intravenosa da lectina Concanavalina A (ConA) (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992).

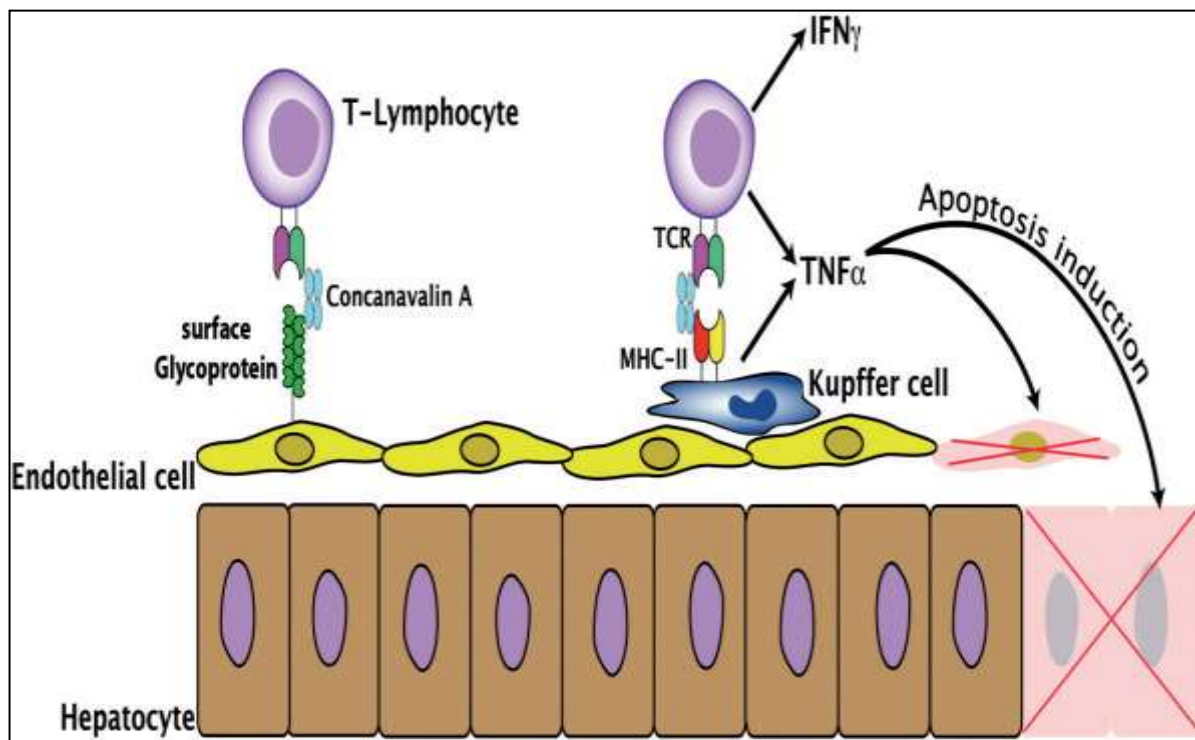
Nesse modelo, verificou-se que a injúria hepática induzida por esta lectina ocorre de maneira dose dependente e necessita da ativação de linfócitos T auxiliares por macrófagos. Após a administração da ConA, ocorre uma insuficiência hepática aguda com aumento significativo das transaminases séricas oito horas após sua administração, e evidenciaram-se pequenas áreas de necrose com um infiltrado difuso de leucócitos por microscopia óptica. Em seguida, foi constatada uma grave desintegração morfológica da microarquitetura hepática através de microscopia eletrônica. Os linfócitos lesionam a superfície sinusoidal dos hepatócitos e a morte celular foi confirmada observando-se rupturas da membrana celular, vacuolização citoplasmática e perda de citoplasma. Este modelo permitiu o estudo da fisiopatologia das doenças hepáticas mediadas por componentes imunológicos, como a hepatite autoimune aguda (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992).

A participação dos linfócitos, células endoteliais sinusoidais (SEC), células de Kupffer e células estreladas hepáticas (HSC) são importantes na patogênese da HAE (ZHENG; WENG; YU, 2009). As principais citocinas envolvidas nesse processo são IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6 e TNF- α , no qual IFN- γ e TNF- α são as mais relevantes (WANG et al., 2012). Após a administração intravenosa, a ConA liga-se aos resíduos de manose das SEC promovendo lesão e facilitando a ligação da ConA as moléculas de MHC II das células de Kupffer, modificando-as (ZHANG et al., 2010). O reconhecimento do MHC II modificado conduz a ativação de linfócitos T CD4, principal tipo celular envolvido na patogênese hepática, e que é sugerido pelo aumento expressivo nos níveis de IL-2, IL-4 e IFN- γ (TSUI et al., 2007; ZHANG et al., 2010). Apesar dos mecanismos não serem totalmente conhecidos, o processo inflamatório desencadeado promove agressão tecidual e fibrogênese, com aumento da população de HSC (LOUIS et al., 1998), que podem ser ativadas pelo aumento nos níveis de TNF- α (ANDRADE, 2005).

A sequência dos eventos que desencadeiam a lesão hepática na foi representada abaixo HAE (Figura 3). Cerca de 15 minutos após a administração intravenosa da ConA, a lectina

liga-se ao receptor de manose nas células endoteliais sinusoidais, lesionando sua membrana através da ativação de linfócitos T e causando liberação de citocinas quimiotáticas. Quatro horas após a administração da ConA, a lectina liga-se as células de Kupffer que a apresentam via MHC de classe II ao receptor dos linfócitos T, induzindo uma hiperativação inespecífica destas células (HEYMANN et al., 2015; KÜSTERS et al., 1996; SCHÜMANN et al., 2000; WANG et al., 2012).

Figura 3 – Indução da HAE pela ConA através da ativação de linfócitos T



Fonte: Heymann et al., 2015

2.3 Imunomodulação por helmintos

Em 1989, Strachan descreveu a “Hipótese da higiene” através da observação da relação inversa entre a ocorrência da febre do feno e do número de irmãos, condições socioeconômicas e hábitos de higiene (STRACHAN, 1989). Segundo essa hipótese, as doenças atópicas são mais prevalentes em indivíduos que tiveram menor exposição a micro-organismos durante a infância (YAZDANBAKHS; KREMSNER; REE, 2002). Recentemente, este conceito tem sido cada vez mais aceito devido ao acúmulo de evidências em relação às doenças atópicas e, adicionalmente, estendido às doenças autoimunes inflamatórias, principalmente em modelos de estudos experimentais (OSADA; KANAZAWA, 2010; ELLIOTT; WEINSTOCK, 2011).

Baseado na epidemiologia das doenças autoimunes, fatores ambientais como as infecções por helmintos são parte da hipótese da higiene para explicar o porquê das desordens autoimunes serem menos prevalentes em países em desenvolvimento (WOLFF; BROADHURST; LOKE, 2012), já que em regiões do mundo onde as infecções por esses parasitos são endêmicas e as condições sanitárias precárias, há uma menor prevalência tanto de doenças alérgicas quanto autoimunes (GIRGIS; GUNDRA; LOKE, 2013).

Pesquisas experimentais mostraram que a infecção helmíntica ou imunização com extratos de vermes modificam a imunidade a antígenos homólogos e heterólogos (DUNNE; COOKE, 2005; FERREIRA et al., 1995; SOUZA; FAQUIM-MAURO; MACEDO, 2002). Estas observações são apoiadas por estudos em seres humanos que exibem as consequências das constantes infecções e reinfecções helmínticas, como a ascaridíase e outras geohelmintíases, sobre a eficácia da vacinação ou à tolerância aos transplantes alogênicos (COOPER et al., 2000; ELIAS et al., 2001; GIRGIS; GUNDRA; LOK, 2013; LIWSKI et al., 2000; SABIN et al., 1996).

Os mecanismos da resposta imune nas infecções helmínticas são múltiplos devido ao tamanho e à diversidade metabólica dos parasitos, que são antigenicamente complexos (MACHADO et al., 2004). Entretanto, as helmintíases são comumente caracterizadas pela ativação de linfócitos T CD4⁺ e direcionamento da resposta imunológica para um perfil Th2, no qual as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13 desempenham papel chave no controle e eliminação desses vermes (GIRGIS, GUNDRA; LOKE, 2013). A fim de escapar da resposta imune, os parasitos podem induzir anergia dos linfócitos T aos antígenos parasitários e/ou estimular o desenvolvimento de células T reguladoras (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2007), bem como adquirir e sintetizar estruturas semelhantes às do hospedeiro que irão mascarar sua superfície externa (NEVES et al., 2010) e, desse forma, reduzir sua imunogenicidade e inibir a resposta imune do hospedeiro.

As células Treg desempenham um papel crítico na manutenção da autotolerância, devido seu efeito imunossupressor mediado por citocinas como IL-10, TGF- β e IL-35. A IL-35 é predominantemente produzida por linfócitos Treg, mas também pode ser produzida por linfócitos B regulatórios, sendo associado ao controle de processos inflamatórios de natureza infecciosa e autoimune (SHEN et al., 2014; WANG et al., 2014). Foi demonstrado que a infecção por *Trichuris muris*, concomitante a inoculação de tumores sólidos, promoveu a geração de Treg, com produção de níveis elevados de IL-35. A tolerância imunológica induzida pela infecção foi relacionada com a progressão do tumor, decorrente da supressão da resposta imune celular (COLLISON et al., 2010).

Estudos realizados por MELON e colaboradores (2010) demonstraram que camundongos infectados com *Hymenolepis diminuta* exibiram um aumento da produção das citocinas IL-4 e IL-10 por células esplênicas após indução de colite química. A infecção pelo *H. diminuta* foi superior ao tratamento com dexametasona na prevenção da colite induzida e não resultou em efeitos adversos adicionais (deposição de colágeno). HU e colaboradores (2009) observaram uma ação anti-inflamatória da proteína recombinante do *Schistosoma japonicum* de 16kDa (rSj16). In vivo, a rSj16 suprimiu o recrutamento de leucócitos, modulando a transcrição gênica para IL-10, IL-1RA, IL-12p35, IL-1 β e MIP-2 e suprimindo a maturação de macrófagos peritoneais induzida por tioglicolato.

Foi observado que o trematódeo *Fasciola hepatica* suprimiu a apresentação de autoantígenos relacionados às repostas Th1 e Th17, resultando em um efeito protetor sobre o desenvolvimento da encefalomielite autoimune experimental (EAE) dependente de TGF- β (WALSH et al. 2009). Enquanto que a infecção pelo cestódeo *Taenia crassiceps* gerou um efeito antidiabético no modelo experimental de diabetes induzida por droga (estreptozotocina). Nesse estudo, houve um aumento na população de macrófagos alternativamente ativados (M2), enquanto a população de células T regulatórias não sofreu alteração (ESPINOZA-JIMÉNEZ et al., 2010). M2, expressando arginase-1, demonstraram ser importantes no processo de reparação tecidual, controlando a fibrose e a inflamação dependentes de citocinas Th2 (PESCE et al.; 2009).

Com relação à imunomodulação pelo *Ascaris suum*, a sua capacidade anti-inflamatória no modelo de inflamação neutrofílica foi demonstrada por Oshiro e colaboradores (2005). Neste estudo, a inibição do influxo de neutrófilos induzido por LPS, em um modelo de bolsa de ar, ocorreu devido à redução acentuada de TNF- α , IL-1 β e IL-6 e aumento significativo de IL-10 e TGF- β após a administração de PAS-1 (OSHIRO; MACEDO; MACEDO-SOARES, 2005).

2.4 *Ascaris suum* e propriedades imunorregulatórias

Infecções por helmintos ou imunizações com extrato dos vermes ou com seus produtos (secretados ou excretados) são capazes de alterar a indução e a função da resposta imune (BORKOW; BENTWICH, 2008; ERB, 2009; URBAN et al., 2007). A modulação da resposta imune por diferentes componentes do extrato de vermes de *A. suum* (ASC) foi comprovada por uma série de experimentos realizados por Soares e colaboradores (1986, 1987, 1988, 1990, 1991, 1992).

A administração conjunta do extrato de vermes adultos de *A. suum* com um antígeno heterólogo, ovalbumina (OVA), resultou na supressão da reação imediata e da reação tardia de hipersensibilidade, acompanhada pela inibição da produção de IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA (FERREIRA et al., 1995). Posteriormente, componentes de alto peso molecular com atividade imunossupressora a antígenos homólogos e heterólogos foram identificados no extrato de *A. suum* (FAQUIM-MAURO; MACEDO, 1998; SOUZA; FAQUIM-MAURO; MACEDO, 2002; JACYSYN; MACEDO, 2004; SOUZA; MACEDO, 2009).

Componentes de alto peso molecular de *A. suum* também inibiram a expressão de moléculas coestimulatórias (CD80, CD86, CD40) e MHC de classe II em células dendríticas (DCs), mostrando que estes componentes modulam negativamente a capacidade de apresentação de antígeno por DCs (SILVA et al., 2006), induzindo efeitos tolerogênicos (CARRANZA et al., 2012).

Com relação à asma alérgica, o ASC tem um efeito inibitório sobre a inflamação e hiperresponsividade pulmonar. Nesse modelo, foi verificado um efeito supressivo sobre o acúmulo de células nas vias aéreas (eosinófilos) relacionado com uma redução acentuada da IL-5 e IL-4 no lavado broncoalveolar (LIMA et al., 2002). Em um modelo de asma induzida por OVA, o pré-tratamento com ASC reduziu o infiltrado inflamatório no tecido pulmonar e os níveis de IL-4, IgE total e IgE específica anti-OVA no lavado broncoalveolar; indicando efeito protetor (CHO; PARK; SON, 2011). A supressão da asma alérgica foi também demonstrada por ITAMI e colaboradores (2005) quando utilizaram a proteína imunossupressora PAS-1 extraída do ASC (200 kDa), que foi capaz de reverter o quadro alérgico da asma induzida por proteínas alergênicas do verme. Este componente diminuiu a eosinofilia pulmonar, a produção de anticorpos anafiláticos e de citocinas Th2 (IL-4 e IL-5) e aumentou a produção de IFN- γ e IL-10, demonstrando, assim, uma atividade imunomodulatória no hospedeiro (ITAMI et al., 2005).

O PAS-1 possui a habilidade de suprimir a produção de anticorpos heterólogos, de alterar a produção e a secreção de citocinas e inibir a ativação celular para antígenos heterólogos (OSHIRO et al., 2004). Ele também foi capaz de suprimir o infiltrado neutrofílico induzido por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) num modelo de bolsa de ar, no qual ocorreu uma redução acentuada de TNF- α , IL-1 β e IL-6. Em contraste, PAS-1 induziu um aumento significativo de IL-10 e TGF- β (OSHIRO; MACEDO; MACEDO-SOARES, 2005).

A capacidade imunossupressora do extrato de *A. suum* também foi avaliada em modelos de hipersensibilidade autoimune. Na artrite autoimune experimental, o ASC foi

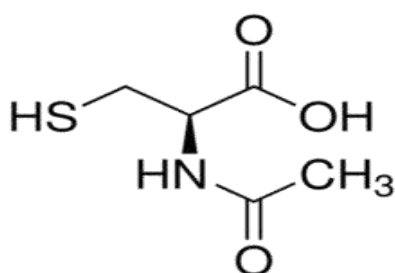
administrado por via intraperitoneal e oral, antes e depois da indução da artrite, levando a diminuição da produção de IL-1 β e NO (ROCHA et al., 2008).

