



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

ROECKSON CARLOS PEIXOTO SILVA

MECANISMOS DE IMUNORREGULAÇÃO DO EXTRATO SOLÚVEL DE *Ascaris suum* E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM N-ACETIL-L-CISTEÍNA NA HEPATITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

RECIFE – PE

2015



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

MECANISMOS DE IMUNORREGULAÇÃO DO EXTRATO SOLÚVEL DE *Ascaris suum* E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM N-ACETIL-L-CISTEÍNA NA HEPATITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL

ROECKSON CARLOS PEIXOTO SILVA

Dissertação apresentada ao colegiado do 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 Mestre em Medicina Tropical. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientadora: Prof^a. Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza
Coorientadora: Prof^a. Dra. Mônica Camelo P. A. Albuquerque

RECIFE – PE

2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Liliane Baltar, CRB4-506

S586m Silva, Roeckson Carlos Peixoto.
 Mecanismos de imunorregulação do extrato solúvel de *Áscaris summ* e
 de sua associação com N-acetil-L-cisteína na hepatite autoimune
 experimental / Roeckson Carlos Peixoto Silva. – Recife: O autor, 2015.
 84 f.: il. fig. tab.; 30 cm.

 Orientadora: Valdênia Maria Oliveira de Souza.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2015.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. *Ascaris summ*. 2. Acetilcisteína. 3. Hepatite autoimune. 4.
 Imunomodulação. 5. Fibrose. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de (Orientadora).
 II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2015-142)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO

ROECKSON CARLOS PEIXOTO SILVA

No dia 13 de fevereiro de 2015, às 09h00, na Sala de Aula do PPGMEDTROP – no Bloco A, Térreo do Hospital das Clínicas da UFPE – os Membros **Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos** – **Presidente da Banca (CPqAM/FIOCRUZ)**, **Prof. Dr. André de Lima Aires (UFPE)** e a **Profª. Drª. Silvia Maria Lucena Montenegro (CPqAM/FIOCRUZ)** componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram o mestrando **Roeckson Carlos Peixoto Silva** sobre a sua Dissertação intitulada “**MECANISMOS DE IMUNORREGULAÇÃO DO EXTRATO SOLÚVEL DE *Ascaris suum* E DE SUA ASSOCIAÇÃO COM N-ACETIL-L-CISTEÍNA NA HEPATITE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL**”, a qual foi orientada pela **Profª. Drª. Valdênia Maria Oliveira de Souza (UFPE)** e coorientada **Profª. Drª. Mônica Camelo P. A. Albuquerque**. Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do mestrando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos:_____

Prof. Dr. André de Lima Aires:_____

Profª. Drª. Silvia Maria Lucena Montenegro _____

Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

Prof. Dr. André de Lima Aires

Profª. Drª. Silvia Maria Lucena Montenegro

*Aos meus pais, Carlos e Auxiliadora, ao
meu irmão, Roeverson, e a minha noiva, Carla,
pelo apoio recebido 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 Peixoto e Auxiliadora Peixoto, 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;

Ao meu irmão Roeverson Peixoto, pelo companheirismo, apoio e abstenções decorrentes de minha ausência no seio familiar;

A minha noiva Carla Carvalho, pelo afeto, resiliência e incentivo sempre presentes para que eu pudesse seguir em frente e lutar por minhas aspirações;

A minha orientadora Dra. Valdênia Souza, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Pelos ensinamentos repassados. Pela dedicação e colaboração extrema no decorrer desta pesquisa;

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

A Wheverton Nascimento, pelas portas abertas no mundo científico. Pelos ensinamentos de bancada. Pela amizade e companheirismo.

A Erica Fernandes, pelos ensinamentos de bancada. Pelo suporte técnico. Pela “adoção” científica.

A Raul Penaforte, pelo suporte na execução dos experimentos. Pelas horas-extras e “plantões noturnos”. Pela transmissão de boas energias.

Aos meus amigos Hildeberto Tomaz e Flávio Oliveira pelos momentos de descontração.

Aos que fazem o setor de imunologia do LIKA, colegas de bancada (Wheverton Nascimento, Patrícia d’Emery, Cássia Nóbrega, Conceição Silva, Gabriela Calixto, Erica Fernandes, Rafaela Sales, Fabiana Letícia, Letícia Melo, Weverton Alves, Patrícia Evelyn, Raul Penaforte e Victor Teodósio) e pesquisadores (Vláudia Costa, Mônica Albuquerque, Valdênia Souza, André Aires), pelo apoio nos momentos de dificuldade e pelas risadas entre um experimento e outro;

Aos membros da comissão avaliadora Dr. Fábio Brayner, Dr. André Aires, Dra. Clarice Lins, Dra. Vláudia Costa e Dra. Silvia Montenegro por sua relevante contribuição para o engrandecimento deste trabalho.

RESUMO

O extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc) possui efeito anti-inflamatório e imunossupressivo, entretanto durante a hepatite autoimune experimental foi capaz de induzir a produção de colágeno. A N-acetil-L-cisteína (NAC), que apresenta propriedades antioxidantes e antifibróticas, pode melhorar a ação do Asc em modelos de desordens inflamatórias, reduzindo a síntese de colágeno. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do Asc e de sua associação com a NAC como estratégia de tratamento para hepatite autoimune, que apresenta a cirrose como principal complicação decorrente de falha na terapia convencional. A hepatite autoimune experimental foi induzida pela administração intravenosa da lectina concanavalina A em animais BALB/c (HAE). Após indução, um grupo foi tratado com Asc (HAE+Asc) e outro grupo com Asc e NAC (HAE+Asc+NAC). Como controle, um grupo foi tratado com salina (HAE). Foram quantificados e comparados entre os grupos o peso hepático e sua análise anatomohistopatológica, os níveis das transaminases e imunoglobulinas totais, a produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas interleucina (IL)-5, IL-10, IL-13 e do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β). Nos grupos tratados, o Asc ocasionou a redução dos níveis das transaminases, imunoglobulinas totais e do infiltrado inflamatório, bem como o aumento da produção de TGF- β quando comparados com o grupo HAE. Quando a NAC foi associada ao esquema terapêutico, a produção de colágeno foi controlada e acompanhada por níveis reduzidos de NO e IL-13. No grupo HAE+Asc+NAC também foi observada redução do peso hepático e níveis elevados de IL-5 e IL-10. Dessa forma, a estratégia de tratamento para HAE foi melhorada quando a NAC foi associada ao Asc no esquema terapêutico.

Palavras-chave: *Ascaris suum*. Acetilcisteína. Hepatite autoimune. Imunomodulação. Fibrose.

ABSTRACT

The adult worm extract of *Ascaris suum* (Asc) has potent anti-inflammatory and immunosuppressive effect, however during experimental autoimmune hepatitis was capable of inducing collagen production. The N-acetyl-L-cysteine (NAC), which has antioxidants and antifibrotic properties, may enhance the action of Asc in models of inflammatory disorders, reducing collagen synthesis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of Asc and its association with the NAC as a treatment strategy for autoimmune hepatitis, which exhibit the cirrhosis as main complication arising from failure to conventional therapy. Experimental autoimmune hepatitis was induced by intravenous administration of concanavalin A lectin in Balb/c animals (EAH). After induction, one group was treated with Asc (HAE+Asc) and another group with Asc and NAC (HAE+Asc+NAC). As a control, one group was treated with saline (HAE). Were quantified and compared between groups liver weight, aminotransferase levels and total immunoglobulins and anatomopathological analysis, nitric oxide (NO) production and cytokine interleukin(IL)-5, IL10, IL-13 and the transforming growth factor beta (TGF- β). In the treated groups, the ASC caused the reduction in levels of transaminases, total immunoglobulins and inflammatory infiltration, as well as increases TGF- β production compared with the group EAH. When the NAC was associated with the treatment regimen, collagen production was controlled and accompanied by reduced levels of NO and IL-13. In EAH+Asc+NAC group was also observed reductions in liver weight and high levels of IL-5 and IL-10. Thus, the treatment strategy for HAE were improved when NAC was associated with Asc the therapeutic regimen.

Keywords: *Ascaris suum*. Acetylcysteine. Autoimmune hepatitis. Immunomodulation. Fibrosis

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Apêndice A: Artigo em português

Figura 1: Níveis das transaminases, imunoglobulinas totais e peso do fígado após indução da HAE e tratamento terapêutico com Asc e Asc+NAC. Transaminases ALT (A) e AST (B), imunoglobulinas totais (C) e peso do fígado (D). * $p < 0,05$ comparado com o grupo HAE; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo HAE+Asc. Colocar como os resultados foram calculados..... 49

Figura 2: Níveis das citocinas produzidas por esplenócitos 7 dias após indução da HAE e tratamento terapêutico com Asc e Asc+NAC. Os esplenócitos foram cultivados *in vitro* sem estímulo ou estimulados com Asc (20 μ g/mL) e ConA (10 μ g/mL) nos tempos de 24h (2.10⁷ células/mL) e 72h (12.10⁶ células/mL). As citocinas foram mensuradas no sobrenadante em 24h (IL-10) e 72h (IL-5, IL-13 e TGF- β) por ELISA de captura. O NO foi mensurado no sobrenadante em 24h. Níveis de IL-5 (A), IL-10 (B), IL-13 (C), TGF- β (D) e NO (E). * $p < 0,05$ comparado com o grupo HAE; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo HAE+Asc..... 51

Figura 3: Aspecto macroscópico do fígado de camundongos decorridos 7 dias após indução da HAE e tratamento terapêutico com Asc e Asc+NAC. (A) Grupo HAE; (B) Grupo HAE+Asc e (C) Grupo HAE+Asc+NAC. Setas brancas indicam áreas de tecido cicatricial..... 52

Tabela 1: Análise histomorfométrica do tecido hepático..... 52

Anexo B: Artigo em inglês

Figure 1. Transaminases levels, total immunoglobulins and liver weight after induction of EAH and therapeutic treatment with Asc and Asc+NAC. ALT (A) and AST (B) transaminases, total immunoglobulins (C) and liver weight (D). * $p < 0,05$ compared with the EAH group; ** $p < 0,05$ compared with the EAH+Asc group..... 74

Figure 2. Levels of cytokines produced by spleen 7 days after induction of the EAH and and therapeutic treatment with Asc and Asc+NAC. The splenocytes were cultured *in vitro* without stimulus or stimulated with Asc (20 μ g/mL) and ConA (10 μ g/mL) in times of 24h (2.10⁷ células/mL) and 72h (12.10⁶ células/mL). The cytokines were measured in the supernatant in 24h (IL-10) and 72h (IL-5, IL-13 e TGF- β) for capture ELISA..... 76

Figure 3. Macroscopic appearance of the mouse liver after 7 days after induction of HAE and therapeutic treatment with Asc and Asc+NAC. (A) EAH group; (B) EAH+Asc group and (C) Grupo EAH+Asc+NAC group. White arrows indicate areas of scar tissue..... 77

Table 1. Histomorphometric analysis of liver tissue..... 77

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANA	Anticorpo antinúcleo
Asc	Extrato do verme adulto de <i>Ascaris suum</i>
AST	Aspartato aminotransferase
CD	Grupo de diferenciação
CHC	Carcinoma hepatocelular
Con A	Concanavalina A
DCs	Células dendríticas
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FCM	Citometria de fluxo
GSH-Px	Glutathione peroxidase
HAE	Hepatite autoimune experimental
HAI	Hepatite autoimune
HLA	Antígeno leucocitário humano
IFN-γ	Interferon gama
IHQ	Imunohistoquímica
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacarídeo
LKA	Anticorpo antimicrosoma de fígado e rim
KC	Células de Kupffer
M2	Macrófagos alternativamente ativados
MHC	Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal
MIP-2	Proteína inflamatória de macrófagos 2
NAC	N-acetil-L-cisteína
NO	Óxido nítrico
OVA	Ovalbumina
PAS-1	Proteína imunossupressora de <i>Ascaris suum</i> - 1
SARA	Síndrome da insuficiência respiratória aguda
HSC	Células estreladas
TBARS	Substâncias reagentes com o ácido tiobarbitúrico
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

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
2.1	Hepatite autoimune.....	14
2.2	Hepatite autoimune experimental mediada por Concanavalina A	17
2.3	Imunomodulação por helmintos e as doenças autoimunes.....	18
2.4	<i>Ascaris suum</i> e propriedades imunorregulatórias.....	20
2.5	N-acetil-L-cisteína e suas propriedades imunomodulatórias.....	21
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	Geral	24
3.2	Específicos.....	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	Desenho do estudo.....	25
4.2	Extrato de vermes adultos de <i>Ascaris suum</i> , Concanavalina A e N-acetil-L-cisteína....	25
4.3	Animais e formação dos grupos de estudo	25
4.4	Categorizações das variáveis	26
4.4.1	Variáveis independentes	26
4.4.2	Variáveis dependentes	26
4.5	Métodos de coleta de dados.....	28
4.5.1	Dosagem das transaminases e imunoglobulinas totais	28
4.5.2	Coleta do fígado e do baço	29
4.5.3	Cultura celular	29
4.5.4	Dosagem de citocinas	29
4.5.5	Dosagem de óxido nítrico.....	30
4.5.6	Processamento histológico	30
4.5.7	Análise estatística	30

4.5.8 Considerações éticas.....	31
5 RESULTADOS	32
6 CONCLUSÃO	33
REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE	42
Apêndice A: Artigo em Português.....	42
ANEXOS	59
Anexo A: Guia dos Autores.....	59
Anexo B: Artigo em Inglês.....	67
Anexo C: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	84

1 INTRODUÇÃO

Estudo desenvolvido para investigação das propriedades imunomodulatórias do extrato de *Ascaris suum* e de sua associação com a N-acetil-L-cisteína em um modelo de hepatite autoimune experimental.

O tratamento da hepatite autoimune (HAI) baseia-se na imunossupressão e pode culminar na remissão da doença, entretanto há relatos de falha terapêutica e toxicidade aos fármacos utilizados (LEMOS; SCHIAVON; FERRAZ, 2007). O extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc) possui proteínas com atividade regulatória que modulam a resposta imune para antígenos heterólogos (FAQUIM-MAURO; MACEDO, 1998; SOUZA; JACYSYN; MACEDO, 2004). Com relação aos autoantígenos, existem poucos estudos que demonstram o potencial imunorregulador do Asc em modelos de hipersensibilidade autoimune (NASCIMENTO et al., 2014; ROCHA et al., 2008).