Na HAE induzida por Con A, os efeitos do ASC foram avaliados de forma profilática e terapêutica. Em ambos os esquemas, o ASC restaurou os níveis das transaminases, imunoglobulinas totais e o peso do fígado, mas no grupo terapêutico o reestabelecimento foi mais tardio. A taxa de sobrevivência nos animais tratados profilaticamente foi de 100%, enquanto no grupo terapêutico foi 67% e no sem tratamento 38,5%. Nos grupos tratados houve uma redução do infiltrado inflamatório, com elevada produção de IL-4, IL10 e IL-13. Entretanto, foi observado no protocolo terapêutico um aumento da fibrose (NASCIMENTO et al., 2014). A fibrose pode ter sido exacerbada na presença do ASC pelo aumento da produção de IL-13, que é um marcador da resposta contra helmintos, bem como do processo fibrogênico (WILSON et al., 2007). Em combinação com a IL-4, esse microambiente favorece a diferenciação de M2, que estão envolvidos com o processo de reparo tecidual e fibrose (SUGAWARA et al., 2010).

2.5 N-acetil-L-cisteína e suas propriedades modulatórias

A N-acetil-L-cisteína, também conhecida como N-acetil-L-cisteína (Figura 4), N-acetilcisteína ou NAC, é uma droga com efeito pleiotrópico, utilizada na prática clínica por diversas décadas como agente mucolítico, no tratamento da hepatotoxicidade por acetaminofeno e nos casos iniciais de insuficiência hepática (KOCH; TRAUTWEIN 2010; SAMUNI et al., 2013). A presença de um grupo tiol na molécula confere importante papel no sistema biológico. Esse grupo facilita o rompimento das ligações do tipo dissulfeto das mucoproteínas, aumentando a viscosidade do muco das secreções pulmonares, e é crucial para manutenção do potencial redox no organismo (KELLY, 1998; SAMUNI et al., 2013).

Figura 4 – Estrutura da N-acetil-L-cisteína



$C_5H_9NO_3S$; PM: 163,19

Pó Cristalino, branco ou quase incolor;
solúvel em H_2O ou CH_2OH .

Classe terapêutica: Mucolítico

Fonte: Farmacopeia Brasileira, 2019

Estudos em humanos e animais têm demonstrado que a NAC é um potente agente antioxidante e terapêutico, mostrando-se uma droga segura, bem tolerada e com amplo espectro clínica. Suas aplicações estão sendo avaliadas no tratamento do câncer, transtornos neuropsiquiátricos, síndromes de isquemia-reperfusão, doenças cardíacas, infecções pelo HIV, bronquite, SARA, toxicidade induzida por quimioterápicos e outras doenças caracterizadas pela produção de radicais livres (MILLEA, 2009; SAMUNI et al., 2013). Seus efeitos também foram avaliados em doenças fibrogênicas e granulomatosas (AIRES, 2012; HAGIWARA; ISHII; KITAMURA, 2000).

Durante a esclerodermia, a NAC reduziu a elevada contratilidade e capacidade de migração dos fibroblastos envolvidos com as lesões de pele, interferindo na expressão de genes envolvidos com a produção e remodelagem da matriz extracelular, melhorando o prognóstico da doença (SHI-WEN et al., 2012). O tratamento com a NAC também preveniu o desenvolvimento da fibrose pulmonar induzida por bleiomicina, reduzindo o infiltrado celular no lavado broncoalveolar e nos tecidos alveolares (HAGIWARA; ISHII; KITAMURA, 2000).

Trabalhos *in vitro* demonstraram que a NAC é capaz de interromper a maturação de células dendríticas devido seus efeitos inibitórios sobre a transcrição do fator NF- κ B e expressão de moléculas de superfície (HLA-DR, CD86 (B7-2) e CD40). Afetando, também, as respostas primárias de linfócitos T induzidas por DCs (VERHASSELT et al., 1999). Em outro estudo, a NAC impediu a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos e a produção de fibronectina e VEGF pelo bloqueio e alteração do TGF- β 1 (SUGIURA et al., 2009).

Alturfan e colaboradores (2012) avaliaram a ação da NAC na intoxicação experimental por acrilamida no cérebro, pulmão, fígado e rins de ratos, onde foi constatado que a NAC inibiu o infiltrado neutrofílico nos tecidos, restaurando o balanço do status oxidante-antioxidante e regulando a produção de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1e IL-6). No fígado, os níveis das transaminases ALT e AST foram restaurados e a fibrose revertida, sugerindo que essa intervenção poderia ser eficaz no tratamento da fibrose hepática. Na HAE, a NAC reduziu a expressão de citocinas pro-inflamatórias (TNF- α , IL-2, IL-6 e IFN- γ) e inibiu a ativação de NF- κ B, atenuando o dano hepático (WANG et al., 2015).

Dessa forma, é possível que a NAC possa atenuar os efeitos os pró-fibróticos decorrentes da agressão imune hepática na HAE através, principalmente, da redução do estresse oxidativo nos hepatócitos, da limitação a atividade inflamatória pela redução da expressão gênica de citocinas pro-inflamatórias e pela modulação genes fibrogênicos em macrófagos e HSC. Sendo assim, é possível que a NAC juntamente com o ASC module

negativamente a atividade de células hepáticas envolvidas na imunopatogênese da hepatite autoimune.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Comparar entre camundongos controle, camundongos com HAE e camundongos com HAE tratados com ASC ou ASC mais NAC, *ex-vivo*, o perfil de ativação dos linfócitos (CD28, CD40L, CTLA-4, FoxP3, produção de IL-10 por linfócitos T e B), a expressão de marcadores fibrogênicos (α -SMA, Col1a1, PPAR- γ , ARG1, FIZZ1) e as alterações histomorfométricas (infiltrado inflamatório e produção de colágeno) no fígado.

3.2 Específicos

Comparar entre camundongos controle, camundongos com HAE e camundongos com HAE tratados com ASC ou ASC mais NAC:

- A frequência, *ex vivo*, de linfócitos hepáticos com potencial supressor (CD45R⁺IL10⁺, CD4⁺IL10⁺, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺);
- A expressão, *ex vivo*, de moléculas coestimulatórias (CD28, CD40L, CTLA-4) em linfócitos T CD4⁺ hepáticos;
- A expressão hepática, *ex vivo*, de genes associados com a produção de colágeno (α -SMA, Col1a1, PPAR- γ , ARG1 e FIZZ1);
- A expressão hepática, *ex vivo*, de genes de citocinas regulatórios (IL-10, IL-35, TGF- β);
- As alterações histomorfométricas (infiltrado inflamatório e deposição de colágeno) no tecido hepático.

3.3 Secundários

Comparar entre camundongos controle, camundongos com HAE e camundongos com HAE tratados com ASC:

- A cinética de produção, *in vivo*, dos anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*Ascaris* em 8 h, 24 h e 7 dias após indução da HAE;
- A produção, *in vitro*, de TGF- β em cultura primária de leucócitos esplênicos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Foi realizado um estudo experimental, onde hepatite autoimune experimental (HAE) foi induzida em camundongos isogênicos machos (Balb/c), entre 7-8 semanas de idade. Esses animais receberam ASC, ASC mais NAC ou PBS. Como controle do modelo, foram utilizados animais saudáveis que receberam apenas PBS. Os animais apresentaram o mesmo tempo de vida, fizeram parte da mesma linhagem e foram criados sob as mesmas condições. Devido ao processo utilizado, qualquer diferença existente entre os grupos foi atribuída à intervenção avaliada. O modelo experimental utilizado mimetiza a doença autoimune hepática humana. Entretanto, não é possível afirmar que os resultados obtidos serão reprodutíveis em seres humanos.

4.2 Preparação da concanavalina A, N-acetil-L-cisteína e extrato de vermes adultos de *Ascaris suum*

A concanavalina A tipo IV (ConA) (Sigma-Aldrich, USA) foi ressuspensa em PBS 0,01 M, pH 7,2, a uma concentração de 2 mg/ml, e filtrada em condições assépticas em filtro com porosidade de 0,22 μ m (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

A N-acetil-L-cisteína (NAC) (Sigma-Aldrich, USA) foi ressuspensa em PBS estéril 0,01 M, pH 7,2, a uma concentração de 100 mg/ml.

O extrato de vermes adultos de *A. suum* (ASC) produzido segundo protocolo utilizado por Souza et al. (2002). Alíquotas liofilizadas foram ressuspensas em PBS 0,01 M, pH 7,2, a uma concentração de 2 mg/ml, e filtradas em condições assépticas em filtro com porosidade de 0,22 μ m (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

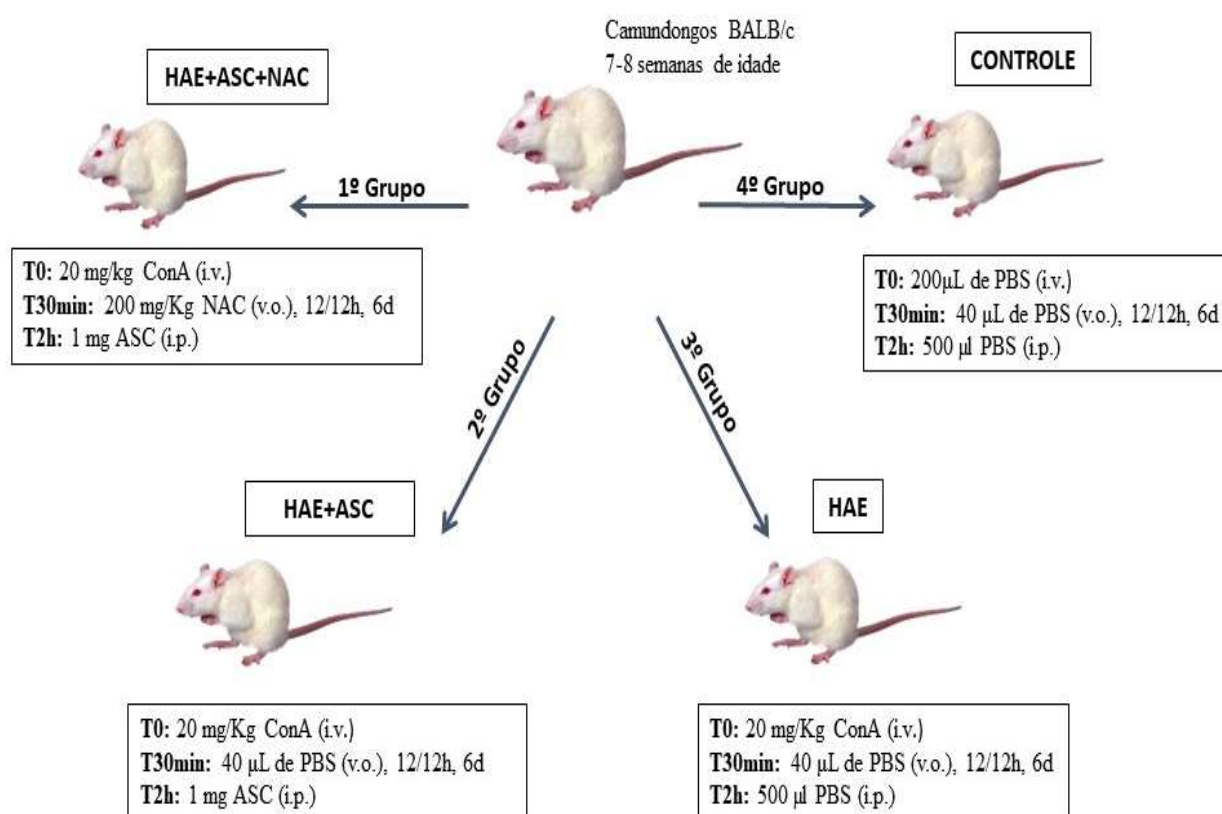
4.3 Animais, grupos de estudo e considerações éticas

Foram utilizados camundongos isogênicos machos, da linhagem BALB/c, com 7-8 semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE). Os animais experimentais foram mantidos em gaiolas, sob condições padronizadas de temperatura (22 a 23°C) e luminosidade (ciclos de 12 h de claro e 12 h de escuro), sem restrição de consumo de água e alimento.

A HAE foi induzida nos animais no tempo zero (T0) pela administração intravenosa da ConA, dose única de 20 mg/kg, através da veia caudal, e os seguintes grupos experimentais (10

animais/grupo) foram formados: 1) Grupo HAE+ASC+NAC: NAC foi administrada 30 minutos (T30min) após indução da HAE, na dose 200 mg/kg por via oral, 12/12h, durante 6 dias; e ASC 2 horas (T2h) após indução da HAE, em dose única de 1g/animal por via intraperitoneal; 2) Grupo HAE+ASC: PBS foi administrada 30 minutos (T30min) após indução da HAE, por via oral, 12/12h, durante 6 dias; e ASC 2 horas (T2h) após indução da HAE, em dose única de 1 mg/animal por via intraperitoneal; 3) Grupo HAE: PBS foi administrada 30 minutos (T30min) após indução da HAE, por via oral, 12/12h, durante 6 dias; e PBS 2 horas (T2h) após indução da HAE, em aplicação única por via intraperitoneal; e 4) Grupo controle: animais saudáveis receberam por via intravenosa PBS. Após 30 minutos, receberam PBS por via oral, 12/12h, durante 6 dias; e após 2 horas, receberam aplicação única de PBS por via intraperitoneal. A formação dos grupos experimentais foi esquematizada abaixo (Figura 5). O protocolo experimental foi idealizado a partir dos estudos de Nascimento et al. (2014) e Aires et al. (2014).

Figura 5 – Formação dos grupos de estudo



O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, sob nº 23076.041705/2015-93 (anexo 1).

4.4 Métodos de coleta de dados

4.4.1 Avaliação do desenvolvimento da hepatite autoimune experimental

Os animais foram monitorados durante 24 horas após indução da HAE e as manifestações clínicas sugestivas da lesão hepática, como sinais de prostração, dorso arqueado, pelo eriçado e colúria, bem como a presença de lesões hepáticas macroscópicas de coloração branca, levemente endurecidas a palpação, sem contornos e limites definidos no 7º dia, após eutanásia, foram registradas.

4.4.2 Eutanásia dos animais

No 7º dia após indução da HAE, os camundongos foram anestesiados por via intramuscular com solução de 10mg/Kg cloridrato de xilazina 2% e 80-115mg/Kg cloridrato de cetamina 10%. Em seguida, foram eutanasiados por deslocamento cervical. Os fígados de 3 animais de cada grupo foram perfundidos com PBS estéril e processados em ambiente estéril para isolamento dos leucócitos hepáticos. Os fígados de 7 animais de cada grupo foram extraídos cirurgicamente em ambiente estéril, seccionados e armazenados em RNAlater (ThermoFisher, Waltham, MA, USA), para extração de RNA, e formalina tamponada de Carson, para processamento histopatológico.