Recentemente, para a hepatite autoimune experimental (HAE), o nosso grupo de pesquisa demonstrou que o tratamento profilático e terapêutico com o Asc atenuou o dano hepático, com redução do infiltrado inflamatório e indução de um perfil imunossupressor Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13). Contudo, no tratamento terapêutico foi observado aumento da fibrose (NASCIMENTO et al, 2014). A produção de IL-10 foi relacionada com a imunossupressão, provavelmente pela participação de linfócitos T regulatórios (Treg) e a ação hepatoprotetora pela produção de IL-10 e TGF- β . Ao mesmo tempo, o microambiente hepático com IL-4 e IL-10, juntamente com os altos níveis de IL-13, pode estar envolvida com a ativação e diferenciação de macrófagos alternativamente ativados (M2) e células estreladas (HSC), os quais estão associados com a fibrogênese (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI 2012; LEE; FRIEDMAN, 2012).

A agressão imune celular também favorece a geração de radicais livres e de outras espécies químicas reativas que contribuem com a ativação desses tipos celulares e com aumento da síntese de matriz extracelular (CZAJA, 2014a; LEE; FRIEDMAN, 2012). Drogas com propriedades antioxidantes podem atenuar os efeitos pró-fibróticos do estresse oxidativo (COHEN-NAFTALY; FRIEDMAN, 2011; CZAJA, 2014b). A N-acetil-L-cisteína (NAC) apresenta potente efeito antioxidante e sua capacidade imunomodulatória e ação antifibrótica tem sido evidenciadas em diferentes modelos animais (AIRES et al., 2012; ALTURFAN et al., 2012; HAGIWARA; ISHII; KITAMURA, 2000). Durante a esquistossomose experimental, a NAC atenuou o dano hepático, com diminuição dos níveis de NO e IFN- γ , elevação dos níveis

de IL-10 e redução do tamanho dos granulomas e do grau de fibrose (AIRES et al., 2012). Na esteatohepatite não-alcoólica, a associação entre a NAC e a metformina reduziu a fibrose hepática e o infiltrado inflamatório (OLIVEIRA et al., 2008). Portanto, é possível que a NAC possa auxiliar na reversão da fibrose decorrente da agressão tecidual na HAE.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os mecanismos de imunorregulação induzidos pelo Asc e por sua associação com a NAC na inibição da HAE. Para isto, foram avaliados, em um estudo de comparação entre animais com HAE e tratados com Asc e Asc+NAC, a produção das citocinas IL-13, IL-5, IL-10 e TGF- β ; os níveis de NO e as alterações anatomohistomorfométricas do tecido hepático. Considerando a dificuldade de se realizar estudos em seres humanos que avaliem o efeito terapêutico de novas estratégias imunomodulatórias na HAI, esse modelo experimental poderá auxiliar na compreensão dos mecanismos de ação do Asc, e no seu uso de forma segura junto com a NAC, para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas, facilitando a criação de terapias antifibróticas específicas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Fundamentação teórica apresentando as características da hepatite autoimune, da capacidade e propriedade imunomodulatória dos helmintos, do extrato do *Ascaris suum* e da N-acetil-L-cisteína em modelos de hipersensibilidade autoimune e desordens inflamatórias.

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 por Amberg (AMBERG, 1942), a HAI é uma doença inflamatória crônica do fígado, caracterizada pela presença de autoanticorpos circulantes, elevação nos níveis das transaminases séricas, hiperglobulinemia (principalmente IgG) e um quadro histológico de hepatite de interface (LE MOS; SCHIAVON; FERRAZ, 2007; LUCEY; VIERLING, 2014; MAKOL; WATT; CHOWDHARY, 2011).

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, 2010).

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; 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 (WANG et al. 2012; CARAMBIA; HERKEL 2010; JONULEITAND; SCHMITT, 2003)

Em trabalho de revisão, Liberal et al. (2013) propõem que a resposta imune na HAI parece ter início com a apresentação de autoantígenos por APCs residentes no fígado (Kupffer, DCs e a células sinusoidais) a linfócitos T helper (Th0). 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).

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 ativadas adquirem um fenótipo semelhante a miofibroblastos e estimulam a produção de mais ROS, aumentando o estresse oxidativo nos hepatócitos. (COHEN-NAFTALY; FRIEDMAN, 2011; FRIEDMAN, 2008; 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 (GINDERACHTER et al., 2006).

Na maioria dos casos a HAI apresenta início insidioso, caracterizado por sintomas inespecíficos (fadiga, náuseas, dor abdominal, icterícia e artralgias) e espectro clínico amplo, variando desde quadros assintomáticos a agudos e graves. E cujo diagnóstico é realizado pelo somatório de um score de achados clínicos, laboratoriais e histológicos (PROTOCOLO CLÍNICO E DIRETRIZES TERAPÊUTICAS – HEPATITE AUTOIMUNE, 2012).

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 hiperglobulinemia 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 -glutamyltransferase 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 antímúsculo 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/fígado e pâncreas, com ou sem anticorpos ANA e SMA (HOMBERG et al., 1987; MANNS et al., 2010; MANNS; VOGEL, 2006; MARTINI et al., 1988). O CHC ocorre em 4% dos pacientes com HAI tipo 1, e a probabilidade de desenvolvimento desta neoplasia é de 2,9% (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). Mesmo com o tratamento convencional, monoterapia com prednisona ou em combinação com azatioprina, a cirrose costuma ocorrer em 40% dos pacientes tratados e é tida como um fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular (CHC) (MANNS et al., 2010; ROBERTS; THERNEAU CZAJA, 1996; TEUFEL, 2009; YEOMAN et al., 2008). A incapacidade 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; SCHIAVON; FERRAZ, 2007).

2.2 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. Dessa 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 de uma lectina, Concanavalina A (Con A), extraída da *Canavalia ensiformis*, popularmente conhecida como feijão-de-porco (ANAND et al., 2006; CHEN et al., 2007; XU et al., 2009; 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 Con A, 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. Esse modelo permitiu o estudo da

fisiopatologia das doenças hepáticas mediadas por componentes imunológicos, como a hepatite autoimune ativa (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 Con A liga-se aos resíduos de manose das SEC promovendo lesão e facilitando a ligação da Con A 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 (TSUY 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., 2000), que podem ser ativadas pelo aumento nos níveis de TNF- α (ANDRADE, 2005).

2.3 Imunomodulação por helmintos e as doenças autoimunes

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 (YAZDANBAKHSI; 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 (ELLIOTT; WEINSTOCK, 2011; OSADA; KANAZAWA, 2010).

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; MACEDO, 2002; SOUZA; FAQUIM-MAURO). 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; LIWSKI et al., 2000; LOK, 2013; 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.

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 (PESCEET 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; CARRANZA et al., 2012; ERB, 2009; URBAN et al., 2007). A modulação da resposta imune por diferentes componentes do extrato de vermes de *A. suum* foi comprovada por uma série de experimentos realizados por Soares e colaboradores (1985, 1986, 1987, 1988, 1991, 1992).

A administração conjunta do extrato 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; JACYSYN; MACEDO, 2004; SOUZA; FAQUIM-MAURO; SOUZA; MACEDO, 2009; MACEDO, 2002).

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 profundo efeito inibitório sobre a inflamação e hiper-responsividade pulmonar. Neste 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 ovalbumina (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). O PAS-1 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. Nos grupos tratados houve uma redução do infiltrado inflamatório, com elevada produção de IL-4, IL-10 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, estimulando a ativação da enzima arginase que está envolvida com a fibrose (SUGAWARA et al., 2010).

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

A N-acetil-L-cisteína (também conhecida como N-acetil cisteína, N-acetilcisteína ou NAC) é uma droga com conhecido 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, devido a presença de um grupo tiol na molécula

(KOCH; TRAUTWEIN, 2010; SAMUNI et al., 2013). 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).

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 estão sendo 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 interrompeu 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.

Dessa forma, a NAC pode atenuar os efeitos os pró-fibróticos decorrentes da agressão imune hepática através, principalmente, da redução do estresse oxidativo nos hepatócitos, limitando a atividade inflamatória pela redução da expressão gênica de citocinas pro-inflamatórias decorrente da inibição de do fator de transcrição NF- κ B; e pela modulação da

expressão de iNOS em KC, limitando a apoptose, por redução da produção de NO e ROS, e ativação de HSC (DE OLIVEIRA et al., 2008; MAJANO et al., 2004; ZAFARULLAH et al., 2003).

3 OBJETIVOS

Apresentação dos objetivos estabelecidos para execução do projeto de pesquisa.

3.1 Geral

Descrever os efeitos imunomodulatórios exibidos pelo Asc e por sua associação com a NAC durante o tratamento terapêutico de camundongos isogênicos submetidos à hepatite autoimune experimental (HAE).

3.2 Específicos

Comparar entre grupos de animais com HAE e os grupos HAE tratados terapeuticamente com Asc e Asc + NAC:

- ✓ O peso hepático;
- ✓ As alterações macroscópicas e histomorfométricas (infiltrado inflamatório e tecido fibroso) no tecido hepático;
- ✓ As alterações dos níveis de transaminases séricas (ALT e AST);
- ✓ A produção de anticorpos séricos totais;
- ✓ A produção *in vitro* por esplenócitos de óxido nítrico e das citocinas IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Apresentação metodológica das técnicas e insumos utilizadas na execução do projeto de pesquisa.

4.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo experimental, no qual a HAE foi induzida em grupos de camundongos machos isogênicos. Os animais foram submetidos à intervenção (administração do Asc e Asc + NAC) e outros não (grupo controle). Os animais apresentavam o mesmo tempo de vida, faziam parte da mesma linhagem e foram criados sob as mesmas condições. O modelo experimental utilizado mimetiza a doença autoimune hepática humana e as dificuldades de realização por questões éticas são menores. Entretanto, não será possível afirmar que os resultados obtidos serão reprodutíveis em seres humanos.

4.2 Extrato de vermes adultos de *Ascaris suum*, Concanavalina A e N-acetil-L-cisteína

O extrato de vermes adultos de *A. suum* (Asc) foi produzido segundo protocolo de Souza et al. (2002), onde 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. Para administração nos animais, as alíquotas foram diluídas em solução estéril de tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01M, pH 7,2.

A concanavalina A tipo IV (Con A) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) e a N-acetil-L-cisteína (NAC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) foram diluídas em solução estéril de PBS 0,01M, pH 7,2.

4.3 Animais e formação dos grupos de estudo

Camundongos machos BALB/c com 7-8 semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE), foram mantidos em gaiolas (5-6 animais), sob condições padronizadas de

temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) e luminosidade (ciclos de 12h de claro e 12h de escuro) e com água e alimento *ad libitum*.

Para execução do estudo, três grupos (6 animais/grupo) foram formados e a HAE foi induzida em todos os animais através da administração por via intravenosa (v.i.) da Con A, na dose de 10 mg/Kg. Trinta minutos após sua indução, um grupo foi tratado com NAC, dose 200 mg/kg, de 12/12h, durante 6 dias, por via oral (v.o.); e Asc, duas horas após a indução, em dose única de 1mg/animal por via intraperitoneal (i.p.) (grupo HAE+Asc+NAC). Enquanto outro grupo foi tratado com salina estéril por v.o. e Asc por via i.p. (Grupo HAE+Asc). Como controle tratamento, animais receberam apenas salina estéril (grupo HAE).

O modelo experimental foi desenvolvido a partir dos estudos de Nascimento et al. (2014) e Aires et al. (2013), e pode ser esquematizado como segue abaixo.

Grupo HAE+Asc+NAC: recebeu 10mg/Kg corpóreo de Con A (i.v); 1mg/animal de Asc (i.p.) 2 horas após indução da HAE; 200mg/Kg de NAC (v.o.) 30 minutos após indução da HAE, a cada 12h, durante 6 dias;

Grupo HAE+Asc: recebeu 10mg/Kg corpóreo de Con A (i.v); 1mg/animal de Asc (i.p.) 2 horas após indução da HAE; 100 μL de PBS (v.o.) 30 minutos após indução da HAE, a cada 12h, durante 6 dias;

Grupo HAE: recebeu 10mg/Kg corpóreo de Con A (i.v); 200 μL de PBS (i.p.) 2 horas indução da HAE; 100 μL de PBS (v.o.) 30 minutos após indução da HAE, a cada 12h, durante 6 dias;

4.4 Categorizações das variáveis

4.4.1 Variáveis independentes

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL
Extrato solúvel de vermes adultos de <i>Ascaris suum</i> (Asc)	Homogenato produzido a partir do processamento de vermes adultos de <i>Ascaris suum</i> .	As alíquotas do Asc foram diluídas em solução de PBS 0,1M, pH 7.2. A suspensão foi administrada por via intraperitoneal na dose de 1mg/animal.
N-acetil-L-cisteína (NAC)	Agente farmacológico com propriedade mucolítica, antioxidante e imunomodulatória.	A NAC foi diluída em solução de PBS 0,1M, pH 7.2. A Suspensão foi administrada por via oral na dose de 200mg/Kg durante 6 dias e a cada 12h.

4.4.2 Variáveis dependentes

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO CONCEITUAL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL
Peso do fígado	Massa do fígado em gramas de camundongos machos Balb/c com 7-8 semanas de idade.	Após eutanásia dos animais, os fígados foram removidos, pesados, seccionados e acondicionados para processamento histopatológico.
Análise macroscópica do tecido hepático	Análise qualitativa das alterações no parênquima hepática de camundongos Balb/c no 7º dia após indução da HAE.	Análise qualitativa do aspecto do fígado e lesões adjacentes.
Análise histológica do tecido hepático	Mensuração da presença de necrose e de infiltrado inflamatório no parênquima hepático.	Lâminas histológicas serão coradas cor Hematoxilina e Eosina e analisadas a partir de micrografias pelo Software ImageJ®.
Análise morfométrica do tecido hepático	Mensuração da concentração de colágeno no parênquima hepático.	Lâminas histológicas serão coradas com Tricrômico de Masson e analisadas a partir de micrografias pelo Software ImageJ®.
Aspartato aminotransferase (AST)	Enzima encontrada em vários tecidos corporais, como: fígado, coração e músculo. É liberada para a circulação após lesão ou morte celular.	O oxaloacetato formado por ação da AST é reduzido pela NADH. A transformação da NADH por oxidação em NAD é monitorada por espectrofotometria.
Alanina aminotransferase (ALT)	Enzima encontrada em vários órgãos, como: rins, coração, tecido muscular e, principalmente, fígado. É liberada para a circulação após lesão ou morte celular.	O piruvato formado por ação da ALT é reduzido pela NADH. A transformação da NADH por oxidação em NAD é monitorada por espectrofotometria.
Imunoglobulinas totais (Ig total)	Moléculas glicoproteicas produzidas por plasmócitos. São compostas por duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas. Quando secretadas, realizam várias funções efetoras, como: neutralizar antígenos, ativar o complemento e destruição micro-organismos dependente de leucócitos.	Dosagem por ELISA direto a partir de amostras de plasma.
Interleucina 5 (IL-5)	Citocina produzida por células Th1 e monócitos. Atua como fator de crescimento e diferenciação de linfócitos B e eosinófilos.	Dosagem por ELISA de captura a partir do sobrenadante da cultura de esplenócitos.