4.4.3 Isolamento dos linfócitos hepáticos

Os camundongos foram eutanasiados no 7º dia após indução da HAE (3 animais/grupo) e os fígados foram processados individualmente. Foi realizada uma incisão na região ventral e o fígado perfundido através da aorta abdominal com 10 ml PBS gelado, pH 7,2. Em seguida, o órgão foi extraído cirurgicamente e transferido para uma placa de Petri, contendo 10 ml de PBS gelado. A vesícula biliar foi removida e o fígado seccionado. Os fragmentos obtidos foram forçados contra um filtro de náilon de diâmetro de 70 µm (BD Falcon, Bedford, MA, USA), acoplado a um tubo Falcon (BD Falcon, Bedford, MA, USA), com auxílio de um êmbolo. O volume da suspensão foi ajustado para 50 ml com RPMI completo (50 ml de RPMI-1640; 100 mg/l de gentamicina; 1M de HEPES; 100mM de L-glutamina; 10 % soro bovino fetal – todos os reagents são Sigma-Aldrich, USA), pH 7,2. A suspensão foi centrifugada a 528 g por 10 min a 4 °C. O pellet obtido foi incubado com 10 ml de tampão enzimático (0,2g/L de collagenase, 0,02g/L de DNase, 10 ml de RPMI completo) em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por 40 minutos,

sendo ressuspensos a cada 10 minutos. Após esse período, foi adicionada a suspensão 30 ml de RPMI completo. A suspensão foi reservada no gelo por 5 minutos. Aproximadamente 35 ml do sobrenadante foi coletado e centrifugado a 528 g por 10 minutos, a 4 °C. O pellet obtido foi ressuspendido em tampão percoll 35 % (0,4 ml PBS 0,1 M; 6,1 mL de PBS 0,01 M; 3,5 mL de percoll) e centrifugado a 850 g por 30 minutos a 22 °C (off-brake). O sobrenadante foi aspirado com bomba à vácuo. As hemácias presentes no pellet foram lisadas com 1 mL de água destilada, por 18 segundos. Em seguida, foram adicionados 10 ml de meio RPMI completo e suspensão centrifugada a 480 g por 10min a 8 °C. Finalmente, foi realizado um pool com os pellets obtidos e os linfócitos contados em câmara de Neubauer. A concentração foi ajustada para 1×10^7 células/ml com RPMI completo. As células foram incubadas por 4 h em estufa a 37 °C e 5 % de CO₂, com 1 µl/ml de Golgi Stop™ (BD Biosciences, Bedford, MA, USA). O protocolo foi ajustado de acordo com Hintermann, Ehser, Christen (2012) and Blom et al. (2009).

4.4.4 Marcação para ensaio da citometria de fluxo

Passado o período de incubação, as células foram lavadas com 6 ml de solução de lavagem gelada (PBS 0.01 M; 5 % de SBF), agitadas em vórtex e centrifugadas a 528 g por 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 1 ml solução de lavagem e distribuídas nos tubos de citometria (100 µl por tubo), com concentração final de 1×10^6 células/ml. Então, procedeu-se a marcação das células com os anticorpos conforme recomendações do fabricante (eBiosciences, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA): anti-CD4-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE, anti-CD45R-PE, anti-CD152-PE, anti-CD154-PE, anti-IL10-PE and anti-FoxP3-APC. As combinações entre os anticorpos foram realizadas conforme quadro abaixo (Quadro 2). Cada anticorpo de superfície foi acrescentado em ambiente escuro na concentração recomenda (anti-CD4-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE, anti-CD45R-PE, anti-CD152-PE, anti-CD154-PE), seguido de agitação em vórtex e incubação por 30 minutos à 4°C no escuro. Passado o tempo de incubação, as células foram lavadas uma vez com 1 ml de solução de lavagem com agitação em vórtex e posterior centrifugação a 528 g por 5 minutos, a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e 200 µl de tampão de fixação foram acrescentados. As células foram incubadas por 15 minutos a 4 °C no escuro. Após este tempo, nova lavagem foi realizada com 1 ml de solução de lavagem. O sobrenadante foi descartado e aos tubos foi adicionado 500 µl da solução de permeabilização, diluída 4x, seguida de incubados por 30 minutos a 4 °C no escuro. Posteriormente, as células foram

lavadas com 1ml de solução de lavagem. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados a cada tubo os anticorpos para marcação intracelular na concentração recomenda (anti-FoxP3-APC e anti-IL10-PE). Os tubos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente em ambiente escuro. Procedeu-se nova lavagem com 1ml por tubo da solução de permeabilização diluída 10x em água destilada estéril, seguida de agitação no vótex e centrifugação em 528 g por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e acrescentou-se a cada tubo 300 µl da solução de fixação para posterior leitura em citômetro de fluxo. Os eventos (10.000) foram adquiridos e analisados com o programa CellQuest Pro (BD-Pharmingen, San Diego, CA, USA). Os resultados foram expressos pela média dos percentuais de células duplo/triplo-marcadas obtidos no pool de linfócitos de cada grupo $\pm$ desvio padrão.

Quadro 2 – Anticorpos conjugados a fluorocromos utilizados para a caracterização de linfócitos hepáticos e expressão de moléculas de interesse por citometria de fluxo

Anti-CD45R (B220) FITC	x	Anti-IL10 PE
Anti-CD4 FITC	x	Anti-CD152 (CTLA-4) PE
Anti-CD4 FITC	x	Anti-CD154 (CD40L) PE
Anti-CD4 FITC	x	Anti-CD28 PE
Anti-CD4 FITC	x	Anti-IL10 PE
Anti-CD4 FITC + Anti-CD25 PE	x	Anti-Foxp3 PE-Cy5

Fonte: Produção do próprio autor.

4.4.5 Expressão gênica hepática de *ARG1*, *FIZZ1*, *PPAR-γ*, *Colla1* e α -SMA

Os fragmentos hepáticos armazenados em RNAlater (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) foram macerados e o RNA extraído com Trizol (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Para síntese do cDNA, foi utilizado 1 µg de RNA total e o kit QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Uma alíquota de 5 µL do cDNA resultante foi amplificada através de qPCR para os genes de interesse utilizando primers específicos (*ARG1*, *FIZZ1*, *PPAR-γ*, *Colla1*, α -SMA), sob as seguintes condições: 30 segundos de desnaturação a 95 °C, 5 segundos anelamento dos primers a 55 °C e 12 segundos de alongamento a 72 °C por 40 ciclos, utilizando SYBR Green master mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), e no 7500 Real Time System (Applied Biosystems). Os resultados foram normalizados com base na expressão gene endógeno β -

actina. Os níveis da expressão relativa foram calculados usando a expressão $2^{(\Delta Ct(\beta\text{-Actin}) - \Delta Ct(\text{gene}))}$. As sequências de primers utilizadas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados

Gene alvo (Número de acesso)	Sequência 5'-3' (Forward and reverse)	Tm	CG %	Amplicon length (bp)
FIZZ1 (NM_020509)	ACTGCCTGTGCTTACTCGTTGA	50.0	62	99
	TCCACCTCTTCATTCTTAGGACAGTT	42.3	61	
PPAR- γ (NM_001308354)	TGGAATTAGATGACAGTGACTTGG	58.5	42	99
	CTCTGTGACGATCTGCCTGAG	60.2	57	
Col1a1 (NM_007742.4)	AGAACATCACCTATCACTGCAAGA	59.8	42	99
	GTGGTTTTGTATTTCGATGACTGTCT	69.6	40	
α -SMA (NM_007392.3))	GCATCCACGAAACCACCTATAAC	59.7	48	132
	ACAGAGTACTTGCGTTCTGGAG	60.0	50	
β -Actin (NM_007393.5)	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	61.1	50	147
	TGATCCACATCTGCTGGAAG	59.8	50	

Fonte: Produção do próprio autor.

4.4.6 Confeção e processamento dos cortes histológicos

Foi realizada uma secção transversal no maior lobo hepático, obtendo-se um fragmente de 5 mm, o qual foi fixado em formalina tamponada de Carson. Após fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol a partir de 70% até álcool absoluto. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol e impregnadas em parafina histológica fundida a 60°C para confecção dos cortes histológicos (4 μ m). Para avaliação do infiltrado inflamatório e da deposição de fibras de colágeno (percentual de colágeno), as lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e corados com HE e com TM, respectivamente. Após coloração, as lâminas foram desidratadas, clarificadas e selados com Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e lamínula de vidro (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010).

A avaliação histomorfométrica (infiltrado inflamatório e percentual de colágeno) foi realizada através da aquisição de pelos menos 10 micrografias aleatórias por lâmina (ampliação 200x) com Microscópio Axio Imager M2m (Zeiss) e análise com o software ImageJ® 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

4.4.7 Detecção de IgG1 e IgG2a anti-Ascaris

Para avaliação de IgG1 e IgG2a anti-*Ascaris*, amostras de sangue dos grupos controle, HAE e HAE+ASC foram coletadas em 8 horas, 24 horas e 7 dias após indução da HAE através da veia facial em tubos com EDTA. O sangue foi centrifugado a 528 g por 10 minutos e plasma armazenado a -20 ° C. Os anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*Ascaris* foram titulados usando placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Denmark) sensibilizadas com ASC (5µg/ml) e anti-anticorpos de cabra biotinizados contra IgG1 ou IgG2a de camundongo (Southern Biotechnology Associates Inc, USA). As reações foram reveladas usando o conjugado estreptoavidina-peroxidase (Sigma-Aldrich, USA) e solução de o-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich, USA) em tampão citrato 0,1 M mais peróxido de hidrogênio. As placas foram lidas em 450 nm em leitor automatizada (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Scientific). Os resultados foram expressos como a média da densidade óptica $\pm$ desvio padrão da diluição correspondente a parte linear da curva de titulação (1:10).

4.4.8 Cultura de leucócitos esplênicos e dosagem de TGF- β

No 7º após indução da HAE, os baços dos camundongos eutanasiados dos grupos HAE e HAE+ASC foram extraídos em ambiente estéril. As suspensões celulares foram preparadas como descrito por Nascimento et al. (2014), onde os leucócitos esplênicos (6×10^6 células/ml) foram cultivados em RPMI-1640 completo. As células foram incubadas em placas de 48 poços sem estímulo (basal) e sob estímulo do ASC (20 µg/ml) ou ConA (10 ng/ml), em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por 72 h. Os sobrenadantes foram coletados e TGF- β foi mensurado por ELISA de captura usando kit comercial (Invitrogen, Novex, USA). As amostras foram tratadas com HCl 1N e NaOH 1N. As reações foram executadas conforme instruções do fabricante, com limite de detecção de 62,5 pg/ml, e lidas em 450 nm em leitor automatizado (Multiskan FC Microplate Photometer, Thermo Scientific).

4.5 Análise estatística

Para comparação entre os grupos da expressão gênica e dos parâmetros avaliados na citometria de fluxo, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Para morfometria foi utilizado o teste Anova One-Way e o pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Para produção de anticorpos foi utilizado o teste Anova Two-Way e o pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni. Para produção de TGF- β foi utilizado o teste t de Student. As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e os achados foram considerados significativos

quando $p < 0,05$. Todos os procedimentos foram repetidos três vezes para avaliar a reprodutibilidade dos resultados, e um representante das três análises independentes foi apresentado.

5 RESULTADOS

5.1 Artigo 1: Associação entre o extrato de *Ascaris suum* e a N-acetil-L-cisteína induz efeito imunossupressor na hepatite autoimune experimental

INTRODUÇÃO

A hepatite autoimune experimental (HAE) induzida por Concanavalina A (ConA) é um modelo bem estabelecido que mimetiza a doença em humanos (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992; YE et al., 2018). O efeito anti-inflamatório e imunossupressivo do extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (ASC) foi demonstrado em modelos experimentais de asma alérgica, artrite reumatoide e hepatite autoimune. (CHO; PARK; SON, 2011; NASCIMENTO et al., 2014; ROCHA et al., 2008). Na HAE, o ASC atenuou o dano hepático, com indução de uma resposta imune Th2 pelo aumento dos níveis de IL-4, IL-10 e IL-13 no baço; entretanto, um aumento da fibrose foi observado nos animais (NASCIMENTO et al., 2014). A N-acetil-L-cisteína (NAC) é uma droga com efeito antioxidante, que tem capacidade imunomodulatória e ação antifibrótica. Sua ação tem sido evidenciada em diferentes doenças hepáticas (AIRES et al., 2012; ALTURFAN et al., 2012; WANG et al., 2015). A NAC tem uma ação protetora no fígado e sua associação com o ASC pode resultar em incremento do efeito protetor.

As infecções por helmintos estimulam a produção de linfócitos T e B regulatórios, que podem expressar fenotipicamente $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ e $CD45R/B220^+IL-10^+$, respectivamente (RODRÍGUEZ-PEREA et al., 2016; WĄSIK; NAZIMEK; BRYNIARSKI, 2018). Essas células liberam as citocinas que são cruciais na supressão da resposta inflamatória, mas que ao mesmo tempo podem favorecer diferenciação e ativação de células fibrogênicas, como células estreladas (HSC) e macrófagos alternativamente ativados (M2). Em HSC, ativação resulta no aumento da expressão de RNAm para α -SMA e Col1a1 e redução para PPAR- γ ; já em M2, no aumento a expressão de ARG1, FIZZ1 e Ym1 (ANTHONY et al., 2010; JABLONSKI et al., 2015).

A NAC pode conduzir a expansão periférica de linfócitos T $CD4^+CD25^+$, como relatado na lúpus eritematoso sistêmico (SEL), ou favorecer equilíbrio entre células Treg e Th17 hepáticas, como observado na HAE induzida por tricloroetano (LAI et al., 2012; WANG et al., 2019). Adicionalmente, a NAC reduz a atividade *in vitro* HSC e a expressão *in vivo* de FIZZ1 e Ym1 em macrófagos M2 (KIM et al., 2001; ZHANG et al., 2009). Sendo

assim, é possível que a NAC juntamente com o ASC module negativamente a atividade de células hepáticas envolvidas na imunopatogênese da hepatite autoimune.

Portanto, no presente trabalho foi avaliado o efeito da associação entre o ASC e NAC, no modelo de HAE induzida por ConA, sobre o perfil de ativação dos linfócitos hepáticos, expressão dos marcadores fibrogênicos e alterações histomorfométricas. Os resultados indicam que o ASC limita a expressão de moléculas coestimulatórias em linfócitos T. A associação entre o ASC e a ANC induz efeito imunossupressor na HAE, auxiliando o controle do processo inflamatório e diminuindo a expressão de genes relacionados com a produção de colágeno.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais, Extrato de *Ascaris suum*, Concanavalina A e N-acetil-L-cisteína

Foram utilizados camundongos machos, da linhagem BALB/c, com 7-8 semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE). O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas/UFPE (no 23076.041705/2015-93).