Interleucina 10 (IL-10)	Citocina pleiotrópica produzida por monócitos e linfócitos. Atua regulando negativamente a expressão de citocinas Th1, MHC II e moléculas coestimulatórias em macrófagos. Regula o crescimento e diferenciação de linfócitos B.	Dosagem por ELISA de captura a partir do sobrenadante da cultura de esplenócitos.
Interleucina 13 (IL-13)	Citocina produzida principalmente por células Th2. Atua na maturação e diferenciação de linfócitos B, promovendo a troca isotípica para IgE. Regula positivamente a expressão de MHC II e CD23 e negativamente a atividade de macrófagos.	Dosagem por ELISA de captura a partir do sobrenadante da cultura de esplenócitos.
Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β)	Citocina pleiotrópica produzida por quase todos os tipos celulares. Atua inibindo a proliferação de linfócitos T e NK. Regula negativamente macrófagos ativados. Desempenha papel crítico na diferenciação de linfócitos Treg e expressão de Foxp3.	Dosagem por ELISA de captura a partir do sobrenadante da cultura de esplenócitos.
Óxido nítrico (NO)	Biomolécula produzido principalmente por macrófagos e que desempenha importante no controle de infecções e em respostas inflamatórias.	Dosado no sobrenadante da cultura de esplenócitos a partir da reação de Griess.

4.5 Métodos de coleta de dados

4.5.1 Dosagem das transaminases e imunoglobulinas totais

Amostras de sangue foram coletadas (8, 24h e 7 dias) após indução da HAE e as transaminases e imunoglobulinas foram avaliadas no plasma por espectrofotometria. Os níveis das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram quantificados por metodologia cinética-UV (Labtest, Belo Horizonte, MG, BR). As imunoglobulinas totais foram mensuradas por ELISA direto. As amostras foram distribuídas nas placas (100 μ L/poço) e anticorpos de cabra biotinilados anti-camundongo (Southern Biotechnology Associates, Inc., AL, USA) foram utilizados para detecção das imunoglobulinas. A reação foi revelada com o conjugado estreptoavidina-peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) e o-fenilenodiamino (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) em solução de tampão

citrato 0,1 M/pH 5 mais H₂O₂. A reação foi parada com solução de ácido cítrico 0,2 M e as placas lidas em 450 nm em leitor de ELISA (Thermo Plate, TP-READER B). Os resultados foram expressos como média da densidade óptica (DO) $\pm$ desvio padrão (DP).

4.5.2 Coleta do fígado e do baço

Sete dias após a administração da Con A os camundongos foram anestesiados, por via intramuscular, com solução de 10mg/Kg xilazina 2% e 80-115mg/Kg cetamina 10%. Em seguida, foi realizada a eutanásia por deslocamento cervical para remoção do baço, que foi processado para cultura celular, e do fígado, que foi analisado macroscopicamente, pesado e acondicionado em solução de formalina tamponada 10% para processamento histopatológico.

4.5.3 Cultura celular

Os camundongos foram anestesiados e eutanasiados 7 dias após indução da HAE e os baços dos animais dos grupos HAE, HAE+Asc e HAE+Asc+NAC foram coletados sob condições assépticas. Os esplenócitos foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA), acrescido de antibióticos (penicilina e estreptomicina 100 mg/L), HEPES 1M, L-glutamina 200 mM e suplementado com 10% de SFB (WL. Immunochemistry, Rio de Janeiro, Brazil). As células foram cultivadas com RPMI, Asc (20 μ g/ml) ou ConA (10 μ g/ml) por 24h ($2 \cdot 10^7$ células/mL) e 72h ($12 \cdot 10^6$ células/mL) em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

4.5.4 Dosagem de citocinas

Os sobrenadantes da cultura foram coletados e as citocinas determinadas por ELISA sanduiche com os anticorpos monoclonais de captura anti-IL5 (BVD1D11) e anti-IL10 (2A5)] e os anticorpos biotinilados [anti-IL5 (BVD624G2) e anti-IL10 (SXC1)]. Os níveis de IL-13 (R&D, Minneapolis, USA) e TGF- β (Invitrogen, Novex, USA) foram obtidos através de kit comercial. Os anticorpos biotinilados foram detectados usando o conjugado estreptavidina/peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) e ABTS (2-2-azinobis (3-ethylbenzene-thiazoline-6-sulphonic acid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) diluído em tampão citrato 0,1M mais H₂O₂. As placas foram lidas em espectrofotômetro. As amostras foram quantificadas por comparação com curva padrão dos recombinantes das citocinas purificadas [rIL-5 (BD Pharmingen, Becton, Dickinson and Company, USA) e rIL-10 (BD Pharmingen, Becton, Dickinson and Company, USA)]. A leitura foi realizada a 405 nm em leitor de ELISA (Thermo Plate, TP-READER B).

4.5.5 Dosagem de óxido nítrico

Os níveis de óxido nítrico (NO) foram determinados no sobrenadante da cultura através da reação colorimétrica de Griess (Griess, 1879). O sobrenadante foi adicionado a placas de 96 poços (3595, Costar, Cambridge, MA, USA) seguido do mesmo volume da solução reveladora, reagente de Griess (1% sulfonilamida e 0,1% naftiletilenodiamina) mais 2,5% de ácido fosfórico. Para confecção da curva padrão foi utilizada uma solução de NaNO_2 (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) a 100 μM , com limite de detecção de 1,56 μM . A leitura foi realizada a 540 nm em leitor de ELISA (Thermo Plate, TP-READER B). Os resultados foram expressos como média da densidade óptica (DO) $\pm$ desvio padrão (DP).

4.5.6 Processamento histológico

O fígado dos camundongos foi removido e fixado em formalina tamponada. Após sucessivas lavagens com etanol a 70% para completa remoção do fixador, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol a partir de 70% até álcool absoluto. Em seguida, um corte longitudinal da parte central do maior lobo foi seccionado, diafanizada em xilol e impregnado em parafina histológica fundida a 60°C. Posteriormente, foi incluído em parafina. Os cortes histológicos (4 μm) foram obtidos em micrótomo horizontal Yamato (Japan). Os cortes destinados ao estudo histopatológico foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e os destinados a estudo morfométrico foram corados pela técnica de Tricômico de Masson (JUNQUEIRA; BIGNOLOS; BRENTANI, 1979).

A análise histopatológica, contagem de leucócitos/campo em infiltrados inflamatórios no parênquima hepático, e o estudo morfométrico, mensuração da concentração de colágeno a partir da intensidade de coloração azul, foram mensurados através do software ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Pelo menos 20 micrografias (aumento de 100x) aleatórias de cada lâmina foram retiradas para análise (Nascimento et al., 2014).

4.5.7 Análise estatística

Para comparação entre os diferentes grupos, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA) para os dados paramétricos. Quando a ANOVA revelou a existência de diferença significativa, foi utilizado o Teste de Tukey, a fim de identificar que grupos diferiram entre si.

A significância estatística foi considerada admitindo-se um nível crítico de 5% em todos os casos.

4.5.8 Considerações éticas

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (nº 23076.041797/2013-40) (Anexo C).

5 RESULTADOS

Os resultados das análises estão apresentados no artigo intitulado “Efeitos imunorregulatórios do extrato solúvel de *Ascaris suum* e de sua associação com N-acetil-L-cisteína no tratamento da hepatite autoimune experimental” (APÊNDICE A), que será submetido ao periódico International Journal of Experimental Pathology.

6 CONCLUSÃO

Considerações acerca dos resultados alcançados após execução do projeto de pesquisa.

- ✓ O tratamento terapêutico com Asc não ocasionou alteração no peso hepático. Sua restauração só foi observada quando a NAC foi associada ao esquema terapêutico;
- ✓ A análise macroscópica do fígado demonstrou discretas alterações visuais na arquitetura hepática dos grupos tratados, em contraste com extensas áreas de lesão nos animais do grupo HAE. O tratamento com o Asc resultou em redução do infiltrado inflamatório, que foi acompanhada de menor produção de colágeno no tratado grupo HAE+Asc+NAC.
- ✓ O tratamento terapêutico com o Asc promoveu níveis mais baixos das transaminases nos animais tratados quando comparados ao grupo HAE, entretanto essa diferença foi significativa apenas em 7 dias;
- ✓ O tratamento terapêutico com o Asc promoveu níveis mais baixos de imunoglobulinas totais quando comparados ao grupo HAE, entretanto a redução foi mais precoce no grupo HAE+Asc+NAC;
- ✓ O Asc induziu aumento da produção de TGF- β , IL-10 e IL-5. Quando a NAC foi associada ao esquema terapêutica houve menor produção de IL-13 e NO quando comparados com os grupos HAE e HAE+Asc;

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.
- ALVAREZ, F. et al. International Autoimmune Hepatitis Group Report: review of criteria for diagnosis of autoimmune hepatitis. **J Hepatol**. 1999;31:929-38.
- AMBERG, S. Hyperproteinemia associated with severe liver damage. **Mayo Clinic Proceedings**. 1942;17:360–362.
- ANAND, S.; WANG, P.; YOSHIMURA, K.; et al. Essential role of TNF family molecule light as a cytokine in the pathogenesis of hepatitis. **J ClinInvest**, v. 116, n. 4, p. 1045-1051, 2006.
- ANDRADE, Z. A. Regressão da fibrose hepática. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 2005.38(6):514-520.
- ARAÚJO, J. V.;BRAGA, F. R.; SILVA, A. R.; ARAUJO, J. M.;TAVELA, A. O. In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi *Duddingtonia Flagrans*, *Monacrosporium Sinense*, and *Pochonia Chlamydosporia* on *Ascaris suum* eggs. **Parasitol Res**, v. 102, n. 4, p. 787-90, 2008.
- 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.
- 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.
- CHEN, Y.; WEI, H.; SUN, R.; et al. Increased Susceptibility to Liver Injury in Hepatitis B Virus Transgenic Mice Involves NKG2D-Ligand Interaction and Natural Killer Cells. **Hepatology**,; v. 46, n. 3, p. 706-15, 2007.
- CARAMBIA, A.; HERKEL, J. CD4 T cells in hepatic immune tolerance. **J Autoimmun**, v. 34, n. 1, p. 23-8, 2010.
- CHEN, C. H.; KUO, L. M.; CHANG, Y. et al. In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice. **Hepatology**, v. 44, n. 5, p. 1171-1181, 2006.
- 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.

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. 2014a.

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.

CZAJA, A. J. Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 10, p. 2515–32, 14 mar. 2014b.

CRISPE, I. N. Hepatic T cells and liver tolerance. **Nat. Rev. Immunol**, v. 3, n. 1, p. 51-62, 2003.

DE OLIVEIRA, C. P. M. S. et al. Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology**, v. 38, n. 2, p. 159–65, jan. 2008.

DUNNE, D. W.; COOKE, A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune diseases. **Nat. Rev. Immunol**, v. 5, n. 5, p. 420-6, 2005.

ELIAS, D; WOLDAY, D; AKUFFO, H; 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.; RIVERA-MONTOYA, I.; CÁRDENAS-ARREOLA, R.; et al. *Taenia crassiceps* Infection attenuates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. **J biomed biotechnol**, v. 2010, 850541, 2010.

FAQUIM-MAURO, E. L.; MACEDO, M. S. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. **ClinExpImmunol**, v. 114, n. 2, p. 245-51, 1998.

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

GINDERACHTER JO A VAN, MOVAHEDI K, GHASSABEH GH, MEERSCHAUT S, BESCHIN A, RAES G, et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology**. 2006; 211: 487-501.

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 bleomycin in mice. **Am J Respir Crit Care Med.** 2000;162:225–31.

HELLERBRAND SC, TSUKAMOTO H, BRENNER DA, RIPPE RA. Expression of intracellular adhesion molecule 1 by activated hepatic stellate cells. *Hepatology* 1996; 24: 670-676 [PMID: 8781341 DOI: 10.1002/hep.510240333]

HOMBERG JC, ABUAF N, BERNARD O, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of “autoimmune” hepatitis. **Hepatology**, v. 7, n. 6, p. 1333-1339, 1987.

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.

ITAMI DM, OSHIRO TM, ARAUJO CA, et al. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. **Clin Exp Allergy**, v. 35, n. 7, p. 873-9, 2005.

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

JONULEIT, H; SCHMITT, E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 171(12):6323–6327, 2003.

JUNQUEIRA, L. C. U; BIGNOLOS, G; BRENTANI, R. R. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. **Histochemical Journal**. Londres, v. 11: p. 447-55, 1979.

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

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.

LEE, M.-H.; MURPHY, G. Matrix metalloproteinases at a glance. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 18, p. 4015–6, 15 ago. 2004.

LEE, U. E.; FRIEDMAN, S. L. NIH Public Access. p. 1–15, 2012.

LEMOES LVB, 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.

LIMA, C.; PERINI, A.; GARCIA, M. L.; et al. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (*Ascaris suum*) extract in a murine model of asthma. **ClinExp Allergy**, v. 32, n. 11, p. 1659-1666, 2002.

LIWSKI R, ZHOU J, MCALISTER V, LEE TD. 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 MS, MA Y, MIELI-VERGANI G, VERGANI D. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. **J Autoimmun.**; v. 34, p. 7-14, 2010.

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

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.

MACEDO SOARES MF, DE MACEDO MS, MOTA I. Antigenic competition in IgE, IgG1 and IgG2 antibody production in the mouse. **Int Arch Allergy Appl Immunol.**; v. 78, p. 449-51, 1985.

MACHADO P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anbras Dermatol**. 2004. 79 (6):647-664.

MAJANO, P. L. et al. N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes. **Journal of hepatology**, v. 40, n. 4, p. 632–7, abr. 2004.

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.

MANNS MP, VOGEL A. Autoimmune hepatitis, from mechanisms to therapy. **Hepatology**. 2006;43:S132–S144.

MARTINI E, ABUAF N, CAVALLI F, et al. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. **Hepatology**, v. 8, n. 6, p. 1662-1666, 1988.

MEDINA J, GARCÍA-BUEY L, MORENO-OTERO R. Review article: immunopathogenetic and therapeutic aspects of autoimmune hepatitis. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 17, n. 1, p. 1-16, 2003.

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

NEVES, D. P. et al. In: de Melo, A. L.; Coelho, P. M. Z. **Parasitologia humana. Schistosoma mansoni e a doença.** 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p.193-212.

OLIVEIRA, C.P.M.S et al. Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. **Hepatol res** 38(2), 159–165, 2008.

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

OSHIRO TM, ENOBE CS, ARAÚJO CA, 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 TM, RAFAEL A, ENOBE CS, et al. Comparison of different monoclonal antibodies against immunosuppressive proteins of *Ascaris suum*. **Braz J Med Biol Res.**; v. 37, p. 223-6, 2004.

PARK SZ, NAGORNEY DM, CZAJA AJ. Hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis. **Dig Dis Sci.**; v. 45, p. 1944-8, 2000.

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: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/Gestor/visualizar_texto.cfm?idtxt=33819> Acesso em: 16 de fev. 2013.

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 FA, LEITE AK, POMPEU MM, et al. Protective Effect of an Extract from *Ascaris suum* in Experimental Arthritis Models. **Infect. Immun**, v. 76, p. 2736-45, 2008.

SABIN EA, ARAÚJO MI, CARVALHO EM, PEARCE EJ. 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.

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.

SILVA SR, JACYSYN JF, MACEDO MS, FAQUIM-MAURO EL. Immun o suppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. **Eur J Immunol**, v. 36, p. 3227-37, 2006.

SOARES MF, DE MACEDO MS, PERINI A, Mota I. 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 MF, MACEDO MS, 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 MF, OLIVEIRA EB, MOTA I, MACEDO MS. 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 MF, PERINI A, MOTA I, MACEDO MS. Further characterization of *Ascaris suum* component(s) with suppressive activity on the IgE antibody response. **Braz J MedBiolRes**, v. 23, p. 589-92, 1990.

SOARES MF, MOTA I, MACEDO MS. 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.

SUGAWARA, Y. et al. Th2 Immune Responses and Alternatively Activated Macrophages (AAMacs) in Helminth Infection in Aged Mice. 2010.

SUGIURA, H. et al. N-acetyl-L-cysteine inhibits TGF- β 1-induced profibrotic responses in fibroblasts. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**. 2009. 22: 487–491.

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

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

TIEGS, G.; LOHSE, A. W. Immune tolerance: what is unique about the liver. **J Autoimmu**, v. 34, n. 1, p. 1-6, 2010.

TIEGS, G.; HENTSCHEL, J.; WENDEL, A. A T Cell-dependent Experimental Liver Injury in Mice Inducible by Concanavalin A. **J Clin Invest**, v. 90, n. 1, p. 196-203, 1992.

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.

VERHASSELT, V. et al. N-Acetyl-L-Cysteine Inhibits Primary Human T Cell Responses at the Dendritic Cell Level: Association with NF- κ B Inhibition. **J Immunol**, 1999, 162: 2569–2574.

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 J Gastroenterol**. 2012 Jan 14;18(2):119-25.

WILSON, M. S. et al. NIH Public Access. v. 85, n. 2, p. 148–154, 2012.

WINAU F, HEGASY G, WEISKIRCHEN R, WEBER S, CASSAN C, SIELING PA, MODLIN RL, LIBLAU RS, GRESSNER AM, KAUFMANN SH. Ito cells are liver-resident antigen-presenting cells for activating T cell responses. *Immunity* 2007; 26: 117-129 [PMID: 17239632 DOI: 10.1016/j.immuni.2006.11.011]

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

XU, L.; ZHANG, F.; XU, W.; XIONG, S. Specific antibodies induced by DNA vaccination with extracellular domain of CD25 gene protect against ConA-induced autoimmune hepatitis. **Clin Immunol**, v. 132, n. 3, p. 412-419, 2009.

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.

ZAFARULLAH, M. et al. Cellular and Molecular Life Sciences Molecular mechanisms of N - acetylcysteine actions. v. 60, p. 6–20, 2003.

ZHANG, X. et al. Opposite effects of high and low doses of interleukin-2 on T cell-mediated hepatitis in mice (interleukin-2). **Hepatol Int.** 2010; 184: 6585-6591.

ZHENG, Z. Y.; WENG, S. Y.; YU, Y. Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. **World J Gastroenterol.** 2009. 15:5776-578

APÊNDICE

APÊNDICE A: Artigo em Português

Revista: International Journal of Experimental Pathology

Fator de impacto: 2,052

Qualis: B1

ISSN online: 1365-2613

Efeitos imunorregulatórios do extrato de *Ascaris suum* e de sua associação com N-acetil-L-cisteína no tratamento da hepatite autoimune experimental

Roeckson Carlos P. Silva*, Raul P. C. Silva*, Wheverton Ricardo C. Nascimento*, Erica F. Souza*; André L. Aires*; Nicodemos T. Pontes Filho†, Mônica C. P. A. Albuquerque*, Vláudia Maria A. Costa*, Valdênia Maria O. Souza*

*Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil e †Departamento de Patologia, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, Brasil

Contribuição dos autores: Roeckson Carlos P. Silva realizou os experimentos e escreveu o artigo; Raul P. C. Silva, Wheverton Ricardo C. Nascimento e Erica F. Souza coletaram os dados e realizaram os procedimentos técnicos; André L. Aires e Nicodemos T. Pontes Filho realizaram a análise histopatológica e a revisão crítica do artigo; Mônica C. P. A. Albuquerque, Vláudia Maria A. Costa e Valdênia Maria O. Souza planejaram o estudo, a análise estatística e revisaram criticamente o artigo.

Endereço para contato: Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza, professor associado, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA. Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, CEP: 50670-901. Recife-PE, Brasil. valdenia.souza@gmail.com

Tel.: + 55 81 2126 8484 Fax: + 55 81 2126 8485

RESUMO

Contexto e objetivos: O extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc) possui efeito anti-inflamatório e imunossupressivo, porém a durante hepatite autoimune experimental foi capaz de induzir a produção colágeno. A N-acetil-L-cisteína (NAC), que apresenta propriedades antioxidantes e antifibróticas, pode melhorar a ação do Asc em modelos de desordens inflamatórias, reduzindo a síntese de colágeno. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos do Asc e de sua associação com a NAC como estratégia de tratamento para hepatite autoimune, que apresenta a cirrose como principal complicação decorrente de falha na terapia convencional.

Metodologia: A hepatite autoimune experimental foi induzida pela administração intravenosa da lectina concanavalina A em animais BALB/c (HAE). Após indução, um grupo foi tratado com Asc (HAE+Asc) e outro grupo com Asc e NAC (HAE+Asc+NAC). Como controle, um grupo foi tratado com salina (HAE). Foram quantificados e comparados entre os grupos o peso hepático e sua análise anatomohistopatológica, os níveis das transaminases e imunoglobulinas totais, a produção de óxido nítrico (NO) e das citocinas interleucina (IL)-5, IL-10, IL-13 e do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β).

Resultados: Nos grupos tratados, o Asc ocasionou a redução dos níveis das transaminases, imunoglobulinas totais e do infiltrado inflamatório, bem como, o aumento da produção de TGF- β quando comparados com o grupo HAE. Quando a NAC foi associada ao esquema terapêutico, a produção de colágeno foi controlada e acompanhada por níveis reduzidos de NO e IL-13. No grupo HAE+Asc+NAC também foi observada redução do peso hepático e níveis elevados de IL-5 e IL-10.

Conclusão: A estratégia de tratamento para HAE foi melhorada quando a NAC foi associada ao Asc no esquema terapêutico.

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

INTRODUÇÃO

A hepatite autoimune (HAI) é uma doença inflamatória crônica de etiologia desconhecida, caracterizada pela presença de autoanticorpos circulantes, hipergamaglobulinemia e alterações necroinflamatórias (Makol et al. 2011). Seu tratamento é realizado através da terapia imunossupressora, cujo objetivo é controlar a hiper-responsividade celular dependente de células T e B, melhorando os sintomas clínicos e aumentando a sobrevida dos pacientes (Manns et al. 2010). Entretanto, complicações secundárias como a cirrose, que é um fator de risco para o desenvolvimento do carcinoma hepatocelular, costumam ocorrer em 40% dos pacientes tratados (Teufel et al. 2009; Yeoman et al. 2008). Desse modo, o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas que suplementem o tratamento convencional torna-se imprescindível.

Infecções helmínticas ou imunizações com seus produtos têm sido avaliadas em diferentes modelos experimentais de doenças inflamatórias e desordens autoimunes, auxiliando no desenvolvimento de terapias para doenças humanas (Sofronic-Milosavljevic et al. 2013; Carranza et al. 2012; Pesce et al. 2009). Com relação ao extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc), seu potencial efeito anti-inflamatório e imunossupressivo foi demonstrado em modelos de asma alérgica, na artrite reumatoide e na hepatite autoimune experimental (HAE) e foi associado a sua capacidade de induzir altos níveis de interleucina (IL)-10 e do fator de transformação do crescimento (TGF)- β (Nascimento et al. 2014; Cho et al. 2011; Rocha et al. 2008).

O modelo de indução da HAI é baseado na administração intravenosa da lectina concanavalina A (ConA) e causa um aumento massivo de linfócitos T CD4⁺ no parênquima hepático, conduzindo a secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-2, IL-6, fator estimulador de colônias granulocíticas (G-CSF), fator de necrose tumoral(TNF)- α e interferon(IFN)- γ) (Sclavons et al. 2013; Tiegs et al. 1992; Wang et al. 2012). Células de Kupffer (KC) e células estreladas hepáticas (HSC) também estão envolvidas na sua patogênese por promoverem inflamação (espécies reativas do oxigênio (ROS) e NO) e respostas fibrogênicas (Czaja 2014; Cohen-Naftaly e Friedman 2011). O tratamento profilático e terapêutico da HAE com o Asc atenuou o dano hepático, com redução do infiltrado inflamatório e indução de um perfil imunossupressor T helper(Th)2 (IL-4, IL-10 e IL-13). Contudo, no tratamento terapêutico foi observado aumento da fibrose (Nascimento et al. 2014). Sabendo que o tratamento profilático da HAI torna-se inviável, por tratar-se de uma doença de etiologia

complexa e imprevisível, o aprimoramento do tratamento terapêutico é mais factível do ponto de vista clínico.

A N-acetil-L-cisteína (NAC) apresenta potente efeito antioxidante e sua capacidade imunomodulatória e ação antifibrótica tem sido evidenciadas em diferentes modelos animais (Hagiwara et al. 2000; Aires et al. 2012; Alturfan et al. 2012). Na intoxicação experimental por acrilamida, a NAC restaurou os níveis das transaminases séricas e reverteu a fibrose hepática, regulando a produção de mediadores inflamatórios (TNF- α , IL-1 e IL-6) e o balanço oxidante/antioxidante (Alturfan et al. 2012). Durante esquistossomose experimental, a NAC atenuou o dano hepático, com diminuição dos níveis de NO e IFN- γ , elevação dos níveis de IL-10 e redução do tamanho dos granulomas e do grau de fibrose (Aires et al. 2012). Na esteatohepatite não-alcoólica, a associação entre a NAC e a metformina reduziu a fibrose hepática e o infiltrado inflamatório (Oliveira et al., 2008). Desse modo, é possível que a NAC possa conter a fibrose hepática e aprimore o tratamento terapêutico da HAE com Asc.

Portanto, no presente trabalho o Asc e a NAC foram avaliados terapeuticamente em um modelo murino de HAE induzida por ConA. Nos grupos tratados, o Asc ocasionou a redução dos níveis das transaminases, imunoglobulinas totais e do infiltrado inflamatório, bem como, o aumento da produção de TGF- β . Quando a NAC foi associada ao esquema terapêutico, a produção de colágeno foi controlada e acompanhada por níveis reduzidos de NO e IL-13. No grupo HAE+Asc+NAC também foi observada redução do peso hepático e níveis elevados de IL-5 e IL-10.

MATERIAIS E MÉTODOS

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

O extrato de vermes adultos de *A. suum* foi produzido segundo protocolo de Souza et al. (2002), onde 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 ressuspenso 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. Para administração nos animais, as alíquotas foram diluídas em solução estéril de tampão fosfato de sódio (PBS) 0,01M, pH 7,2.

A concanavalina A tipo IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) e a N-acetil-L-cisteína (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) foram diluídas em solução estéril de PBS 0,01M, pH 7,2.

Animais, formação dos grupos de estudo, esquema terapêutico e considerações éticas

Camundongos machos BALB/c, provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE), foram mantidos em gaiolas (5-6 animais), sob condições padronizadas de temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) e luminosidade (ciclos de 12h de claro e 12h de escuro) e com água e alimento *ad libitum*.

Para execução do estudo, três grupos (6 animais/grupo) foram formados e a HAE foi induzida em todos os animais através da administração por via intravenosa (v.i.) da Con A, na dose de 10 mg/Kg. Trinta minutos após sua indução, um grupo foi tratado com NAC, dose 200 mg/kg, de 12/12h, durante 6 dias, por via oral (v.o.); e Asc, duas horas após a indução, em dose única de 1mg/animal por via intraperitoneal (i.p.) (grupo HAE+Asc+NAC). Enquanto outro grupo foi tratado com salina estéril por v.o. e Asc por via i.p. (Grupo HAE+Asc). Como controle tratamento, animais receberam apenas salina estéril (grupo HAE). O modelo experimental foi desenvolvido a partir dos estudos de Nascimento et al. 2014 e Aires et al. 2013.