O extrato de vermes adultos de *A. suum* (ASC) produzido segundo protocolo utilizado por Souza et al. (2002). Resumidamente, vermes adultos de *A. suum* foram lavados em solução salina e homogeneizados em tampão borato (BBS) pH 8.0 em um aparelho de Ultra-Turrax (Janke e Kunkel, Staufen, Alemanha). O homogenato foi centrifugado a 10.000 g durante 1 h. Em seguida, o precipitado foi ressuspensionado em 400 ml de BBS e agitado overnight a 4 °C. A suspensão foi centrifugada e o sobrenadante dialisado contra água destilada overnight a 4 °C. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 10.000 g por 2 h e liofilizado em alíquotas. As alíquotas foram diluídas em tampão fosfato de sódio (PBS) estéril 0.01M, pH 7.2, e filtradas em condições assépticas em filtro com porosidade de 0,22 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

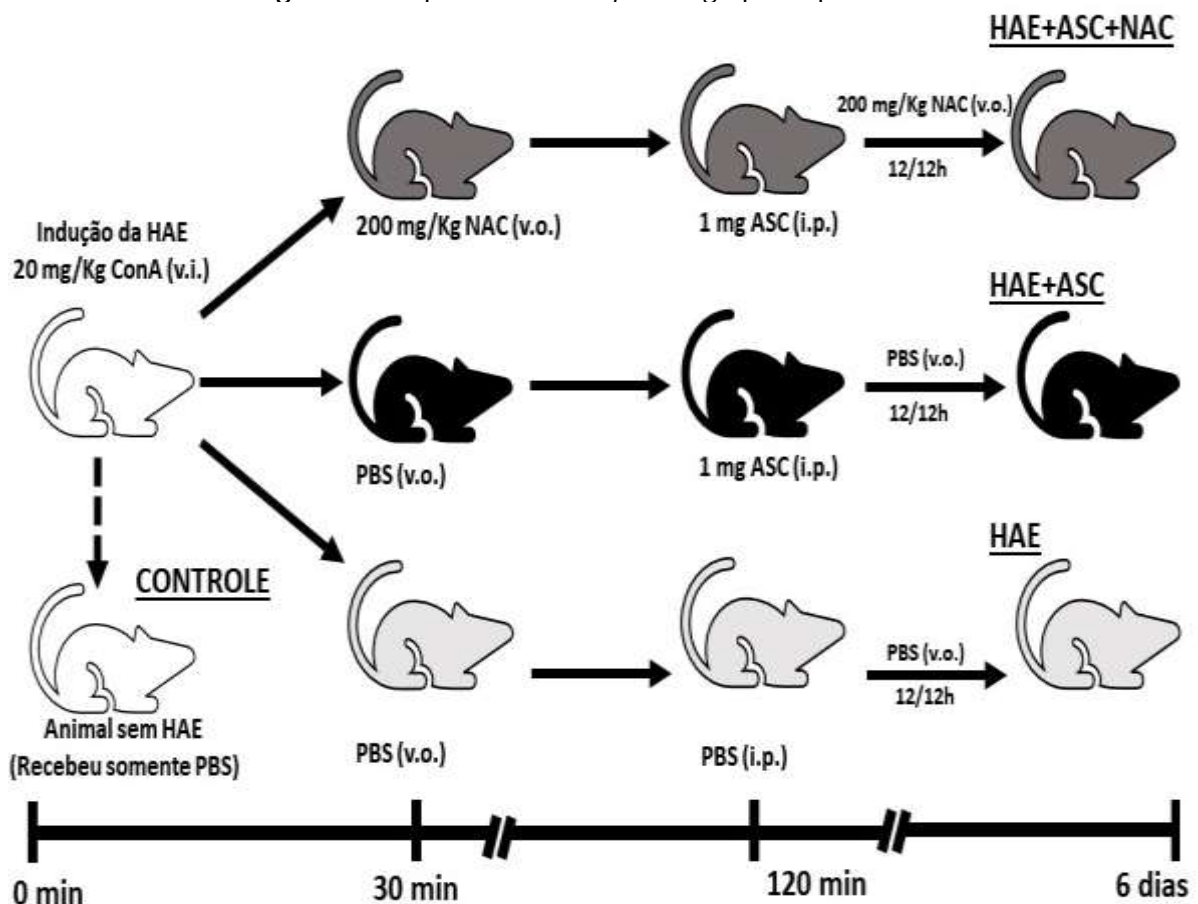
A concanavalina A tipo IV (ConA) (Sigma-Aldrich, USA) foi ressuspensionada em PBS estéril 0.01 M, pH 7.2, e filtrada em condições assépticas em filtro com porosidade de 0,22 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

A N-acetil-L-cisteína (NAC) (Sigma-Aldrich, USA) foi ressuspensionado em PBS estéril 0.01 M, pH 7.2.

Grupos experimentais e esquema terapêutico

Quatro grupos experimentais foram formados (Figura 1). A HAE foi induzida nos camundongos pela administração intravenosa de 20 mg/kg de ConA. Após 30 minutos, um grupo recebeu 200 mg/kg de NAC (oralmente, 12/12h, durante 6 dias) e após duas horas 1 mg de ASC, por via intraperitoneal (grupo HAE+ASC+NAC). Outro grupo recebeu somente PBS (oralmente) e ASC, por via intraperitoneal (grupo HAE+ASC). Outro grupo recebeu somente PBS (grupo HAE). Animais sem HAE receberam somente PBS e foram usados como controle (grupo Controle).

Figura 1 – Esquema de formação dos grupos experimentais



Fonte: Produção do próprio autor.

Isolamento dos linfócitos hepáticos

O protocolo foi ajustado de acordo com Hintermann, Ehser, Christen (2012) e Blom et al. (2009). Resumidamente, os camundongos foram eutanasiados no 7º dia após indução da HAE (n = 3 por grupo). O fígado foi perfundido com PBS gelado e seccionado. Os

fragmentos foram forçados contra um filtro de náilon de diâmetro de 70 µm (BD Falcon, Bedford, MA, USA), acoplado a um tubo Falcon (BD Falcon, Bedford, MA, USA). O volume foi ajustado para 50 ml com RPMI completo (Sigma-Aldrich, USA). A suspensão foi centrifugada a 528 g por 10 min a 4 °C. O pellet foi incubado com 10 ml de tampão enzimático em estufa a 37°C e 5% de CO₂, por 40 minutos. Foi adicionada 30 ml de RPMI completo e a suspensão reservada no gelo por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e centrifugado a 528 g por 10 min a 4 °C. O pellet foi ressuspensionado em tampão Percoll 35% (GE Healthcare) e centrifugado a 850 g por 30 minutos a 22 °C (off-brake). O sobrenadante foi aspirado e as hemácias presentes lisadas com água destilada. Foi realizado um pool dos pellets, e a concentração ajustada para 1x10⁷ células/ml. As células foram incubadas por 4 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂, com 1 µl/ml de Golgi Stop™ (BD Biosciences, Bedford, MA, USA) em RPMI completo.

Citometria de fluxo

A análise por citometria de fluxo foi realizada usando um painel de anticorpos direcionados contra antígenos celulares murinos apropriados. Os anticorpos utilizados foram os seguintes (todos são da eBiosciences, Thermo Fisher Scientific): anti-CD4-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE, anti-CD45R-PE, anti-CD40L-PE, anti-CTLA-4-PE, anti-IL10-PE and anti-FoxP3-APC.

Os linfócitos hepáticos foram incubados com anticorpos direcionados a vários antígenos da superfície celular no escuro, por 30 min a 22 °C (isto é, anti-CD4-FITC, anti-CD25-PE, anti-CD28-PE, anti-CD45R-PE, anti-CD40L-PE e anti-CTLA-4-PE), de acordo com as recomendações da fabricante. Após incubação, as preparações foram lavadas por centrifugação a 528 g por 5 min com tampão FACS (isto é, PBS contendo 5 % de soro bovino fetal, pH 7.4). Após centrifugação, o pellet de células foi fixado em PBS com paraformaldeído a 0.5 % por 15 min a 4 °C e lavado novamente. As células foram tratadas com tampão Perm/Wash (BD Biosciences, USA) e incubadas com anticorpos direcionados a antígenos intracelulares no escuro, por 30 min a 22 °C (isto é, anti-IL10-PE e anti-FoxP3). As células foram lavadas com Perm/Wash e em seguida com tampão de lavagem. Subsequentemente, as células foram ressuspensionadas com 300 µl de tampão FACS e analisadas utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), coletando pelo menos 10.000 eventos por amostra. A frequência de células positivas foi analisada usando o programa FlowJo™ software (Version 10, Ashland, OR, USA) e os

limites para os marcadores de quadrantes foram estabelecidos com base em populações negativas e controles isotípicos. Foi realizada uma análise da frequência de células no quadrante superior direito (células duplo-positivas) e os resultados foram expressos como a média da frequência de células dupla-marcadas de cada grupo.

Análise por PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

Os camundongos foram eutanasiados no 7º dia após indução da HAE e um fragmento de 2,5 mm do fígado foi armazenado em RNAlater (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA) (6 animais/grupo). O RNA total das células hepáticas foi extraído usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA complementar (cDNA) foi produzido com o kit QuantiTect Reverse Transcription (Qiagen, Hilden, Germany). A PCR quantitativa foi realizada utilizando o master mix SYBR Green (Applied Biosystems, Foster City, CA) no 7500 Real Time System (Applied Biosystems). Os resultados foram normalizados com base na expressão gene endógeno β -actina. Os níveis da expressão relativa foram calculados usando a expressão $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Os primers foram desenhados usando o Primer Designing Tool produzido pelo National Center for Biotechnology Information (NCBI) e o National Institutes of Health (NIH). As sequências de primers utilizadas estão descritas na tabela 1.

Tabela 1 – Sequências dos primers utilizados

Gene alvo (Número de acesso)	Sequência 5'-3' (Forward and reverse)	Tm	CG %	Amplicon length (bp)
ARG1 (NM_007482.3)	TGCGCCACATGAAAACCATC	59.8	50	72
	TTGGGAGGAGAAGGCGTTTG	60.2	55	
Fizz (NM_020509)	ACTGCCTGTGCTTACTCGTTGA	50.0	62	99
	TCCACCTCTTCATTCTTAGGACAGTT	42.3	61	
PPAR- γ (NM_001308354)	TGGAATTAGATGACAGTGACTTGG	58.5	42	99
	CTCTGTGACGATCTGCCTGAG	60.2	57	
Col1a1 (NM_007742.4)	AGAACATCACCTATCACTGCAAGA	59.8	42	99
	GTGGTTTTGTATTCGATGACTGTCT	69.6	40	
α -SMA (NM_007392.3))	GCATCCACGAAACCACCTATAAC	59.7	48	132
	ACAGAGTACTTGCGTTCTGGAG	60.0	50	
β -Actin (NM_007393.5)	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	61.1	50	147
	TGATCCACATCTGCTGGAAG	59.8	50	

Fonte: Produção do próprio autor.

Confecção e processamento dos cortes histológicos

Foi realizada uma secção transversal no maior lobo hepático, obtendo-se um fragmente de 5mm, o qual foi fixado em formalina tamponada de Carson (7 animais grupo). Após fixação, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol a partir de 70% até álcool absoluto. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol e impregnadas em parafina histológica fundida a 60°C para confecção dos cortes histológicos (4µm). Para avaliação do infiltrado inflamatório e da deposição de fibras de colágeno (percentual de colágeno), as lâminas foram desparafinizadas, hidratadas e corados com HE e com TM, respectivamente. Após coloração, as lâminas foram desidratadas, clarificadas e selados com Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e lamínula de vidro (MOLINARO; CAPUTO; AMENDOEIRA, 2010).

A avaliação histomorfométrica (infiltrado inflamatório e percentual de colágeno) foi realizada através da aquisição de pelos menos 10 micrografias aleatórias por lâmina (ampliação 200x) com Microscópio Axio Imager M2m (Zeiss) e análise com o software ImageJ® 1.48v (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA).

Análise estatística

Para comparação entre os grupos da expressão gênica e dos parâmetros avaliados na citometria de fluxo, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de comparação múltipla de Dunn. Para histomorfometria foi utilizado o teste Anova One-Way e o pós-teste de comparação múltipla de Tukey. As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e os achados foram considerados significativos quando $p < 0.05$. Todos os procedimentos foram repetidos três vezes para avaliar a reprodutibilidade dos resultados, e um representante das três análises independentes foi apresentado.

RESULTADOS

Perfil de ativação dos linfócitos hepáticos na HAE sob tratamento com ASC ou ASC+NAC

Os linfócitos CD4⁺ hepáticos isolados foram marcados com anticorpos fluorescentes para caracterização da expressão de moléculas coestimulatórias CD28 e CD40L e inibitória CTLA-4. Houve aumento significativo da expressão das moléculas nos animais com HAE em relação ao grupo Controle (Figura 2A-C). Entretanto, houve uma diminuição de seis vezes na frequência de células CD4⁺CD40L⁺ (Figura 2A) e CD4⁺CD28⁺ (Figura 2B) e duas vezes na frequência de células CD4⁺CTLA-4⁺ (Figura 2C) no grupo HAE+ASC em relação ao grupo HAE. Não houve diferença estatística no grupo HAE+ASC+NAC em comparação ao grupo HAE.

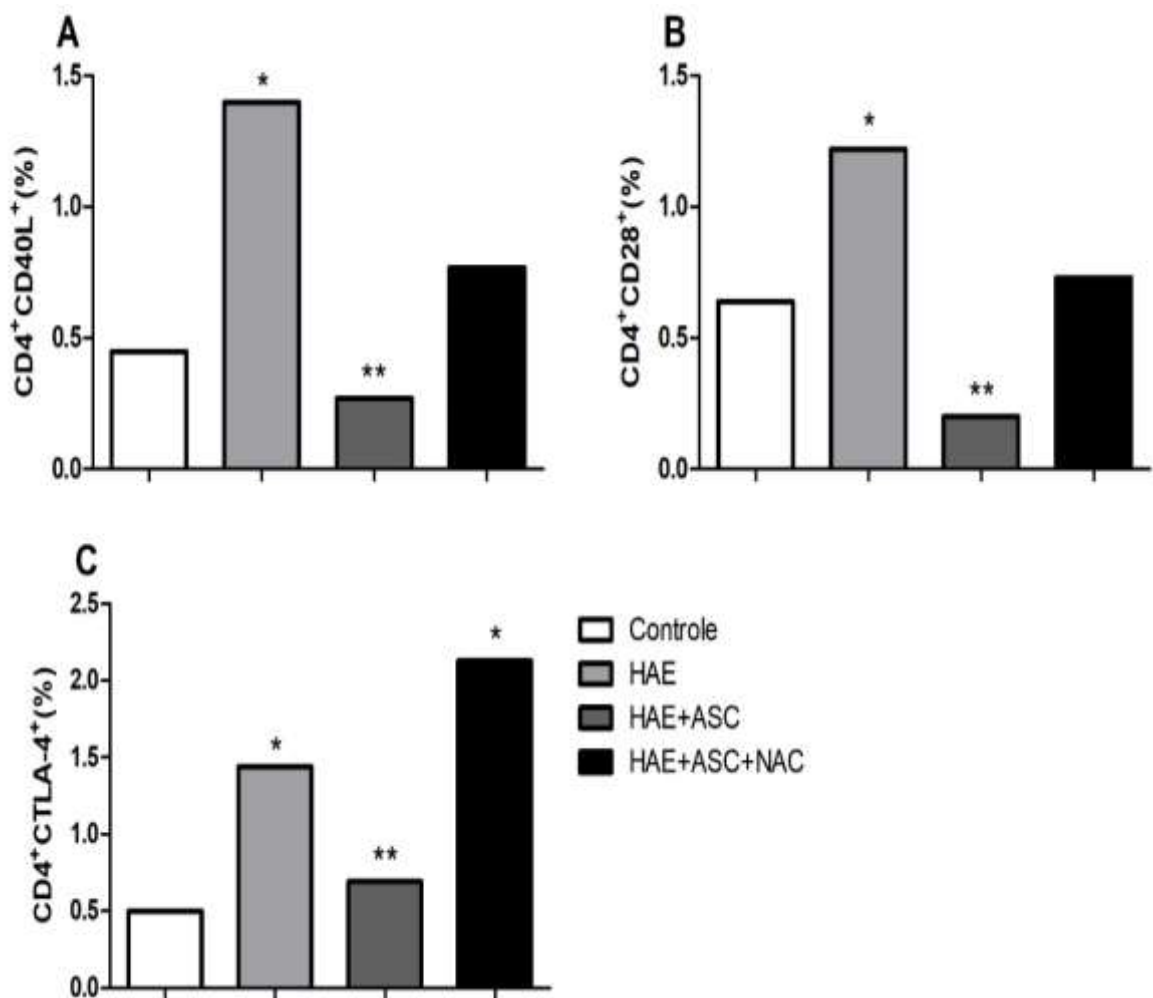


Figura 2. Expressão das moléculas CD40L (A), CD28 (B) e CTLA-4 (C) em linfócitos hepáticos de camundongos BALB/c, 7 dias após indução da hepatite autoimune experimental (HAE) e tratamento com extrato solúvel de *Ascaris suum* (ASC) ou ASC mais N-acetil-L-cisteína (NAC), avaliado por citometria de fluxo. Os resultados representam a frequência de células duplo-marcadas do pool de 3 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. ** $p < 0.05$ em relação ao grupo HAE.