O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (nº 23076.041797/2013-40).

Dosagem das transaminases e imunoglobulinas totais

Amostras de sangue foram coletadas (8, 24h e 7 dias) após indução da HAE e as transaminases e imunoglobulinas foram avaliadas no plasma por espectrofotometria. Os níveis das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram quantificados por metodologia cinética-UV (Labtest, Belo Horizonte, MG, BR) em espectrofotômetro Hitachi, Japan. As imunoglobulinas totais foram mensuradas por ELISA direto. As amostras foram distribuídas nas placas (100µL/poço) e anticorpos de cabra biotinizados anti-camundongo (Southern Biotechnology Associates, Inc., AL, USA) foram utilizados para detecção das imunoglobulinas. A reação foi revelada com o conjugado estreptoavidina-peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) e o-fenilenodiamino (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) em solução de tampão citrato 0,1 M/pH 5 mais H_2O_2 . A reação

foi parada com solução de ácido cítrico 0,2 M e as placas lidas em 450 nm em leitor de ELISA Thermo Plate, TP-READER B.

Cultura de esplenócitos, dosagem de citocinas e óxido nítrico

Os camundongos foram anestesiados e eutanasiados 7 dias após indução da HAE e os baços dos animais dos grupos HAE, HAE+Asc e HAE+Asc+NAC foram coletados sob condições assépticas. Os esplenócitos foram cultivados em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA), acrescido de antibióticos (penicilina e estreptomicina 100 mg/L), HEPES 1M, L-glutamina 200 mM e suplementado com 10% de SFB (WL. Immunochemistry, Rio de Janeiro, Brazil). As células foram cultivadas com RPMI, Asc (20 µg/ml) ou ConA (10 µg/ml) por 24h (2.10^7 células/mL) e 72h (12.10^6 células/mL) em estufa a 37 °C e 5% de CO₂.

Os sobrenadantes da cultura foram coletados e as citocinas determinadas por ELISA sanduiche com os anticorpos monoclonais de captura anti-IL5 (BVD1D11) e anti-IL10 (2A5)] e os anticorpos biotinilados [anti-IL5 (BVD624G2) e anti-IL10 (SXC1)]. Os anticorpos biotinilados foram detectados usando o conjugado estreptavidina/peroxidase (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) e ABTS (2-2-azinobis (3-ethylbenzene-thiazoline-6-sulphonic acid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) diluído em tampão citrato 0,1M mais H₂O₂. As placas foram lidas em espectrofotômetro. As amostras foram quantificadas por comparação com curva padrão dos recombinantes das citocinas purificadas [rIL-5 (BD Pharmingen, Becton, Dickinson and Company, USA) e rIL-10 (BD Pharmingen, Becton, Dickinson and Company, USA)]. Os níveis de IL-13 (R&D, Minneapolis, USA) e TGF-β (Invitrogen, Novex, USA) foram obtidos através de kit comercial. A leitura foi realizada a 405 nm em leitor de ELISA Thermo Plate, TP-READER B.

Os níveis de óxido nítrico (NO) foram determinados no sobrenadante da cultura através da reação colorimétrica de Griess (Griess 1879). O sobrenadante foi adicionado a placas de 96 poços (3595, Costar, Cambridge, MA, USA) seguido do mesmo volume da solução reveladora, reagente de Griess (1% sulfonilamida e 0,1% naftiletilenodiamina) mais 2,5% de ácido fosfórico. Para confecção da curva padrão foi utilizada uma solução de nitrito de sódio (NaNO₂) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) a 100 µM, com limite de detecção de 1,56 µM. A leitura foi realizada a 540 nm em leitor de ELISA Thermo Plate, TP-READER B.

Obtenção do fígado para análise anatomohistopatológica

Após eutanásia, os fígados dos animais foram analisados macroscopicamente, pesados e fixados em formalina tamponada a 10%. Em seguida, um corte longitudinal da parte central do maior lobo foi realizado e o fragmento resultante foi fixado, desidratado e emblocado em parafina. Os cortes histológicos (4µm) foram obtidos em micrótomo horizontal Yamato (Japan) e corados com hematoxilina-eosina (HE) e tricrômico de Masson (TM) para análise histopatológica e morfométrica, respectivamente (Junqueira; Bignolos; Brentani, 1979)

A análise histopatológica, contagem de leucócitos/campo em infiltrados inflamatórios no parênquima hepático, e o estudo morfométrico, mensuração da concentração de colágeno a partir da intensidade de coloração azul, foram mensurados através do software ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Pelo menos 20 micrografias (aumento de 100x) aleatórias de cada lâmina foram retiradas para análise (Nascimento et al., 2014).

Análise estatística

Para comparação entre os diferentes grupos, foi empregada a Análise de Variância (ANOVA) para os dados paramétricos. Quando a ANOVA revelou a existência de diferença significativa, foi utilizado o Teste de Tukey, a fim de identificar quais grupos diferiram entre si. A significância estatística foi considerada admitindo-se um nível crítico de 5% em todos os casos.

RESULTADOS

Tratamento terapêutico com Asc e NAC melhoram os parâmetros avaliados na HAE

Após administração da ConA, o dano hepatocelular pode ser evidenciado pela elevação sérica dos níveis das transaminases e das imunoglobulinas totais e pelo aumento do peso hepático (Fig. 1). Os grupos de animais tratados terapeuticamente com o Asc e com a NAC apresentaram níveis reduzidos de ALT e AST quando comparados ao grupo HAE, entretanto uma redução significativa foi observada apenas no 7º dia (Fig. 1a, b). A produção de Ig total foi reduzida no grupo HAE+Asc em 7 dias, enquanto no grupo HAE+Asc+NAC essa produção foi estatisticamente menor em 8-24 horas (Fig. 1c). Em relação ao peso hepático, somente o grupo HAE+Asc+NAC apresentou uma redução significativa quando comparado com o grupo HAE e HAE+Asc (Fig. 1d).

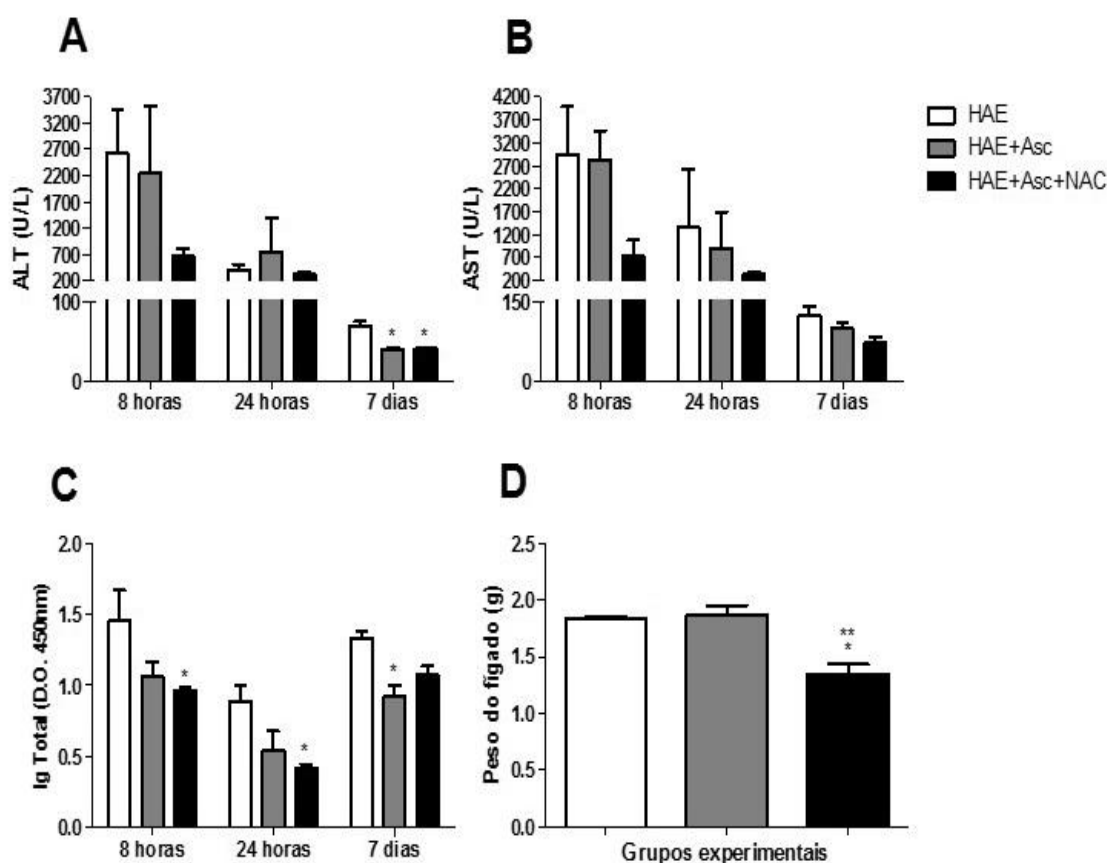


Figura 1. Níveis das transaminases, imunoglobulinas totais e peso do fígado após indução da HAE e tratamento terapêutico com Asc e Asc+NAC. Transaminases ALT (A) e AST (B), imunoglobulinas totais (C) e peso do fígado (D). * $p < 0,05$ comparado com o grupo HAE; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo HAE+Asc. Colocar como os resultados foram calculados.

Níveis de NO e citocinas após o tratamento terapêutico com Asc e NAC

Células esplênicas dos animais com HAE e os submetidos ao tratamento foram cultivadas com Asc ou ConA e os sobrenadantes coletados para dosagem de citocinas e NO. O sobrenadante de células cultivadas apenas com meio de cultura também foi avaliado (basal). Nos animais do grupo HAE são observados níveis basais baixos de IL-5, enquanto que nos animais tratados sua produção foi maior, com aumento significativo apenas no grupo HAE+Asc+NAC. Sob estímulo da ConA, a produção de IL-5 foi significativamente menor nos grupos HAE e HAE+Asc, porém maior no grupo HAE+Asc+NAC. Quando estimulados pelo Asc, apenas os grupos tratados tiveram aumento de sua produção, o qual foi significativo apenas no grupo HAE+Asc+NAC (Fig. 2a).

A produção basal de IL-10 foi maior nos animais tratados quando comparados ao grupo HAE. O estímulo com a ConA ocasionou aumento de sua produção em todos os grupos, mas somente o grupo HAE+Asc+NAC demonstrou significância. Sob estímulo do Asc, sua produção foi significativa apenas no grupo HAE+Asc+NAC (Fig. 2B). A produção basal de IL-

13 atingiu altos níveis no grupo HAE em oposição aos baixos níveis observados nos grupos tratados. O estímulo induzido pela ConA elevou os níveis de IL-13 no grupo HAE+Asc+NAC, entretanto a estimulação com o Asc inibiu sua síntese (Fig. 2C).

Com relação à produção de TGF- β houve aumento da sua produção basal nos animais tratados quando comparados ao grupo HAE, entretanto não houve diferença estatística. O estímulo *in vitro* com a ConA induziu níveis de TGF- β , superiores aos induzidos pelo Asc, apenas nos grupos HAE+Asc e HAE+Asc+NAC (Fig. 2D).

Foi observada a produção aumentada de NO, apenas sob estímulo *in vitro* da ConA e somente no grupo HAE. Nos grupos tratados apenas com Asc a produção basal de NO foi superior a dos grupos HAE e HAE+Asc+NAC, que apresentaram níveis semelhantes (Fig. 2E).

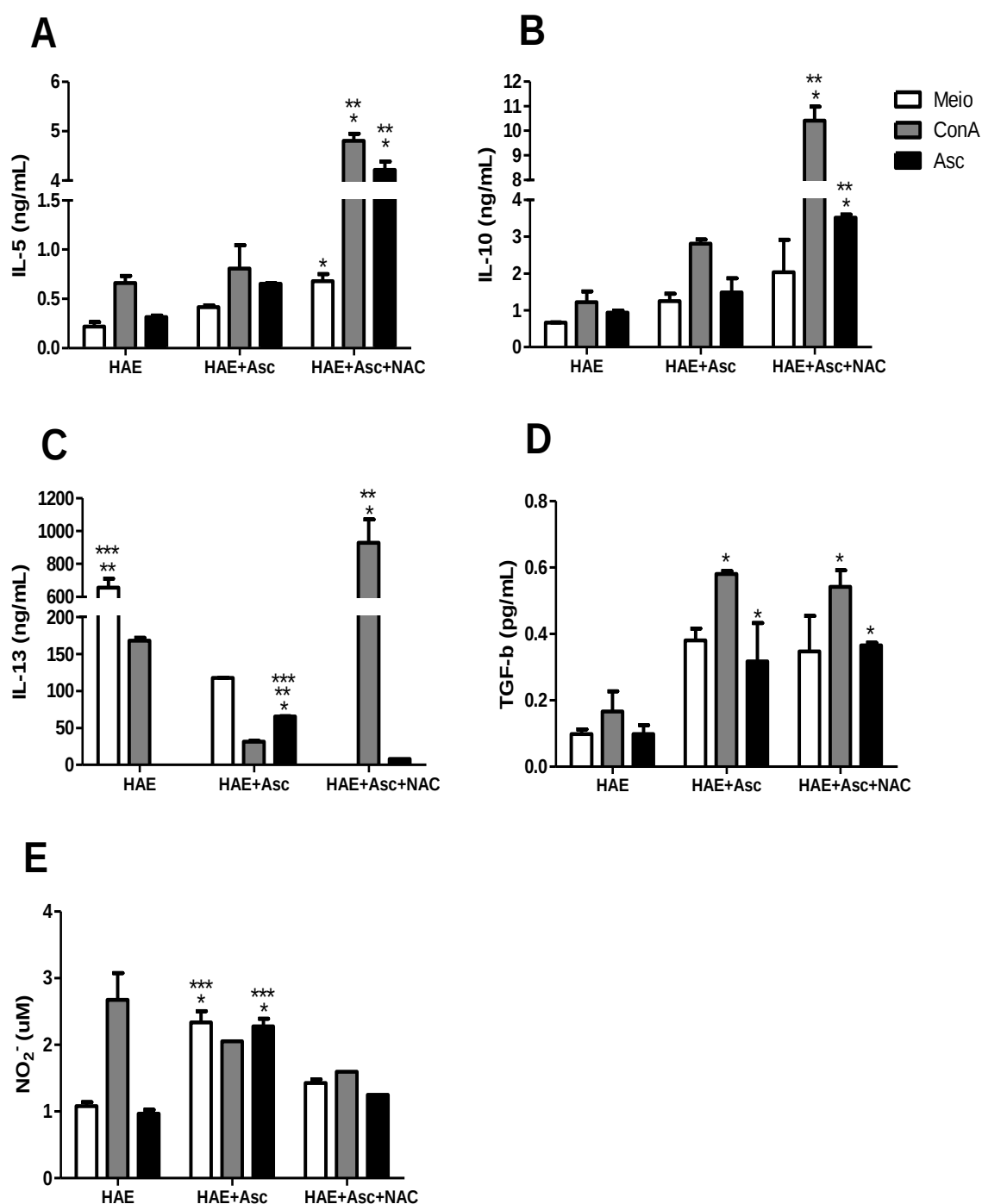


Figura 2. Níveis das citocinas produzidas por esplenócitos 7 dias após indução da HAE e tratamento terapêutico com Asc e Asc+NAC. Os esplenócitos foram cultivados *in vitro* sem estímulo ou estimulados com Asc (20µg/mL) e ConA (10µg/mL) nos tempos de 24h ($2 \cdot 10^7$ células/mL) e 72h ($12 \cdot 10^6$ células/mL). As citocinas foram mensuradas no sobrenadante em 24h (IL-10) e 72h (IL-5, IL-13 e TGF-β) por ELISA de captura. O NO foi mensurado no sobrenadante em 24h. Níveis de IL-5 (A), IL-10 (B), IL-13 (C), TGF-β (D) e NO (E). * $p < 0,05$ comparado com o grupo HAE; ** $p < 0,05$ comparado com o grupo HAE+Asc