Os linfócitos T e B com potencial supressivo (produtores de IL-10 e os linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) também foram quantificados. Pôde ser observado que não houve

diferença estatística na frequência de células $CD4^+IL-10^+$ (Figura 3A) e $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (Figura 3B) entre os grupos HAE e Controle. Ao comparar os grupos com HAE e tratados apenas com ASC houve menor frequência de células $CD4^+IL-10^+$, mas sem alteração na frequência das células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Porém, nos grupos que receberam ASC+NAC houve aumento de células $CD4^+IL-10^+$ e $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Em relação aos linfócitos B $CD45R^+IL-10^+$, houve menor frequência em todos os grupos em relação ao grupo Controle (Figura 3C).

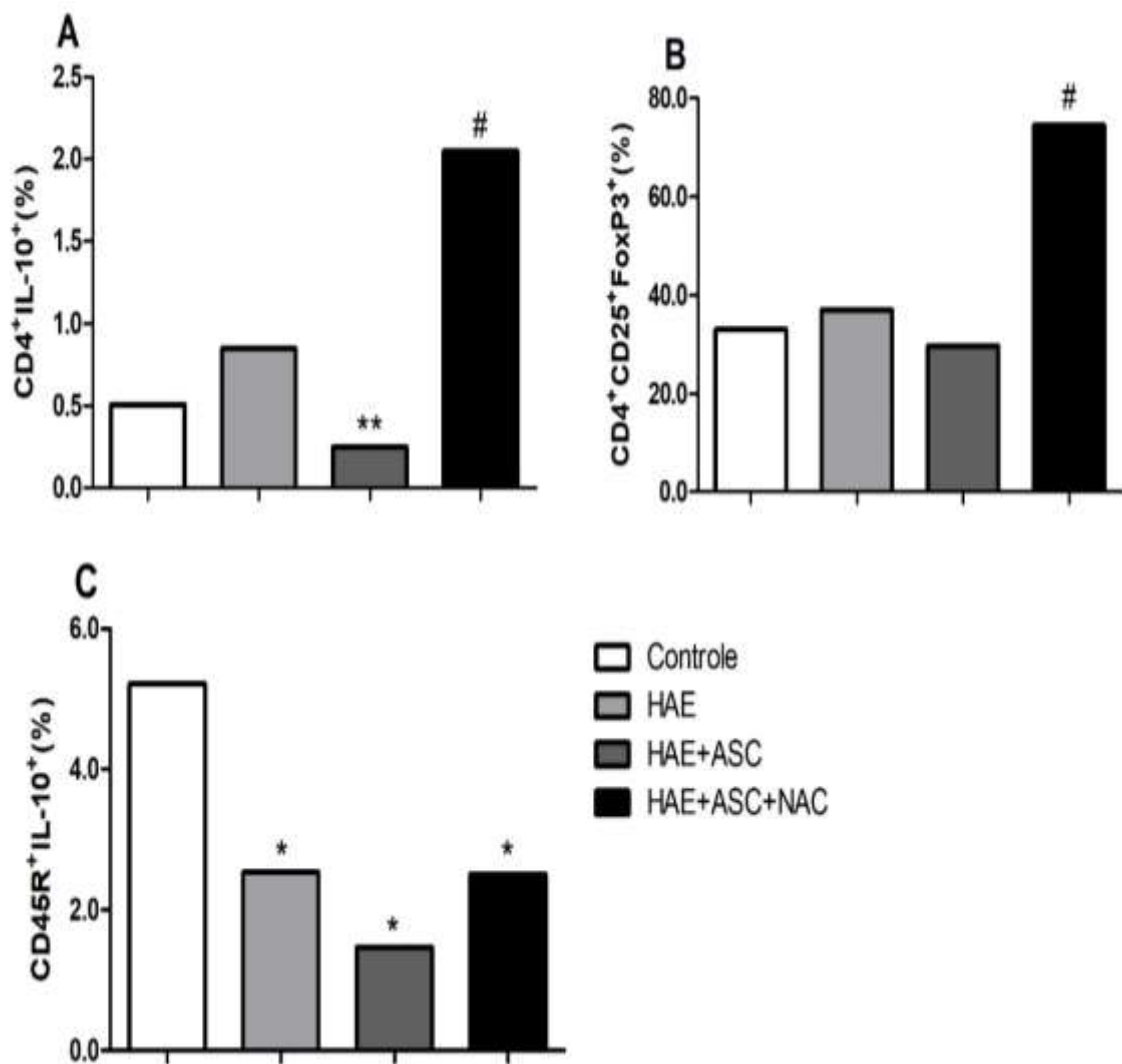


Figura 3. Frequência de linfócitos hepáticos com potencial supressivo no fígado de camundongos BALB/c, 7 dias após indução da hepatite autoimune experimental (HAE) e tratamento com extrato solúvel de *Ascaris suum* (ASC) ou ASC mais N-acetil-L-cisteína (NAC), avaliado por citometria de fluxo. Linfócitos T $CD4^+IL10^+$ (A), linfócitos T $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (B), linfócitos B $CD45R^+IL10^+$ (C). Os resultados representam a frequência de células duplo-marcadas do pool de 3 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. ** $p < 0.05$ em relação ao grupo HAE. # $p < 0.05$ em relação aos grupos controle, HAE e HAE+ASC.

Avaliação da expressão gênica de marcadores fibrogênicos no tecido hepático de animais com HAE sob tratamento com ASC ou ASC+NAC

A expressão de *Col1a1* e α -SMA (Figura 4A e 4B) foi maior nos grupos que receberam ASC, com ou sem a NAC. Entretanto, o aumento foi estatisticamente significativo para *Col1a1* quando comparados aos grupos Controle e HAE. Do contrário, houve drástica redução da expressão *Fizz* (Figura 4C) nos grupos HAE+ASC e HAE+ASC+NAC quando comparados com os grupos Controle e HAE.

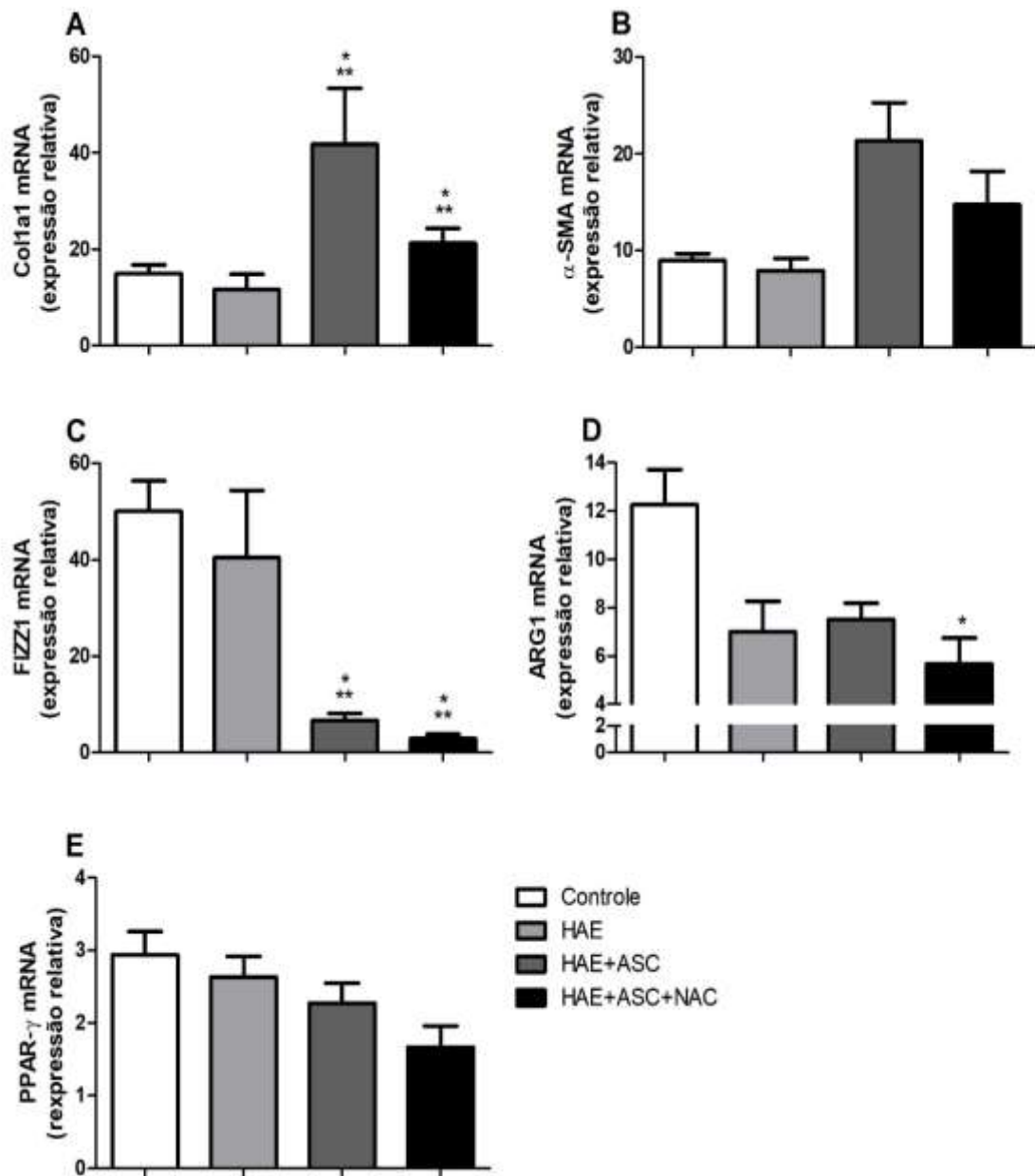


Figura 4. Expressão relativa do mRNA de *Col1a1* (A), α -SMA (B), *FIZZ1* (C), *ARG1* (D) e *PPAR-γ* (E) no fígado de camundongos BALB/c, 7 dias após indução da hepatite autoimune experimental (HAE) e tratamento com extrato solúvel de *Ascaris suum* (ASC) ou ASC mais N-acetil-L-cisteína (NAC), avaliado por

qPCR. Os resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais/grupo. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. ** $p < 0.05$ em relação ao grupo controle. ** $p < 0.05$ em relação ao grupo HAE.

A expressão de ARG (Figura 4D e 4E) foi significativamente menor no grupo HAE+ASC+NAC, em relação ao grupo Controle. Apesar de menor expressão de PPAR- γ nos grupos HAE+ASC+NAC, não houve diferença estatística.

Histomorfometria do fígado de animais com HAE sob tratamento com ASC ou ASC+NAC

A análise histomorfométrica do fígado mostrou maior número de leucócitos e aumento deposição de colágeno nos grupos HAE e HAE+ASC em relação ao grupo Controle (Tabela 2). Contudo, no grupo HAE+ASC+NAC houve significativa redução da produção de colágeno, em relação aos grupos HAE e HAE+ASC, e diminuição de leucócitos em comparação a este primeiro grupo.

Tabela 2 – Histomorfometria do fígado após tratamento com ASC ou ASC+NAC

Grupos	Histologia	Morfometria
	Leucócitos/campo ($\pm$ DP) [§]	Colágeno % ($\pm$ DP) [¥]
CONTROLE	100 (20,60)	135 (2,16)
HAE	204 (13,11)*	175 (7,50)*
HAE+ASC	172 (15,12)*	181 (7,32)*
HAE+ASC+NAC	138 (19,97) [#]	155 (4,04) ^{*#£}

[§]Média $\pm$ desvio padrão de leucócitos contados por campo usando o software ImageJ. [¥]Média $\pm$ desvio padrão do percentual de colágeno usando o software ImageJ * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. ** $p < 0,05$ em relação ao grupo HAE. # $p < 0,05$ em relação ao grupo HAE+ASC.

DISCUSSÃO

O modelo animal da hepatite autoimune induzida por ConA possui mecanismos e características semelhantes aos da hepatite autoimune clínica, sendo um bom modelo para estudo da doença e para o desenvolvimento de novas terapias (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992; YE et al., 2018). Aqui, pela primeira vez, nós observamos que os animais com HAE apresentaram aumento da expressão das moléculas coestimulatórias CD28 e CD40L em linfócitos hepáticos, sugerindo um desvio de balanço positivo/upregulation do

status de ativação celular. Embora tenha sido possível observar linfócitos T e B com potencial supressivo e discreto aumento de CTLA-4. Em conjunto, o perfil observado se encaixa ao início do desenvolvimento da tolerância a ConA, em resposta a IL-10 produzida por células de Kupffer e linfócitos T CD4⁺CD25⁺, após 7 dias indução da HAE (ERHARDT et al., 2007). Previamente, foi demonstrado que o tratamento com ASC apresentou efeito hepatoprotetor nesse modelo com indução de Th2/IL-10 (NASCIMENTO et al., 2014). Neste trabalho, demonstramos que a ação supressora do ASC no fígado pode estar relacionada à redução da expressão de moléculas coestimulatórias em linfócitos T (CD28 e CD40L) e aumento da expressão gênica de FIZZ1. Adicionalmente, a NAC auxiliou o ASC no controle da HAE pela expansão células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e CD4⁺IL-10⁺, reduziu o infiltrado inflamatório e deposição de colágeno.