Análise anatomohistopatológica do fígado

Nos animais do grupo HAE, na análise macroscópica do fígado, foram observadas alterações no parênquima hepático: áreas de coloração branca, levemente endurecidas a palpação e sem aderências locais, que acometem proporções maiores do órgão, sem contornos e limites definidos. Todavia, nos animais tratados são observadas áreas de menor extensão, focais e bem delimitadas. O tecido cicatricial pode ser observado em todos os grupos (Fig. 3).

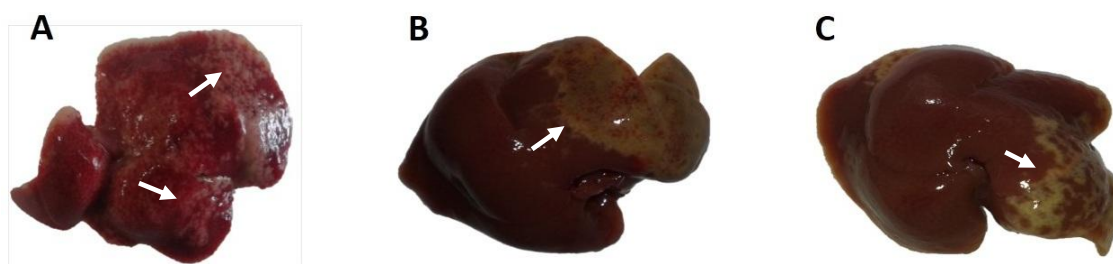


Figura 3. Aspecto macroscópico do fígado de camundongos decorridos 7 dias após indução da HAE e tratamento terapêutico com Asc e Asc+NAC. (A) Grupo HAE; (B) Grupo HAE+Asc e (C) Grupo HAE+Asc+NAC. Setas brancas indicam áreas de tecido cicatricial.

A análise histomorfométrica do tecido hepático mostra a presença de leucócitos e colágeno no grupo HAE, bem como no grupo HAE+Asc. Contudo, no grupo HAE+Asc+NAC houve redução significativa do infiltrado inflamatório e indução de menos fibrose quando comparados aos outros grupos (Tabela 1).

Tabela 1. Análise histomorfométrica do tecido hepático

Grupos	Histologia	Morfometria
	Leucócitos/campo ($\pm$ DP) [§]	Colágeno/cm ² ($\pm$ DP) [¥]
HAE	962 (67,02)	126,51 (5,48)
HAE+Asc	767 (168,15)	127,36 (4,88)
HAE+Asc+NAC	587 (63,82)*	108 (10,37)* **

[§]Média $\pm$ desvio padrão de leucócitos contados por campo obtidos de diferentes grupos usando o software ImageJ

[¥]Média $\pm$ desvio padrão da proporção de colágeno obtidos de diferentes grupos usando o software ImageJ

*p < 0,05 comparado com o grupo HAE; **p < 0,05 comparado com o grupo HAE+Asc

DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos os efeitos terapêuticos do Asc e de sua associação com a NAC em um modelo animal que mimetiza a HAI em humanos. A administração terapêutica do Asc atenuou o dano hepatocelular, ocasionando uma redução dos níveis das transaminases e imunoglobulinas totais através da indução de uma resposta imune de perfil Th2. Quando a NAC

foi associada ao esquema terapêutico, esse efeito hepatoprotetor foi mais evidente, com redução precoce dos marcadores sorológicos e do peso hepático e pela sustentação de uma resposta Th2, com níveis elevados de IL-10, e uma produção reduzida de NO e IL-13.

A administração do Asc induz um aumento da produção de IL-4, IL-10 e IL-13 em animais com HAE (Nascimento et al. 2014). Essas citocinas tem sua produção intensificada durante as helmintíases e são, juntamente com a IL-5, importantes no controle da infecção (Girgis et al. 2013). Aqui, observamos maior produção de IL-5 e TGF- β . Estes resultados em conjunto apontam para um perfil Th2/T regulatório(Treg). Essa polarização da resposta imune para um perfil Th2 pode exercer funções inibitórias sob o perfil pró-inflamatório observado na HAE, onde as citocinas IL-10 e IL-4 são importantes por inibirem a produção e proliferação de células Th1. As infecções por helmintos também induzem a expansão de linfócitos Treg, que podem limitar agressão imune através da produção de IL-10 e TGF- β . Essas células são essenciais para manutenção da autotolerância e sua deficiência é comum em doenças autoimunes (Wang et al. 2012; Carambia e Herkel 2010).

A citocina TGF- β mantém o controle homeostático das reações imunes inatas e celulares, por inibir a função e ativação de células T, macrófagos e células dendríticas. Entretanto, esta citocina pode exercer efeitos complexos sobre a diferenciação de subconjuntos funcionalmente distintos de células T, mediando respostas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias (Schon e Weiskirchen, 2014). Na presença de TGF- β e IL-6 é induzido um perfil clássico de linfócitos Th17, produtores de IL-21, IL-9 e IL-10. Entretanto, na ausência de TGF- β e presença de IL-6 e IL-23, são geradas células Th17 mais patogênicas, produtoras de IL-22, fator estimulador de colônias granulocíticas-monocíticas (GM-CSF) e IFN- γ (Akdis et al. 2012). Além disso, tem sido demonstrado que na ausência de IL-6, o TGF- β favorece a geração de linfócitos Treg (Bettelli et al. 2006). Aqui, acreditamos que o perfil Th2 induzido pela Asc pode contrabalancear a ação da IL-6 e favorecer a ação anti-inflamatória do TGF- β , com possível geração de células Treg.

O potencial hepatoprotetor do Asc pode estar relacionado com sua capacidade de suprimir a resposta imune humoral e celular, cujas propriedades são mediadas por componentes de alto peso molecular, que apresentam efeito supressivo por induzir a produção de TGF- β e IL-10 (Antunes et al. 2014; Araújo et al. 2008; Oshiro et al. 2005; Souza et al. 2002). Níveis aumentados dessas citocinas nos grupos HAE+Asc e HAE+Asc+NAC podem estar relacionados com o controle da resposta inflamatória e limitação do dano hepatocelular, refletido na redução das transaminases, imunoglobulinas totais e no peso hepático.

O perfil de citocinas observado nos grupos HAE+Asc e HAE+Asc+NAC sugere que o Asc induziu a diferenciação de linfócitos Treg, como observada na asma alérgica, onde proteína 1 do *A. suum* (PAS-1) inibiu seu desenvolvimento por indução de um aumento significativo de linfócitos T regulatórios e secreção de IL-10/TGF- β (Araújo et al. 2010). Sua expansão e o aumento funcional durante as infecções por helmintos podem ser responsável pela supressão imune em diferentes modelos de doenças inflamatórias (Yang et al. 2014; Carranza et al. 2012; Wilson et al. 2005).

A resposta inflamatória na HAE é caracterizada pela polarização de um perfil Th1 (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-1) e envolve participação de linfócitos, células endoteliais sinusoidais, KC e HSC (Sclavons et al. 2013; Zheng et al. 2009; Wang et al. 2012). O Asc pode alterar a expressão de moléculas do complexo maior de histocompatibilidade(MHC) classe II e coestimulatórias (grupo de diferenciação(CD)40, CD80 e CD86) em células apresentadoras de antígeno(APCs), afetando a ativação de células T e reduzindo a hiperresponsividade celular via mecanismos dependentes de IL-10 (Silva et al. 2006; Faquim-Mauro; Macedo, 1998). Em conjunto com o Asc, a NAC pode reduzir a expressão gênica do fator de transcrição fator nuclear(NF)- κ B em linfócitos T, limitando a produção de citocinas pró-inflamatórias, e modular a expressão de óxido nítrico sintase induzida(iNOS) em KC, limitando a apoptose nos hepatócitos, por redução da produção de NO e ROS (Oliveira et al. 2008; Majano et al. 2004; Zafarullah et al. 2003). Além de interromper maturação de células dendríticas, alterando a expressão de moléculas de superfície (antígeno leucocitário humano(HLA)-DR, CD86 e CD40) e as respostas primárias de linfócitos T (Verhasselt et al. 1999).

Um microambiente hepático com os altos níveis de IL-13 promove fibrose como parte da fase de reparação tecidual, por estimular fibroblastos e macrófagos alternativamente ativados (M2) a sintetizarem colágeno (Sugawara et al. 2011; Benzel et al. 2012). De fato, o Asc induziu a síntese de IL-13 acompanhado de aumento de fibrose no grupo HAE (Nascimento et al. 2014). Aqui, no grupo HAE+Asc+NAC a produção de IL-13 foi inferior a do grupo HAE e associada com a redução dos níveis de NO, do infiltrado inflamatório e da produção de colágeno. Ao reduzir síntese de NO por KC e diminuir a taxa de apoptose dos hepatócitos, a NAC limite a ativação de HSC (CZAJA, 2014b). Além de reduzir a contratilidade e capacidade de migração dos fibroblastos, bem como sua responsividade ao TGF- β e diferenciação em miofibroblastos (Shi-Wen et al. 2012; Sugiura et al. 2009). Dessa forma, a associação da NAC ao Asc foi capaz de controlar a fibrogênese e o processo inflamatório.

CONCLUSÃO

A estratégia de tratamento para HAE foi melhorada quando a NAC foi associada ao Asc no esquema terapêutico. O controle da fibrose e do infiltrado inflamatório no tecido hepático pode ser depende níveis diminuídos de NO e de IL-13.

CONFLITO DE INTERESSE

Roeckson Carlos P. Silva foi bolsista de mestrado Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

- Aires A.L., Albuquerque M.C.A., Silva RA, Schirato G. V., Pontes-Filho N.T., Araújo S.B., Souza V.M., Costa V.M., & Malagueño E. (2012) Immunohistopathological changes in murine *Schistosomiasis mansoni* under the influence of N-acetyl-L-cysteine. *Parasitol Res* 111(4) 1569–1578
- Alturfan E. I., Beceren A., Şehirli A.O., Demiralp Z.E., Şener G., & Omurtag G.Z. (2012) Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Vet Anim Sci* 36(4), 438-445
- Akdis, M., Palomares, O., Van de Veen, W., Van Splunter, M. \$ Akdis C.A. (2012). Th17 and Th22 cells: A confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol* 129, 1438-1449.
- Antunes M.F.P., Titz T.O., Batista I.F.C., Marques-Porto R., Oliveira C.F., Araujo C.A.A., & Macedo-Soares M.F. (2014). Immunosuppressive PAS-1 is an excretory/secretory protein released by larval and adult worms of the ascarid nematode *Ascaris suum*. *J helminthol* 2, 1–8.
- Araújo C.A., Perini A., Martins M.A., Macedo M.S., & Macedo-Soares M.F. (2008) PAS-1, a protein from *Ascaris suum*, modulates allergic inflammation via IL-10 and IFN-gamma, but not IL-12. *Cytokine* 44(3), 335–341
- Araujo C.A.A., Perini A., Martins M.A., Macedo M.S. & Macedo-Soares M.F. (2010). PAS-1, an *Ascaris suum* protein, modulates allergic airway inflammation via CD8+ $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+CD25+FoxP3+ T cells. *Scand J Immunol* 72(6), 491-503.
- Benzel F., Erdur H., Kohler S., Frentsch M., Thiel A., Harms L., Wandinger K.P., & Rosche B. (2012) Immune monitoring of *Trichuris suis* egg therapy in multiple sclerosis patients. *J Helminthol* 86(3) 339-347
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L. & Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.

Carambia A., & Herkel J. (2010) CD4 T cells in hepatic immune tolerance. *J Autoimmun* 34(1):23–28

Carranza F., Falcón C.R., Nuñez N., Knubel C., Correa S.G., Bianco I., Maccioni M., Fretes R., Triquell M.F., Motrán C.C., & Cervi L. (2012). Helminth antigens enable CpG-activated dendritic cells to inhibit the symptoms of collagen-induced arthritis through Foxp3⁺ regulatory T cells. *PloS one* 7(7), e40356.

Cho E-S., Park B-K., & Son H-Y (2011) Effects of *Ascaris suum* extract and sulfamethoxazole on allergic airway inflammation. *Biomolecules and Therapeutics* 19 (4), 466-471.

Cohen-Naftaly M., & Friedman S.L. (2011). Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. *Ther adv in gastroenterol* 4(6), 391–417.

Czaja A.J. (2014). Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 20(10), 2515-2532.

Czaja A.J., (2009) Rapidity of treatment response and outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *J hepatol* 51(1), 161–167.

Faquim-Mauro E.L., & Macedo M.S. (1998) The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clin Exp Immunol* 114, 245–251.

Girgis N.M., Gundra U.M. & Loke P. (2013). Immune regulation during helminth infections. *PLoS pathogens* 9(4), e1003250.

Griess P. (1879) Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedil "Ueber einige azoverbindungen." *Chem Ber* 12,426-428.

Hagiwara S.; Ishii Y.; & Kitamura S. (2000) Aerosolized of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *AmJ Respir Crit Care Med* 162, 225–31.

Junqueira L.C.U.; Bignolos G.; Brentani R.R. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. *Histochemical Journal*. Londres, v. 11: p. 447-55.

Majano P.L., Medina J., Zubía I., Sunyer L., Lara-Pezzi E., Maldonado-Rodríguez A., López-Cabrera M., & Moreno-Otero R. (2004) N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes. *J hepatol* 40(4) 632-637.

Makol A., Watt K.D., & Chowdhary, V.R. (2011) Autoimmune hepatitis: a review of current diagnosis and treatment. *Hepat. Res. Treat.* 2011, 1-11.

Manns M.P, Czaja A.J., Gorham J.D., Krawitt E.L., Mieli-Vergani G., Vergani D., & Vierling J.M. (2010) Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 51(6) 2193-2213.

Nascimento W.C., Silva R.P., Fernandes E.S., Silva M.C., Holanda G.C., Santos P.A., Albuquerque M.P., Costa V.A., Pontes-Filho N.T., & Souza V.O. (2014) Immunomodulation

of liver injury by *Ascaris suum* extract in an experimental model of autoimmune hepatitis. *Parasitol Res* 113(9), 3309-3317.

Oliveira, C.P.M.S., Stefano J.T., Siqueira E.R.F., Silva L.S., Mazo D.F.C., Lima V.M.R., Furuya C.K., Mello E.S., Souza F.G., Rabello F., Santos T.E., Nogueira M;A., Caldwell S.H.,

Alves V.A.F., & Carrilho F.J. (2008). Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol res* 38(2), 159–165.

Oshiro, T.M., Macedo, M.S. & Macedo-Soares, M.F., 2005. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm res* 54(2005), 17–21.

Pesce J. T. Ramalingam T.R., Mentink-Kane M.M., Wilson M.S., El Kasmi K.C., Smith A.M., Thompson R.W., Cheever A.W., Murray P.J., & Wynn T.A. (2009) Arginase-1–Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine–Driven Inflammation and Fibrosis. *PLoS Pathog* 5(4), 1-15.

Rocha F.A., Leite A.K., Pompeu M.M., Cunha T.M., VerriWA Jr., Soares F.M., Castro R.R., & Cunha F.Q. (2008) Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models. *Infect Immun* 76(6) 2736-2745

Schon H-T., & Weiskirchen R. Immunomodulatory effects of transforming growth factor- β in the liver. *Hepatobiliary Surg Nutr* 3(6), 386-406

Slavons C., Burtea C., Boutry S., Laurent S., Elst L.V., & Muller R.N., 2013. Phage Display Screening for Tumor Necrosis Factor- α -Binding Peptides: Detection of Inflammation in a Mouse Model of Hepatitis. *Hindawi* 2013, 1-9.

Shi-wen X., Thompson K., Khan K., Liu S., Murphy-Marshman H., Baron M., Denton C.P., Leask A., & Abraham D.J. (2012) Focal adhesion kinase and reactive oxygen species contribute to the persistent fibrotic phenotype of lesional scleroderma fibroblasts. *Rheumatology* 51 (12), 2146-2154.

Silva S.R., Jacysyn J.F., Macedo M.S. & Faquim-Mauro E.L. (2006) Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. *Eur J immunol* 36(12) 3227-3237.

Souza V.M., Faquim-Mauro E.L., & Macedo M.S. (2002) Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. *Braz J Med Biol Res* 35(1), 81–89.

Sugawara Y., Azuma N., Onodera S., Tsunoka Y., & Morimoto M. (2011) Th2 immune responses and alternatively activated macrophages (AAMacs) in helminth infection in aged mice. *J Vet Med Sci* 73(4) 511–516.

Sugiura H., Ichikawa T., Liu X., Kobayashi T., Wang X.Q., Kawasaki S., Togo S., Kamio K., Mao L., Ann Y., Ichinose M., & Rennard S.I. (2009) N-acetyl-L-cysteine inhibits TGF- β 1-induced profibrotic responses in fibroblasts. *Pulm Pharmacol Ther* 22(6), 487-491.

- Teufel A., Weinmann A., Centner C., Piendl A., Lohse A.W., Galle P.R., & Kanzler S. (2009) Hepatocellular carcinoma in patients with autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 15(5), 578-582.
- Tiegs, G., Hentschel J., & Wendel A. (1992) A T Cell-dependent Experimental Liver Injury in Mice Inducible by Concanavalin A. *J Clin Invest* 90(1), 196-203.
- Verhasselt V., Vanden B.W., Vanderheyde N., Willems F., Haegeman G., & Goldman M. (1999) N-Acetyl-L-Cysteine Inhibits Primary Human T Cell Responses at the Dendritic Cell Level: Association with NF-kB Inhibition. *J Immunol* 162(5), 2569–2574
- Wilson M.S., Taylor M.D., Balic A., Finney C.A.M., Lamb J.R., & Maizels R.M., (2005). Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J exp med*, 202(9), 1199–1212.
- Yang X., Yang Y., Wang Y., Zhan B, Gu Y., Cheng Y., & Zhu X. (2014) Excretory/Secretory Products from Adult Worms *Thichinella spirales* Ameliorate DSS-Induced Colitis in Mice. *PLoS ONE* 9(5) e96454.
- Yang S.H., Park M.J., Yoon I.H., Kim S.Y., Hong S.H., Shin J.Y., Nam H.Y., Kim Y.H., Kim B., & Park C.G. (2009) Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 41(5) 315-324.
- Yeoman A.D., Al-Chalabi T., Karani J.B., Quaglia A., Devlin J., Mieli-Vergani G., Bomford A., O’Grady J.G., Harrison P.M., & Heneghan M. (2008) Evaluation of risk factors in the development of hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis: Implications for follow-up and screening. *Hepatology* 48(3), 863-870.
- Zafarullah M., Li W.Q., Sylvester J., & Ahmad M. (2003) Cellular and Molecular Life Sciences Molecular mechanisms of N -acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60, 6-20.
- Zheng Z., Y., WENG S. Y., & YU Y. (2009) Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. *World J Gastroenterol* 15(46), 5776-5783.
- Wang H.X., Liu M., Weng S.Y., Li J.J., Xie C., He H.L., Guan W., Yuan Y.S., & Gao J. (2012) Immune mechanisms of concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 18(2), 119-125.

ANEXOS

Anexo A: Guia dos Autores

[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1365-2613/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1365-2613/homepage/ForAuthors.html)

***International Journal of Experimental Pathology* is published as an online-only journal from 2014**

Ethics

The *International Journal of Experimental Pathology* (IJEP) encourages its contributors and reviewers to adopt the standards of the [International Committee of Medical Journal Editors](#) (ICMJE). More information on various issues relating to Publication Ethics are dealt with in the relevant sections below and are outlined in full in the separate document [Ethical Policies of the International Journal of Experimental Pathology](#). Submitted work must comply with these policies, which are based on the [Best Practice Guidelines on Publication Ethics: a Publisher's Perspective](#) (Graf C, Wager, E, Bowman A et al. Int J Clin Pract 2007;61[s152]:1-26) and the Committee on Publication Ethics (COPE) guidelines on good publication and comply with their [Code of Conduct](#). IJEP is a member of the [Committee on Publication Ethics](#).elf Submission is considered on the conditions that papers are previously unpublished, and are not offered simultaneously elsewhere; that all authors (defined below) have read and approved the content, and all authors have also declared all competing interests; and that the work complies with [Ethical Policies of the Journal](#), and has been conducted under internationally accepted ethical standards after relevant ethical review.

Animal and Human Studies

Manuscripts describing studies involving animals should comply with local/national guidelines governing the use of experimental animals and must contain a statement indicating that the procedures have been approved by the appropriate regulatory body. Manuscripts concerned with human studies must contain statements indicating that informed, written consent has been obtained, that studies have been performed according to the [Declaration of Helsinki](#), and that the procedures have been approved by a local ethics committee. If individuals might be identified from a publication (e.g. from images) authors must obtain explicit consent from the individual.

Disclosures

Authors are required to disclose financial interests (e.g. employment, significant share ownership, patent rights, consultancy, research funding, etc.) in any company or institution that might benefit from their publication. All authors must provide details of any other potential competing interests of a personal nature that readers or editors might consider relevant to their publication. Upon acceptance for publication, all authors should supply this information, to the Journal's Editorial Assistant, Biljana Nikolic at b.nikolic@ucl.ac.uk. All **sources of funding must be disclosed** in the Acknowledgments section of the paper. List

governmental, industrial, charitable, philanthropic and/or personal sources of funding used for the studies described in the manuscript and attribute the funding to appropriate authors.

Examples:

- This work was supported by a grant from the National Institutes of Health, USA (DKxxxxx to AB).
- This work was supported by the Crohn's and Colitis Foundation of Canada (grant to AB and CD).
- This work was supported by a grant from Big Pharma Inc. (to AB) and equipment was donated by Small Pharma Inc. EF received a graduate studentship award from the University of xxxxx.

Authorship

All authors must fulfil the following three criteria:

- Substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data,
- Drafting the paper or revising it critically, and
- Approval of the submitted and final versions

Submission

All submitted articles are subject to review by experienced referees. The Editors then select and accept manuscripts suitable for publication - the Editors' decisions are final. Manuscripts accepted for publication are copyedited and typeset. The proofs are finally sent to contributors for a final check, but extensive changes to the proofs may be charged to the contributors.

Online submission

Manuscripts should be submitted online at <http://mc.manuscriptcentral.com/ijep>

To submit you will require a user ID and password, which can be obtained on first use of the submission web site. Full instructions are provided when you enter the website. All file types are supported, but to help Editors and reviewers view the submission the following types are recommended:

Text: Microsoft Word or generic rich text format (RTF).

Figures: TIFF is preferred. JPEG, GIF, EPS, PNG Microsoft PowerPoint, Microsoft Excel are also acceptable.

**Update (25 May 2012): Please note that we now accept .doc and .docx files.*

It is strongly recommended that, where possible, you combine all parts of your submission into a single document. Alternatively you may submit the text of the manuscript (including front page, summary, body of text, references and legends to tables and figures) as one document, with tables and figures as a separate file.

Full help and support for on-line submissions are provided by e-mail (support@scholarone.com), or via the website (<http://blackwellsupport.custhelp.com>) or telephone (+ 1 434-817-2040 ext. 167).

Hardcopy submission

If online submission is not possible, authors should send original papers to the editor at the address below.

The Editor, Professor D.R. Katz
 International Journal of Experimental Pathology
 Division of Infection and Immunity
 University College London
 Cruciform Building
 Gower Street
 London WC1E 6BT, UK
 Email: b.nikolic@ucl.ac.uk
 Tel: 020 3108 2122 Fax: 020 3108 2123

Conditions of acceptance

Papers are accepted on the understanding that no substantial part has been, or will be, published elsewhere. All submitted articles will be scrutinised for possible overlap and duplication with already published work. Papers may be subject to editorial revision without notice and remain the copyright of the journal. If a paper that has been returned to authors for revision is not received back in the editorial office after 90 days, it will be treated as a new submission. The Editors reserve the right to make the final decision whether or not a paper is accepted.

The author who submits a paper for publication is responsible that all other authors agree to its submission. All manuscripts must be accompanied by a covering letter signed by all authors. Persons named in the acknowledgements, and those responsible for any personal communications, must have agreed formally to their names so appearing.

Copyright

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

- Creative Commons Attribution License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA
- Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>. See the Online Open section below for more information.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Online Open

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive.

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Manuscripts

Manuscripts must be saved for submission in double spaced format. If submitted as hardcopy they should be printed on one side of the paper only.

The date of submission used will be the date of submission of the electronic text version, or on receipt of the hard copy text plus illustrations, as applicable. Authors are advised to keep a copy of all manuscripts, as no responsibility can be accepted for loss.

The text should follow the following format:

Front page:

A single 'front page' must give: (1) the title of the manuscript; (2) a short running title (not exceeding 40 characters); (3) the name(s) of the author(s) including forename and surname; (4) the department(s) in which the work was done; and (5) the name, full postal address, fax number and e-mail address of the author to whom the proofs and requests for offprints should be sent, to be headed 'Correspondence'. The Corresponding Author should take responsibility for communicating with all other authors and getting their approval for the final version to be

published. During online submission corresponding authors can nominate an individual, who may or may not be an author, to assist them with administration of the publication process.

You should confirm that all listed authors meet [ICMJE](#) authorship criteria and that nobody who qualifies for authorship has been excluded. Credit for authorship should be based on: [1] substantial contributions to research design, or the acquisition, analysis or interpretation of data; [2] drafting the paper or revising it critically; [3] approval of the submitted and final versions. Authors should meet all three criteria.

Second page:

The second page should contain a summary paragraph which should give a factual account of the context in which the study has been performed, the objective(s), methods and results, and a brief conclusion, in not more than 250 words. For refereeing and indexing purposes, up to six 'keywords' related to subjects discussed in the paper should be identified and included at the foot of the summary.

Text

Reports of original work should usually be arranged in the conventional order of introduction, methods, results, discussion, acknowledgements and references, with suitable headings for each part. Further sub-divisions, with appropriately less significant headings, can be used. Results may be presented in the text, in tables and figures, but the text should, in general, comment on rather than repeat information in tables.

General

Papers must be written in clear, concise English. Spelling should follow The Concise Oxford Dictionary of Current English. Avoid jargon and neologisms. The journal is unable to undertake major corrections of language, which is the responsibility of the author. Where English is not the first language of the authors, the paper should be checked by a native English speaker. Authors may suggest the names of suitable referees in a covering letter, or via the website, if they so wish.

Reviews

Reviews will normally be commissioned. Authors wishing to submit unsolicited reviews are advised to consult the editor in advance, as they will not be considered unless this has been done. Once the editor has agreed to consider a review, the guidelines for submitting on line are the same as for original article.