A injúria hepática na HAE é resultado da uma intensa resposta inflamatória, que resulta de falhas na autotolerância e na disfunção de linfócitos T, com células T CD4 e CD8 altamente ativadas (YE et al., 2018). O ASC suprime a expressão dessas moléculas, com grande redução de CD28 e CD40L, e discreta diminuição da expressão de CTLA-4. CD28 participa do processo de ativação do linfócito T autorreativo e o CD40L na função efetora dos linfócitos T, entre elas a colaboração com os linfócitos B na produção de anticorpos (ALEGRE; THOMPSON; GAJEWSKI, 1998; LONGHI et al., 2010). Estes resultados corroboram o efeito imunossupressivo do ASC e a diminuição de imunoglobulinas observada por Nascimento et al (NASCIMENTO et al., 2014).

Nos animais que receberam ASC+NAC houve aumento de linfócitos T produtores de IL-10 e linfócitos T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺. Como observado no lúpus eritematoso sistêmico, a NAC pode conduzir a expansão de T CD4⁺CD25⁺ e aumento da expressão de FoxP3⁺ (LAI et al., 2012). Sabendo que a diminuição do número de linfócitos T CD4⁺CD25⁺ e de sua capacidade de expansão podem favorecer o surgimento da HAI (LONGHI et al., 2004), a NAC pode atuar no controle da HAE pela expansão deste subtipo de linfócito T com caráter supressor.

Sendo assim, em relação ao perfil de ativação dos linfócitos T, é possível sugerir que a associação entre o ASC e a NAC tenham um efeito supressor: o ASC diminui a ativação celular pela menor expressão de moléculas coestimulatórias e a NAC pela expansão de linfócitos T CD4⁺ com potencial supressor. Contudo, a geração/expansão das T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ observadas na presença da NAC pode ser dependente da produção de TGF-β. Apesar do aumento significativo de células T CD4⁺IL-10⁺ no grupo HAE+ASC+NAC, a população de linfócitos B CD45⁺IL-10⁺ diminuiu em todos os animais

com HAE. Os nossos resultados descartam os linfócitos B como fonte de IL-10, porém estamos cientes que não podemos excluir a participação dos linfócitos B regulatórios.

O tratamento com ASC apresentou efeito protetor na HAE, entretanto a fibrose ainda ocorreu (NASCIMENTO et al., 2014). Aqui, foi observado aumento da expressão de RNAm para α -SMA e Col1a1 e discreta redução para PPAR- γ nos animais do grupo HAE+ASC, sugerindo ativação da HSC (ANTHONY et al., 2010). Contudo, a expressão de RNAm para Fizz e ARG1, comprometidos com o controle macrófagos M2 (JABLONSKI et al., 2015), diminuiu nos grupos que receberam o ASC e ASC+NAC, respectivamente. Este achado pode estar relacionado com a menor produção de colágeno nesse último grupo. Sabendo que a ativação das HSC e a proporção do balanço entre macrófagos M1 e M2 são um evento chave no desenvolvimento da fibrose hepática (ANTHONY et al., 2010), é possível que na presença da NAC, o efeito do ASC em suprimir M2 sobreponha o potencial de ativação das HSC. Entretanto, esta hipótese precisa ser investigada.

No geral, os resultados indicam que a ação do ASC no fígado é limitar a expressão de moléculas coestimulatórias CD28 e CD40L em linfócitos T. A NAC tende a melhorar a expansão de células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ e T CD4⁺IL10⁺, auxiliando no controle do processo inflamatório e diminuindo a expressão dos genes FIZZ1 e ARG1, relacionados com a produção de colágeno. A compreensão do perfil de ativação de células imunes e as alterações na expressão de marcadores celulares na HAE, é essencial para determinar os fatores que influenciam o prognóstico da doença e auxiliar o desenvolvimento de terapias alternativas usando moléculas com potencial imunomodulatório. Essas podem incluir a síntese de análogos do *A. suum* que estimulem tolerância imunológica.

REFERÊNCIAS

- AIRES, A. DE L. et al. Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine. **Parasitology research**, v. 111, n. 4, p. 1569–78, out. 2012.
- ALEGRE, M.-L.; THOMPSON, C. B.; GAJEWSKI, T. F. Second Signals for Lymphocyte Activation. In: **Encyclopedia of Immunology**. [s.l.] Elsevier, 1998. p. 2145–2151.
- ALTURFAN, E. I. et al. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against acrylamide-induced oxidative stress in rats. **Anim. Sci**, v. 36, n. 4, p. 438–445, 2012.
- ANTHONY, B. et al. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. **Parasites and Vectors**, 2010.

- ANTUNES, M. F. P. et al. Immunosuppressive PAS-1 is an excretory/secretory protein released by larval and adult worms of the ascarid nematode *Ascaris suum*. **Journal of helminthology**, v. 2, p. 1–8, 7 abr. 2014.
- BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. Interleukin 10- and Fc γ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2101–8, abr. 2005.
- CHO, E. S.; PARK, B. K.; SON, H. Y. Effects of *Ascaris suum* extract and sulfamethoxazole on allergic airway inflammation. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 19, n. 4, p. 466–471, 2011.
- DE ARAÚJO, C. A A et al. PAS-1, an *Ascaris suum* protein, modulates allergic airway inflammation via CD8 $\gamma\delta$ TCR $^{+}$ and CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FoxP3 $^{+}$ T cells. **Scandinavian journal of immunology**, v. 72, n. 6, p. 491–503, dez. 2010.
- ERHARDT, A. et al. IL-10, regulatory T cells, and Kupffer cells mediate tolerance in concanavalin A-induced liver injury in mice. **Hepatology**, v. 45, n. 2, p. 475–485, 2007.
- FAIRFAX, K. C. et al. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002490, jan. 2012.
- FERREIRA, A. P. et al. Immunization with ascaris suum extract impairs T cell functions in mice. **Cellular Immunology**, v. 162, n. 2, p. 202–210, 1995.
- GAZZINELLI-GUIMARÃES, A. C. et al. IgG Induced by Vaccination With *Ascaris suum* Extracts Is Protective Against Infection. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2535, 2018.
- JABLONSKI, K. A. et al. Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages. **PLoS ONE**, v. 10 n.12: e0145342. 2015.
- KIM, K. Y. et al. N-Acetylcysteine Induces Cell Cycle Arrest in Hepatic Stellate Cells through Its Reducing Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 40591–40598, 2 nov. 2001.
- LAI, Z. W. et al. N-acetylcysteine reduces disease activity by blocking mammalian target of rapamycin in T cells from systemic lupus erythematosus patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 9, p. 2937–2946, 2012.
- LONGHI, M. S. et al. Impairment of CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ regulatory T-cells in autoimmune liver disease. **Journal of Hepatology**, v. 41, n. 1, p. 31–37, jul. 2004.
- LONGHI, M. S. et al. Adaptive Immunity in Autoimmune Hepatitis. **Digestive Diseases**, v. 28, n. 1, p. 63–69, 2010.
- NASCIMENTO, W. C. et al. Immunomodulation of liver injury by *Ascaris suum* extract in an experimental model of autoimmune hepatitis. **Parasitology research**, v. 113, n. 9, p. 3309–

17, set. 2014.

ROCHA, F. A. C. et al. Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models. **Infection and immunity**, v. 76, n. 6, p. 2736–45, 1 jun. 2008.

RODRÍGUEZ-PEREA, A. L. et al. Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. **Clinical and experimental immunology**, v. 185, n. 3, p. 281–91, 2016.

ROLOT, M.; DEWALS, B. G. Macrophage Activation and Functions during Helminth Infection: Recent Advances from the Laboratory Mouse. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–17, 2 jul. 2018.

SOUZA, V. M. O.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 1, p. 81–89, jan. 2002.

SOUZA, V. M. O.; JACYSYN, J. F.; MACEDO, M. S. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from *Ascaris suum*. **Cytokine**, v. 28, n. 2, p. 92–100, 21 out. 2004.

TIEGS, G.; HENTSCHEL, J.; WENDEL, A. AT cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. July, p. 196–203, 1992.

TITZ, T. DE O. et al. *Ascaris suum* infection modulates inflammation: Implication of CD4 + CD25 high Foxp3 + T cells and IL-10. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 9, p. e12453, set. 2017.

WANG, C. et al. Protective Effects of N-Acetylcysteine in Concanavalin A-Induced Hepatitis in Mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 1–17, 2015.

WANG, H. et al. Redox regulation of hepatic NLRP3 inflammasome activation and immune dysregulation in trichloroethene-mediated autoimmunity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 143, p. 223–231, nov. 2019.

WĄSIK, M.; NAZIMEK, K.; BRYNIARSKI, K. Regulatory B cell phenotype and mechanism of action: the impact of stimulating conditions. **Microbiology and Immunology**, v. 62, n. 8, p. 485–496, 2018.

WEI, H.-X. et al. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF-beta-dependent manner in mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 10, p. 7221–9, 15 nov. 2008.

WEI, J. et al. Yeast-expressed recombinant As16 protects mice against *Ascaris suum* infection through induction of a Th2-skewed immune response. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005769, 14 jul. 2017.

- YE, T. et al. Comparison of Concanavalin a-Induced Murine Autoimmune Hepatitis Models. **Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology**, v. 46, n. 3, p. 1241–1251, 2018.
- ZHANG, L. et al. Oxidative Stress and Asthma: Proteome Analysis of Chitinase-like Proteins and FIZZ1 in Lung Tissue and Bronchoalveolar Lavage Fluid. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 4, p. 1631, 2009.

5.2 Artigo 2: Extrato de *Ascaris suum* induz TGF- β e produção precoce IgG1 na hepatite autoimune experimental (Anexo B)

INTRODUÇÃO

O extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (ASC) suprime a resposta inflamatória a antígenos heterólogos por mecanismos dependentes de IL-10/TGF- β e células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (DE ARAÚJO et al., 2010; SOUZA et al., 2002). Na hepatite autoimune experimental (HAE), foi demonstrado que o ASC apresentou efeito protetor ao promover aumento dos níveis de IL-4, IL-10 e IL-13, acompanhado por redução do infiltrado inflamatório e restauração das transaminases (NASCIMENTO et al., 2014). Entretanto, os níveis do TGF- β e dos isótipos de IgG anti-*Ascaris* neste modelo de inflamação não foram avaliados.

O ASC induz uma resposta Th2 que foi correlacionada com a supressão in vivo e síntese de IL-10 e IL-4 (FERREIRA et al., 1995). Imunização com PAS-1, uma proteína do *A. suum*, estimula a resposta Th2 com produção de IL-10 e TGF- β na asma alérgica induzida por OVA em camundongos (DE ARAÚJO et al., 2010). Com relação as subclasses de IgG, a imunização com extrato de vermes adultos, larvas ou cutícula de vermes de *A. suum* confere imunidade protetora a infecção pela indução de anticorpos das subclasses IgG1 e IgG3 anti-*Ascaris* (GAZZINELLI-GUIMARÃES et al., 2018). A imunização com As16, uma proteína geneticamente relacionada ao *A. suum*, também induz uma resposta Th2 predominante, com altos títulos sorológicos de IgG1 (WEI et al., 2017). É sabido que isótipos de IgG ativam macrófagos produtores de IL-10, prejudicando a resposta Th1 (ROLOT; DEWALS, 2018). É possível que o ASC auxilie no controle no processo inflamatório induzindo um perfil regulatório via IgG1/IL-10 e TGF- β . Apesar do conhecimento de que o tratamento com ASC provocou modulação negativa da imunopatologia na HAE, com desenvolvimento de uma resposta imune de perfil Th2, a avaliação de outras vias de modulação se fez necessária.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais, extrato de *Ascaris suum* e concanavalina A

Foram utilizados camundongos machos BALB/c provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE). O extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* foi obtido de acordo com protocolo de Souza et al. (2002). A Concanavalina (ConA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi diluída em PBS estéril 0,01 M, pH 7,2.

Grupos experimentais

Três grupos experimentais foram formados. A HAE foi induzida nos camundongos pela administração intravenosa de 20 mg/kg de ConA diluída em PBS estéril (2 mg/ml). Após duas horas, alguns destes animais receberam PBS (i.p.) (grupo HAE) e os animais remanescentes receberam 1 mg de ASC (i.p) (grupo HAE+ASC). Animais controle receberam somente PBS (grupo controle). O modelo experimental e parâmetros da hepatite foram ajustados como descrito por Nascimento et al. (2014). Este protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas/UFPE (no 23076.041705/2015-93).

Detecção de anticorpos anti-*Ascaris* usando ELISA

Amostras de sangue foram colhidas em 8 h, 24 h e 7 dias após indução da HAE. Os anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*Ascaris* foram titulados usando placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Denmark) sensibilizadas com ASC (5µg/ml) e anti-anticorpos de cabra biotinizados contra IgG1 ou IgG2a de camundongo (Southern Biotechnology Associates Inc, USA). As reações foram reveladas usando o conjugado estreptoavidina-HRP (Sigma-Aldrich, USA) e solução de o-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich, USA) em tampão citrato 0,1 M mais H₂O₂. As placas foram lidas em 450 nm. Os resultados foram expressos como a média da densidade óptica ± desvio padrão da diluição correspondente a parte linear da curva de titulação (1:10).

Cultura de células esplênicas e dosagem de TGF-β usando ELISA

Sete dias após indução da HAE, os baços dos camundongos eutanasiados dos grupos HAE e HAE+ASC foram extraídos. As suspensões celulares foram preparadas como descrito por Nascimento et al. (2014) e os sobrenadantes foram coletados (72 h) e TGF- β foi mensurado por ELISA de captura usando kit comercial (Invitrogen, Novex, USA).

Análise estatística

Para análise da produção de anticorpos, o teste Anova Two-Way foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. As comparações múltiplas foram realizadas utilizando o teste de Bonferroni. Para análise da produção de TGF- β , foi utilizado o teste t. As análises estatísticas foram realizadas com o GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e os achados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Todos os procedimentos foram repetidos três vezes para avaliar a reprodutibilidade dos resultados, e um representante das três análises independentes foi apresentado.

RESULTADOS

No grupo HAE, os níveis de IgG1 e IgG2a anti-*Ascaris* foram baixíssimos e seguiram a mesma cinética, com níveis muito menores em 24 h. No grupo HAE+ASC a produção de IgG2a somente ocorreu no 7º dia e foi em níveis maiores em comparação ao grupo HAE. Com relação à produção de IgG1 anti-*Ascaris* houve produção nas 8 h, 24 h e 7º dia, mas significativamente maior nesses dois últimos tempos (**Figura 1A**), quando comparado ao grupo HAE. No grupo Controle não houve produção de anticorpos anti-*Ascaris* (dados não mostrados).

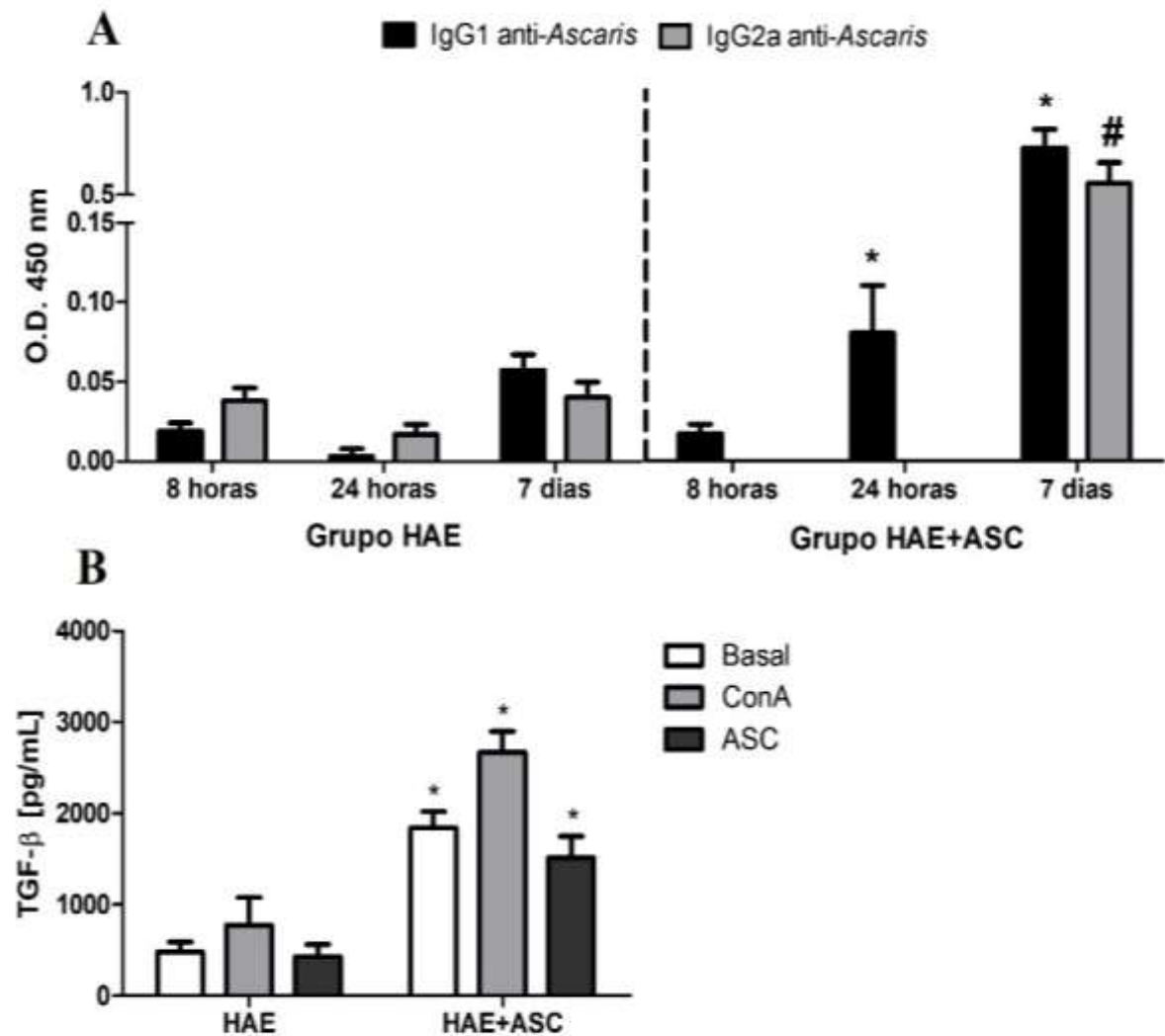


Figura 1. Níveis dos isótipos IgG1 e IgG2a anti-*Ascaris* (A) no plasma de camundongos BALB/c em 8h, 24h e 7 dias após indução da Hepatite Autoimune Experimental (HAE) e tratamento com o extrato solúvel de vermes adultos de *Ascaris suum* (ASC) dosados por ELISA. Níveis de TGF-β (B) em cultura de esplenócitos dos grupos HAE e HAE+ASC (72 h; 6×10^6 células/mL), sete dias após de indução da HAE. Os esplenócitos foram cultivados somente com meio (Basal) e estimulados com ConA (10 ng/mL) ou ASC (20 µg/mL). Os resultados apresentam a média $\pm$ desvio padrão de 6 animais/grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo HAE para IgG1. # $p < 0,05$ em relação ao grupo HAE para IgG2a. £ $p < 0,05$ em relação ao grupo HAE para TGF-β.

TGF-β foi mensurado no sobrenadante da cultura de esplenócitos cultivados somente com meio (basal) e estimulados com ConA ou ASC. Sob essas condições, a produção de TGF-β foi estatisticamente maior no grupo HAE+ASC em relação ao grupo HAE (Figura 1B).

DISCUSSÃO

A administração do extrato de *A. suum* atenuou o dano hepático (restauração dos marcadores bioquímicos e controle do processo inflamatório) na HAE por desviar a resposta imune Th1 para um padrão Th2/IL-10 (NASCIMENTO et al., 2014). Aqui, foi possível demonstrar que o tratamento com ASC induziu níveis elevados de TGF- β , IgG1 e IgG2a anti-*Ascaris*, porém IgG1 foi produzido de forma precoce e em maiores níveis.

No grupo HAE foi observado a produção de anticorpos específicos anti-*Ascaris*. Isto pode ser explicado pela administração da ConA. Ela conduz a expansão policlonal de linfócitos T e, consequentemente, os linfócitos B (TIEGS et al., 1992). Em relação ao grupo HAE+ASC, a cinética de produção dos isótipos IgG1 e IgG2a foi distinta. O isótipo IgG2a teve produção detectada apenas no 7º dia. Contrariamente, a produção de IgG1 ocorreu em níveis maiores já nas 24 horas, bem como no 7º dia. Esse resultado corrobora o direcionamento da resposta imune na HAE pelo ASC para um perfil Th2, já nas 24 horas. É conhecido que IgG1 faz o troca de classe para IL-4 e é ASC dependente (SILVA et al., 2006). De fato, a produção de IgG1 se inicia junto com maiores níveis de IL-4 e IL-13 (NASCIMENTO et al., 2014).

A relação entre IgG-Fc γ R e a síntese de IL-10 via macrófagos é conhecida em modelos experimental com parasitas (BUXBAUM; SCOTT, 2005; FAIRFAX et al., 2012). Antígenos de helmintos induzem um microambiente hepático com altos níveis de IL-4 e IL-10, que pode promover a diferenciação de macrófagos produtores de IL-10, chamados de M2, os quais são relevantes no reparo tecidual (ROLOT; DEWALS, 2018). Na HAE, o ASC ocasiona aumento de IL-4, IL-10 e IL-13 (NASCIMENTO et al., 2014). IL-10 é crucial para indução de tolerância na HAE. É possível que o desvio da produção deste isótipo para a subclasse IgG1, em resposta ao ASC, esteja modulando negativamente a lesão na HAE através da indução de IL-10 por macrófagos e, precocemente (24 horas). Testes com camundongos knockout Fc γ R poderiam auxiliar na confirmação da hipótese.

Em adição a produção de IL-10 via IgG1, é possível que a supressão mediada pelo ASC na HAE também seja pela indução de TGF- β . O bloqueio do TGF- β suprime a função de linfócitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, tornando os camundongos mais susceptíveis a HAE (WEI et al., 2008). Aqui, o tratamento com o ASC induziu níveis elevados de TGF- β . Entretanto, o papel de outras citocinas inflamatórias (IL-17, IL-22) merece ser estudado.

CONCLUSÃO

Em conclusão, os níveis mais altos de IgG1 e TGF- β podem indicar controle da resposta da resposta Th1 durante a HAE. Entretanto, mais estudos são necessários para confirma esta hipótese. A compreensão dos mecanismos modulatórios, bem como a identificação e caracterização das moléculas envolvidas nesse processo, poderão auxiliar no desenvolvimento de terapias alternativas e econômicas para o tratamento de doenças inflamatórias, como a síntese de análogos do *A. suum* que estimulem tolerância imunológica.

REFERÊNCIAS

- ANTUNES, M. F. P. et al. Immunosuppressive PAS-1 is an excretory/secretory protein released by larval and adult worms of the ascarid nematode *Ascaris suum*. **Journal of helminthology**, v. 2, p. 1–8, 7 abr. 2014.
- BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. Interleukin 10- and Fc γ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2101–8, abr. 2005.
- DE ARAÚJO, C. A A et al. PAS-1, an *Ascaris suum* protein, modulates allergic airway inflammation via CD8+ $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+CD25+FoxP3+ T cells. **Scandinavian journal of immunology**, v. 72, n. 6, p. 491–503, dez. 2010.
- FAIRFAX, K. C. et al. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis *mansoni* results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002490, jan. 2012.
- FERREIRA, A. P. et al. Immunization with ascaris *suum* extract impairs T cell functions in mice. **Cellular Immunology**, v. 162, n. 2, p. 202–210, 1995.
- GAZZINELLI-GUIMARÃES, A. C. et al. IgG Induced by Vaccination With *Ascaris suum* Extracts Is Protective Against Infection. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 2535, 2018.
- NASCIMENTO, W. C. et al. Immunomodulation of liver injury by *Ascaris suum* extract in an experimental model of autoimmune hepatitis. **Parasitology research**, v. 113, n. 9, p. 3309–17, set. 2014.
- ROLOT, M.; DEWALS, B. G. Macrophage Activation and Functions during Helminth Infection: Recent Advances from the Laboratory Mouse. **Journal of Immunology Research**, v. 2018, p. 1–17, 2 jul. 2018.
- SOUZA, V. M. O.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 1, p. 81–89, jan. 2002.

SOUZA, V. M. O.; JACYSYN, J. F.; MACEDO, M. S. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from *Ascaris suum*.

Cytokine, v. 28, n. 2, p. 92–100, 21 out. 2004.

TIEGS, G.; HENTSCHEL, J.; WENDEL, A. AT cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. July, p. 196–203, 1992.

TITZ, T. DE O. et al. *Ascaris suum* infection modulates inflammation: Implication of CD4 + CD25 high Foxp3 + T cells and IL-10. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 9, p. e12453, set. 2017.

WEI, H.-X. et al. CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells protect against T cell-mediated fulminant hepatitis in a TGF-beta-dependent manner in mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 181, n. 10, p. 7221–9, 15 nov. 2008.

WEI, J. et al. Yeast-expressed recombinant As16 protects mice against *Ascaris suum* infection through induction of a Th2-skewed immune response. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 7, p. e0005769, 14 jul. 2017.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Em relação aos linfócitos B $CD45R^{+}IL-10^{+}$, todos os grupos apresentaram menor frequência em relação ao grupo Controle. Não houve diferença na frequência de células $CD4^{+}IL-10^{+}$ e $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ entre os grupos HAE e Controle, mas no grupo HAE+ASC+NAC houve aumento significativo. Ao comparar os grupos HAE e HAE+ASC, houve menor frequência de células $CD4^{+}IL-10^{+}$ no grupo tratado, porém sem alteração na frequência das células $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$;
- Houve aumento significativo da expressão das moléculas CD28, CD40L, CTLA-4 nos animais com HAE em relação ao grupo Controle. Entretanto, houve uma diminuição significativa no grupo HAE+ASC em relação ao grupo HAE. Não houve diferença estatística no grupo HAE+ASC+NAC em comparação ao grupo HAE;
- Em comparação com os grupos Controle e HAE, a expressão de *Colla1* e α -SMA foi maior nos grupos que receberam ASC, com ou sem a NAC, mas estatisticamente significativa apenas para *Colla1*. De modo contrário, houve drástica redução da expressão *FIZZ1* nos grupos tratados. Todavia, a expressão de *ARG1* somente foi significativamente menor no grupo HAE+ASC+NAC. Não houve diferença na expressão de *PPAR- γ* entre os grupos;
- Nos grupos HAE e HAE+ASC há aumento do infiltrado inflamatório e da deposição de colágeno em relação ao grupo Controle. Contudo, no grupo HAE+ASC+NAC houve significativa redução da produção de colágeno em relação aos grupos HAE e HAE+ASC e diminuição de leucócitos em comparação ao grupo HAE.
- A produção de IgG1 anti-*Ascaris* foi precoce no grupo HAE+ASC, com maiores níveis em 24 h e 7 dias. Corroborando o direcionamento da resposta imune para um perfil Th2 já nas primeiras 24 horas. Contrariamente, a produção de IgG2a ocorreu somente no 7º dia. Os níveis de IgG1 e IgG2a anti-*Ascaris* no grupo HAE se mantiveram baixos durante toda cinética;
- A produção de TGF- β foi maior no grupo HAE+ASC em relação ao grupo HAE em todas as condições de cultivo.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. Imunidade aos microrganismos. In: ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Tradução de Claudia Reali e outros. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p.351-373.
- AIRES et al. Immunohistopathological changes in murine *Schistosomiasis mansoni* under the influence of N-acetyl-L-cysteine. **Parasitol Res.** 2012; 111:1569–1578.
- ALTURFAN, E. I. et al. Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against acrylamide-induced oxidative stress in rats. **Vet. Anim. Sci.** 2012; 36(4): 438-445.
- AMBERG, S. Hyperproteinemia associated with severe liver damage. **Mayo Clinic Proceedings.** 1942;17:360–362.
- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2005.
- ANTHONY, B. et al. Hepatic stellate cells and parasite-induced liver fibrosis. **Parasites and Vectors**, 2010.
- ANTUNES, M. F. P. et al. Immunosuppressive PAS-1 is an excretory/secretory protein released by larval and adult worms of the ascarid nematode *Ascaris suum*. **Journal of helminthology**, v. 2, p. 1–8, 7 abr. 2014.
- BJÖRNSSON, E. et al. Drug-induced autoimmune hepatitis: clinical characteristics and prognosis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 51, n. 6, p. 2040–8, jun. 2010.
- BORKOW, G.; BENTWICH, Z. Chronic parasite infections cause immune changes that could affect successful vaccination. **Trends Parasitol**,; v. 24, n. 6, p. 243-245, 2008.
- BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. Interleukin 10- and Fcγ receptor-deficient mice resolve *Leishmania mexicana* lesions. **Infection and immunity**, v. 73, n. 4, p. 2101–8, abr. 2005.
- CARAMBIA, A.; HERKEL, J. CD4 T cells in hepatic immune tolerance. **Journal of Autoimmunity**, v. 34, n. 1, p. 23–28, fev. 2010.
- CHO, E.-S., PARK, B.-K., SON, H.-Y. Effects of *Ascaris suum* extract and sulfamethoxazole on allergic airway inflammation. **Biomolecules and Therapeutics**. 2011. 19 (4) , pp. 466-471.
- COHEN-NAFTALY, M.; FRIEDMAN, S. L. Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. **Therapeutic advances in gastroenterology**, v. 4, n. 6, p. 391–417, nov. 2011.
- COLLISON, LW; CHATURVEDI, V; HENDERSON AL; et al., 2010. Interleukin-35-mediated induction of a novel regulatory T cell population. **Nat Immunol.** 2010 December ; 11(12): 1093–1101.

COOPER, P. J.; CHICO, M. E.; SANDOVAL, C.; et al. Human infection with *Ascaris lumbricoides* is associated with a polarized cytokine response. **J Infect Dis**, v. 182, n. 4, p. 1207-1213, 2000.

CZAJA, A. J. Review article: The prevention and reversal of hepatic fibrosis in autoimmune hepatitis. **Alimentary pharmacology & therapeutics**, v. 39, n. 4, p. 385–406, fev. 2014.

CZAJA, A. J. Rapidity of treatment response and outcome in type 1 autoimmune hepatitis. **Journal of hepatology**, v. 51, n. 1, p. 161–7, jul. 2009.

DE ARAÚJO, C. A. A. et al. PAS-1, an *Ascaris suum* protein, modulates allergic airway inflammation via CD8+ $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+CD25+FoxP3+ T cells. **Scandinavian journal of immunology**, v. 72, n. 6, p. 491–503, dez. 2010.

ELIAS, D. et al. Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacilli Calmette–Guerin (BCG) vaccination. **ClinExpImmunol**, v. 123, n. 2, p. 219-25, 2001.

ERB, K. J. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? **TrendsImmunol**, v. 30, n. 2, p. 75-82, 2009.

ESPINOZA-JIMÉNEZ, A. et al. *Taenia crassiceps* Infection attenuates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. **J biomed biotechnol**, v. 2010, 850541, 2010.

FAIRFAX, K. C. et al. IL-10R blockade during chronic schistosomiasis mansoni results in the loss of B cells from the liver and the development of severe pulmonary disease. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 1, p. e1002490, jan. 2012.

FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 114, n. 2, p. 245–251, nov. 1998.

FERREIRA, A. P. et al. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. **Cell Immunol**, v. 162, n. 2, p. 202-210, 1995.

GIRGIS, N. M.; GUNDRA, U. M.; LOKE, P. Immune Regulation during Helminth Infections. **PLoSPathog**. 2013. 9 (4): 1-3.

HAGIWARA, S; ISHII, Y; KITAMURA, S. Aerosolized of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycinmice. **AmJRespirCritCareMed**. 2000;162:225–31.

HELLERBRAND, C. et al. Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. **Hepatology**, v. 24, n. 3, p. 670–676, set. 1996.

HEYMANN, F. et al. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. **Laboratory Animals**, v. 49, n. 1_suppl, p. 12–20, 2 abr. 2015.

HU S, WU Z, YANG L, FUNG MC. Molecular cloning and expression of a functional anti-inflammatory protein, Sj16, of *Schistosoma japonicum*. **Int J Parasitol**, v. 39, p. 2191-2200, 2009.

INVERNIZZI, P. Liver auto-immunology: the paradox of autoimmunity in a tolerogenic organ. **Journal of autoimmunity**, v. 46, p. 1–6, out. 2013.

ITAMI D. M. et al. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. **ClinExp Allergy**, v. 35, n. 7, p. 873-9, 2005.

KELLY, G. Clinical Applications of N-acetylcysteine. **Alt Med Rev**. 1998.3(2):114-127.

KIM, K. Y. et al. N-Acetylcysteine Induces Cell Cycle Arrest in Hepatic Stellate Cells through Its Reducing Activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 44, p. 40591–40598, 2 nov. 2001.

KOCH, A., TRAUTWEIN, C. N-acetylcysteine on its way to a broader application in patients with acute liver failure. **Hepatology**, 2010. 51 (1) , pp. 338-340.

KÜSTERS, S. et al. Interferon gamma plays a critical role in T cell-dependent liver injury in mice initiated by concanavalin A. **Gastroenterology**, v. 111, n. 2, p. 462–71, 1996.

LAI, Z. W. et al. N-acetylcysteine reduces disease activity by blocking mammalian target of rapamycin in T cells from systemic lupus erythematosus patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Arthritis and Rheumatism**, v. 64, n. 9, p. 2937–2946, 2012.

LEE, U. E.; FRIEDMAN, S. L. Mechanisms of Hepatic Fibrogenesis. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**. p. 1–15, 2012.

LEMOES, L. V. B.; SCHIAVON, J. L. N.; FERRAZ, M. L. G. Hepatite auto-imune. **Prat hosp**, 9(52):75–80, 2007.

LIBERAL et al. Autoimmune hepatitis: A comprehensive review. **Jornal of Immunology**, 41 (2013) 126e139.

LIWSKI, R.; ZHOU, J.; MCALISTER, V.; LEE, T. D. Prolongation of allograft survival by *Nippostrongylus brasiliensis* is associated with decreased allospecific cytotoxic T lymphocyte activity and development of T cytotoxic cell type 2 cells. **Transplantation**.; v. 69, p. 1912-22, 2000

LONGHI, M. S. et al. Adaptive Immunity in Autoimmune Hepatitis. **Digestive Diseases**, v. 28, n. 1, p. 63–69, 2010.

LOUIS, H. et al. Interleukin-10 controls neutrophilic infiltration, hepatocyte proliferation, and liver fibrosis induced by carbon tetrachloride in mice. **Hepatology**, v. 28, n. 6, p. 1607–1615, 1998.

LUCEY, M. R.; VIERLING, J. M. Clinical presentation and natural history of autoimmune hepatitis. **Clinical Liver Disease**, v. 3, n. 1, p. 9–11, 10 jan. 2014.

MAKOL, A.; WATT, K. D.; CHOWDHARY, V. R. Autoimmune hepatitis: a review of current diagnosis and treatment. **Hepatitis research and treatment**, v. 2011, p. 390916, jan. 2011.

MANNS, M. P. et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 51, n. 6, p. 2193–213, jun. 2010.

MELON A, WANG A, PHAN V, MCKAY DM. Infection with *Hymenolepis diminuta* is more effective than daily corticosteroids in blocking chemically induced colitis in mice. **J Biomed Biotechnol.**; 2010:384523, 2010

MILLEA, P. J. N-acetylcysteine: multiple clinical applications. **Am. Fam. Physician.** 2009. (80) 265–269.

NASCIMENTO, W. C. et al. Immunomodulation of liver injury by *Ascaris suum* extract in an experimental model of autoimmune hepatitis. **Parasitology research**, v. 113, n. 9, p. 3309–17, set. 2014.

OSADA, Y.; KANAZAWA, T. Parasitic helminths: new weapons against immunological disorders. **J Biomed Biotechnol.**; 2010:743758, 2010.

OSHIRO, T. M. et al. PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. **ImmunolCellBiol**, v. 84, n. 2, p. 138-144, 2006.

OSHIRO, T. M.; MACEDO, M. S.; MACEDO-SOARES, M. F. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. **Inflamm Res**, v. 54, n. 1, p. 17-21, 2005.

OSHIRO, T. M. et al. Comparison of different monoclonal antibodies against immunosuppressive proteins of *Ascaris suum*. **Braz J Med Biol Res.**; v. 37, p. 223-6, 2004.

PESCE, J. T. et al. Arginase-1–Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine–Driven Inflammation and Fibrosis. **PLoSPathog.** 2009. 5(4): 1-15.

PORTAL DA SAÚDE. **Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas: hepatite autoimune.** Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/maio/24/Protocolo-Clinico-e-Diretrizes-Terapeuticas-da-Hepatite-Autoimune.pdf>> Acesso em: 17 de fev. 2020.

RACANELLI, V.; REHERMANN, B. The liver as an immunological organ. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S54-62, fev. 2006.

ROBERTS, S. K.; THERNEAU, T. M.; CZAJA, A. J. Prognosis of histological cirrhosis in type 1 autoimmune hepatitis. **Gastroenterology**, v. 110, n. 3, p. 848–57, mar. 1996.

ROCHA, F. A. et al. Protective Effect of an Extract from *Ascaris suum* in Experimental Arthritis Models. **Infect. Immun.**, v. 76, p. 2736-45, 2008.

SABIN, E. A. et al. Impairment of tetanus toxoid-specific Th1-like immune responses in humans infected with *Schistosoma mansoni*. **J Infect Dis.**; v. 173, p. 269-72, 1996.

SAMUNI, Y. et al. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. **Biochimica et Biophysica Acta.** 2013. 1880: 4117–4129.

SHEN, P.; ROCH, T.; LAMPROPOULOU, V. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. 2014. **Nature**, 507, 366–370.

SHI-WEN, X et al. Focal adhesion kinase and reactive oxygen species contribute to the persistent fibrotic phenotype of lesional scleroderma fibroblasts. **Rheumatology**. 2012. 51 (12), pp. 2146-2154.

SCHÜMANN, J. et al. Importance of Kupffer cells for T-cell-dependent liver injury in mice. **The American journal of pathology**, v. 157, n. 5, p. 1671–83, 2000.

SILVA, S. R. et al. Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. **European journal of immunology**, v. 36, n. 12, p. 3227–37, dez. 2006.

SILVA, R. C. P. Mecanismos do Imunorregulação do Extrato de Solúvel de *Ascaris* e de sua Associação com N-acetil-Lcisteína na Hepatite Autoimune Experimental. Recife, 2015. Dissertação Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Universidade Federal de Pernambuco, 2015.

SOARES, M. F. et al. Antigenic competition in IgE antibody production. III. Suppressive effect on Th and B cells. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 79, p. 196-201, 1986.

SOARES, M. F.; MACEDO, M. S.; MOTA, I. Suppressive effect of an *Ascaris suum* extract on IgE and IgG antibody responses in mice. **Braz J MedBiol Res**, v. 20, n. 2 p. 203-11, 1987.

SOARES, M. F. et al. Suppression of IgE antibody production by *Ascaris suum* extract: characterization of suppressive component(s). **Braz J MedBiol Res**, v. 21, p. 527-9, 1988.

SOARES, M. F.; MOTA, I.; MACEDO, M. S. Suppression of the IgE antibody response by *Ascaris suum* components: effect of X-irradiation. **Braz J MedBiol Res**, v. 24, n. 6, p. 587-590, 1991.

SOARES, M. F.; MOTA, I.; MACEDO, M. S. Isolation of *Ascaris suum* components which suppress IgE antibody responses. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 97, n. 1, p. 37-43, 1992.

SOUZA, V. M.; FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 1, p. 81-89, 2002.

SOUZA, V. M.; JACYSYN, J. F.; MACEDO, M. S. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from *Ascaris suum*. **Cytokine**, v. 28, n. 2, p. 92-100, 2004.

SOUZA, V. M.; MACEDO, M. S. Boosting the suppressive effects of *Ascaris suum* components in IFN-gamma-deficient mice. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 3, p. 345-347, 2009.

STRACHAN, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. **BMJ**, v. 299, n. 6710, p. 1259-1260, 1989.

SU, L. C. et al. Emerging role of IL-35 in inflammatory autoimmune diseases. **Autoimmunity Reviews**, v. 17, n. 7, p. 665–673, 2018.

SUGAWARA, Y. et al. Th2 Immune Responses and Alternatively Activated Macrophages (AAMacs) in Helminth Infection in Aged Mice. **J Vet Med Sci**, v. 73, n. 4, p. 511-516, 2010.

TERRABUIO, D. R. B. Definição e aspectos clínicos: hepatite auto-imune. **Programa de Educação Médica Continuada**. [s.l.]:Atha,[entre 1990 e 2012].

TEUFEL, A. Hepatocellular carcinoma in patients with autoimmune hepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 15, n. 5, p. 578, 2009.

TIEGS, G.; HENTSCHEL, J.; WENDEL, A. AT cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. July, p. 196–203, 1992.

TSUI, T.-Y. et al. Carbon monoxide inhalation rescues mice from fulminant hepatitis through improving hepatic energy metabolism. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 27, n. 2, p. 165–71, fev. 2007.

URBAN, J. F. JR.; STEENHARD, N. R.; SOLANO-AGUILAR, G. I.; et al. Infection with parasitic nematodes confounds vaccination efficacy. **Vet Parasitol**, v. 148, n. 1, p. 14-20, 2007.

VAN GINDERACHTER, J. A. et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology**, v. 211, n. 6–8, p. 487–501, 14 set. 2006.

VERHASSELT, V. et al. N-acetyl-L-cysteine inhibits primary human T cell responses at the dendritic cell level: association with NF-kappaB inhibition. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 162, n. 5, p. 2569–74, 1 mar. 1999.

WALSH, K. P.; BRADY, M. T.; FINLAY, C. M.; et al. Infection with a helminth parasite attenuates autoimmunity through TGF- β -mediated suppression of Th17 and Th1 responses. **J Immunol**, v. 183, n. 3, p. 1577-1586, 2009.

WANG, H.-X. et al. Immune mechanisms of Concanavalin a model of autoimmune hepatitis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 18, n. 2, p. 119–125, 2012.

WANG, H. et al. Redox regulation of hepatic NLRP3 inflammasome activation and immune dysregulation in trichloroethene-mediated autoimmunity. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 143, p. 223–231, nov. 2019.

WANG, T.-Y. et al. Inhibitory effect of TGF- β 1 on NO production in peritoneal macrophages from collagen-induced arthritis rats involving the LPS-TLR4 pathway. **Molecular Medicine Reports**, v. 8, n. 4, p. 1143–1148, out. 2013.

WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol.** v. 85, n. 2, p. 148–154, 2007.

WINAU, F. et al. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. **Immunity**, v. 26, n. 1, p. 117–29, jan. 2007.

WOLFF, M. J.; BROADHURST, M. J., LOKE, P. Helminthic therapy: improving mucosal barrier function. **Trends in Parasitology**. 2012. 28 (5): 187-194.

YAZDANBAKHSH, M.; KREMSNER, P. G.; VAN REE, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 490-4944, 2002.

YEOMAN, A. D. et al. Evaluation of risk factors in the development of hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis: Implications for follow-up and screening. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 48, n. 3, p. 863–70, set. 2008.

ZHANG, X. et al. Opposite effects of high and low doses of interleukin-2 on T cell-mediated hepatitis in mice (interleukin-2 on hepatitis). **Hepatology international**, v. 4, n. 3, p. 641–8, 29 jul. 2010.

ZHENG, Z. Y.; WENG, S. Y.; YU, Y. **Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration** **World Journal of Gastroenterology**, 14 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19998497>>. Acesso em: 5 maio de 2020.

ANEXO A – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 27 de outubro de 2015.

Ofício nº 103/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Prof.ª Valdênia Maria Oliveira de Souza**
Departamento de Ciências Farmacêuticas – CCS
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.041705/2015-93

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, “**Efeitos imunorregulatórios do extrato de *Ascaris sunn* e de sua associação com N-acetil-L-cisteína sobre os mecanismos intracelulares da população de macrófagos (M1 e M2) e linfócitos T na hepatite autoimune experimental**”.

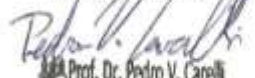
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do LIKA-UFPE; Animais: camundongos isogênicos BALB/c; Idade: 8 semanas; Peso: 250g; Sexo: machos; Nº total de animais: 300.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584

**ANEXO B – CARTA DE DECISÃO DA REVISTA BRASILEIRA DE
PARASITOLOGIA VETERINÁRIA**

De: Rosangela Machado <onbehalf@manuscriptcentral.com>

Date: seg., 6 de abr. de 2020 às 14:48

Subject: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária - Decision on Manuscript ID RBPV-2019-0234.R1

To: <valdenia.souza@gmail.com>

06-Apr-2020

Dear Dr. Souza:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "Extract of *Ascaris suum* induces TGF- β and early production of IgG1 in experimental autoimmune hepatitis" in its current form for publication in the Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of the Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Prof. Rosangela Machado

Editor-in-Chief, Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária

cbpv_rbpv.fcav@unesp.br