Letters to the Editor

Correspondence which relates to papers which have recently appeared in the Journal may be published. The Editor reserves the right to invite a response from the original authors for publication alongside. Letters should be as short as possible (but no more than 1000 words of text, two figures or tables or one of each, and up to 10 references). Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

Tables and Figures

For online submission, illustrations should be embedded in the Word document or uploaded as separate files. Quality should be sufficient for viewing on-screen and desktop printing.

Where possible, please provide high quality digital artwork files.

Both tables and figures should be numbered consecutively with Arabic numerals. Each should have a separate descriptive legend. Keys should be given in the legends, not in the figure itself. All illustrations, both drawings and photographs, must be of good quality since delay will result if referees need to see improved versions. Digital versions of figures should be supplied in TIFF format. As a guide, the ideal figure resolution/specification for various types of original figures, at their final size, is as follows:

Line art and diagrams - Minimum 600 dpi

Halftone (both B/W and Colour photographs) - Minimum 300 dpi

Line and tone (line art and halftone combined) - Minimum 600 dpi

It is best to use Illustrator or Photoshop software and to save the material in the format '.eps' or '.tif'. If you are unable to provide these formats, please save the figures in as many different file formats as possible. In addition to any electronic files, always send three high-quality printed versions of the figures to the editorial office. For further information on file formats, please see the instructions on our website at <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp>

Colour Illustrations

As the journal is published online-only, colour figures are published online for free.

Measurements

Measurements should be expressed in SI units. If the original observations were recorded in other units, this should be stated, together with the appropriate conversion factors.

Standard Abbreviations

Standard abbreviations should be used and should follow those laid down in Units, Symbols and Abbreviations (1994) published by the Royal Society of Medicine. Abbreviations should be used sparingly and only if a lengthy name or expression is repeated frequently throughout the manuscript. Words must appear in full on first appearance in both summary and text, followed by the abbreviation in parentheses. Drugs should be described by their official names but trade names should be indicated in parentheses the first time the drug is quoted in the text.

References

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: <http://www.refman.com/support/rmstyles.asp>.

References must be double spaced and should be made only to papers closely related to the author's work. Exhaustive lists should be avoided. In the text, use the name of the author(s) followed by the date of publication; where there are two authors use the form: Sorensen and Read 2002; where there are more than two authors use the form: Turton et al. 2002.

Arrange the list of authors quoted at the end of the text in alphabetical order set out as follows:

A) Name(s) and initials of author(s), year of publication (in parentheses), title of the article, name of the journal, volume number, first and last page numbers. Abbreviate journal names according to the Index Medicus system. (Also see International Committee of Medical Journal Editors: Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *N Engl J Med* 1997;336: 309-315.)

B) In the case of books the order is: name(s) and initials of author(s), year of publication (in parentheses), chapter title, full book title, edition, names of the editors, place and name of publisher, and page numbers.

C) References to 'personal communications' and 'unpublished work' may be quoted in the text with all names and initials to avoid confusion but should not be included in the references.

Examples of the style to be used are given below:

Turton J.A., Andrews C.M., Havard A.C. & Williams T.C. (2002) Studies on the haemotoxicity of chloramphenicol succinate in the Dunkin Hartley guinea pig. *Int. J. Exp. Path.* 83, 225-238.

Katz D.R., & Pollara G. (2003) Surviving the immune response: an immunologist's perspective. In *Dormancy and Low Growth States in Microbial Diseases*. Ed A. Coates. Cambridge University Press pp 75-100.

Permissions

Materials copied from other sources must be accompanied by a written statement from both author and publisher giving permission to the *International Journal of Experimental Pathology* for reproduction. Authors are responsible for obtaining permission in writing from at least one author of papers cited while still in press, as well as of unpublished data and of personal communications. It is the author's responsibility to ensure that permissions are obtained.

Author Material Archive Policy

Unless specifically requested, Wiley-Blackwell will dispose of all hard copy or electronic material submitted 2 months after publication. If you require the return of any material submitted, please inform the Production Editor as soon as possible if you have not yet done so.

Page Proofs

Proofs will be sent electronically via e-mail as an Acrobat PDF file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following Web site: www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html

This will enable the file to be opened, read and corrected on screen. Further instructions will be sent at the same time as the proof. Proofs will be posted if no e-mail address is available. In your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs.

Early View

The *International Journal of Experimental Pathology* is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

Citing online articles The Journal encourages citation of online articles before they are published in final form when they become available in PubMed or from journal/publisher websites, e.g. Early View articles from the *International Journal of Andrology* website. The citation must take the following form:

Author(s), Title, Journal, Year; in press (DOI).

Any article that lacks a year of publication or a DOI will not be considered a valid reference citation and cannot be cited.

Online production tracking is now available for your article through Wiley-Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so they don't need to contact the production editor to check on progress. Visit authorservices.wiley.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Note to NIH Grantees Pursuant to NIH mandate, Wiley-Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 6 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

Anexo B: Artigo em Inglês

Magazine: International Journal of Experimental Pathology

Fator impacto: 2,052

Qualis: B1

Online ISSN: 1365-2613

Immunoregulatory effects of extract of *Ascaris suum* and its association with N-acetyl-L-cysteine in the treatment of the experimental autoimmune hepatitis

Roeckson Carlos P. Silva*, Raul P. C. Silva*, Wheverton Ricardo C. Nascimento*, Erica F. Souza*; André L. Aires*, Nicodemos T. Pontes Filho†, Mônica C. P. A. Albuquerque*, Vláudia Maria A. Costa*, Valdênia Maria O. Souza*

*Laboratory of Immunopathology Keizo Asami, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil e †Department of Pathology, Federal University of Pernambuco, Pernambuco, Brazil

Authors' contributions: Roeckson Carlos P. Silva performed the experiments and wrote the article; Raul P. C. Silva, Wheverton Ricardo C. Nascimento e Erica F. Souza collected the data and performed the technical procedures; André L. Aires e Nicodemos T. Pontes Filho performed the histopathological analysis and critical review of the article; Mônica C. P. A. Albuquerque, Vláudia Maria A. Costa e Valdênia Maria O. Souza planned the study, statistical analysis and critically reviewed the article.

Contact address: Valdênia Maria Oliveira de Souza. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA. Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, CEP: 50670-901. Recife-PE, Brasil.

E-mail: valdenia.souza@gmail.com

Phone: + 55 81 2126 8484 Fax: + 55 81 2126 8485

ABSTRACT

Background and objectives: The adult worm extract of *Ascaris suum* (Asc) has potent anti-inflammatory and immunosuppressive effect, however during experimental autoimmune hepatitis was capable of inducing collagen production. The N-acetyl-L-cysteine (NAC), which has antioxidants and antifibrotic properties, may enhance the action of Asc in models of inflammatory disorders, reducing collagen synthesis. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of Asc and its association with the NAC as a treatment strategy for autoimmune hepatitis, which exhibit the cirrhosis as main complication arising from failure to conventional therapy.

Methodology: Experimental autoimmune hepatitis was induced by intravenous administration of concanavalin A lectin in Balb/c animals (EAH). After induction, one group was treated with Asc(HAE+Asc) and another group with Asc and NAC (HAE+Asc+NAC). As a control, one group was treated with saline (HAE). Were quantified and compared between groups liver weight, aminotransferase levels and total immunoglobulins and anatomopathological analysis, nitric oxide (NO) production and cytokine interleukin(IL)-5, IL10, IL-13 and the transforming growth factor beta (TGF- β).

Results: In the treated groups, the ASC caused the reduction in levels of transaminases, total immunoglobulins and inflammatory infiltration, as well as increases TGF- β production compared with the group EAH. When the NAC was associated with the treatment regimen, collagen production was controlled and accompanied by reduced levels of NO and IL-13. In EAH+Asc+NAC group was also observed reductions in liver weight and high levels of IL-5 and IL-10.

Conclusion: The treatment strategy for HAE were improved when NAC was associated with Asc the therapeutic regimen.

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

INTRODUCTION

Autoimmune hepatitis (AIH) is a chronic inflammatory disease of unknown etiology, characterized by the presence of circulating autoantibodies, hypergammaglobulinemia and necro-inflammatory changes (Makol et al. 2011). His treatment is accomplished by immunosuppressive therapy, aimed at controlling cell hyperresponsiveness dependent on T and B cells, improving clinical symptoms and increasing survival of patients (Manns et al. 2010). However, secondary complications such as cirrhosis, which is a risk factor for the development of hepatocellular carcinoma, usually occur in 40% of treated patients (Teufel et al. 2009; Yeoman et al. 2008). Thereby, the development of new therapeutic approaches that supplement the conventional treatment becomes indispensable.

Helminth infection or immunization with their products has been evaluated in different models of experimental autoimmune diseases and inflammatory disorders, assisting in the development of therapies for human diseases (Sofronic-Milosavljevic et al. 2013; Carranza et al. 2012; Pesce et al. 2009). Regarding the statement of adult worms of *Ascaris suum* (Asc), their potential anti-inflammatory and immunosuppressive effect has been demonstrated in models of allergic asthma, rheumatoid arthritis and experimental autoimmune hepatitis (EAH) and it was associated with their ability to induce high levels of interleukin(IL)-10 and transforming growth factor(TGF)- β (Nascimento et al. 2014; Cho et al. 2011; Rocha et al. 2008).

The induction of autoimmune hepatitis model is based on the intravenous administration of the lectin concanavalin A (ConA) and causes a massive increase in CD4⁺ T cells in the liver parenchyma, leading to secretion of proinflammatory cytokines (IL-1, IL-2, IL-6, granulocytic colony-stimulating factor (G-CSF), tumor necrosis factor (TNF)- α and interferon(IFN)- γ) (Sclavons et al. 2013; Tiegs et al. 1992; Wang et al. 2012). Kupffer cells (KC) and hepatic stellate cells (HSC) also involved in its pathogenesis by promoting inflammation (reactive oxygen species (ROS) and NO) and fibrogenic responses (Czaja 2014; Cohen-Naftaly and Friedman 2011). The prophylactic and therapeutic treatment of HAE with Asc attenuated liver damage, reducing the inflammatory infiltration and induction of an immunosuppressive T helper profile (Th)2 (IL-4, IL-10 and IL-13). However, it was observed in the therapeutic treatment increased fibrosis (Nascimento et al. 2014). Knowing that the prophylactic treatment of AIH becomes unviable, because it is a complex and unpredictable disease etiology, the improvement of the therapeutic treatment is more feasible from a clinical standpoint.

The N-acetyl-L-cysteine (NAC) has potent antioxidant effect and its ability immunomodulatory and antifibrotic action has been evidenced in different animal models. (Hagiwara et al. 2000; Aires et al. 2012; Alturfan et al. 2012). In experimental poisoning acrylamide, the NAC restored the levels of serum transaminases and reversed liver fibrosis, regulating the production of inflammatory mediators (TNF- α , IL-1 and IL-6) and oxidant/antioxidant balance (Alturfan et al. 2012). During experimental schistosomiasis, the NAC attenuated the liver injury with decreased levels of NO and IFN- γ , elevated levels of IL-10 and reducing the size of granulomas and the degree of fibrosis (Aires et al. 2012). In the non-alcoholic steatohepatitis, his association between the NAC and metformin reduced liver fibrosis and inflammatory infiltrate (Oliveira et al., 2008). Thus, it is possible that the NAC may contain liver fibrosis and improve the therapeutic treatment of HAE with Asc.

Therefore, in this study the Asc and the NAC were therapeutically evaluated in a murine model of HAE induced by ConA. In the treated groups, the Asc caused a reduction in levels of transaminases, total immunoglobulin and inflammatory infiltrate, as well as increased production of TGF- β . When NAC was associated with the treatment regimen, the production of collagen was controlled and monitored by reduced levels of NO and IL-13. In the EAH+Asc+NAC group was also observed reductions in liver weight and increased levels of IL-5 and IL-10.

MATERIALS AND METHODS

Soluble extract of *Ascaris suum*, Concanavalin A and N-acetyl-L-cysteine

The extract of adult *A. suum* worms was obtained using the protocol of Souza et al. (2002). Briefly, live adult *A. suum* worms were washed in saline and homogenized in boratebuffered saline (BBS) at pH 8,0 in an Ultra-Turrax apparatus (Janke and Kunkel, Staufen, Germany). The homogenate was centrifuged at 10.000 g for 1 h. Then, the precipitate was resuspended in 400 ml and stirred in BBS overnight at 4 °C. This suspension was centrifuged, the supernatant was dialyzed against distilled water overnight at 4 °C, and the supernatant was centrifuged at 10.000 g for 2 h and lyophilized (Souza et al. 2002). For administration in animals, aliquots were diluted in sterile 0,01M sodium phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7,2.

The concanavalin A type IV (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) and the N-acetyl-L-cysteine (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) were diluted in sterile 0,01M PBS, pH 7,2.

Animals, formation of study groups, therapeutic regimen and ethical considerations

Eight-week-old male BALB/c mice were housed in the animal care facility at the Laboratory of Immunopathology Keizo. The animals were kept in cages (5-6 animals), under standard temperature conditions ($22^{\circ}\text{C} \pm 1$) and luminosity (12 hour cycles of light and 12 hours of dark) and with food and water *ad libitum*.

To implement the survey, three groups (6 animals / group) were formed and the EAH was induced in all animals by the intravenous administration of the Con A, at a dose of 10 mg/kg. Thirty minutes after induction, one group was treated with NAC, dose 200 mg/kg, of 12/12h, during 6 days, orally; and Asc, two hours after induction, in a single dose of 1mg/animal by via intraperitoneal (EAH+Asc+NAC group). While another group was treated with saline orally and Asc by via intraperitoneal (EAH+Asc group). As treatment control, animals received only saline sterile (EAH group). The experimental model was developed from studies of Nascimento et al. 2014 and Aires et al. 2013.

The protocol for these studies was approved by the Ethics Committee for the Research Center of Biological Sciences/ UFPE (n° 23076.041797/2013-40).

Evaluation of transaminases and total immunoglobulin

Blood samples were collected (8, 24 hours and 7 days) after induction of the EAH and the transaminases and immunoglobulins in the plasma were evaluated by spectrophotometry. The levels of the alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) transaminases were quantified by kinetic-UV methods (Labtest, Belo Horizonte, MG, BR). The total immunoglobulins were quantified by direct ELISA. The samples were distributed on the plates (100 μL /well) and anti-mouse goat-biotinylated antibody (Southern Biotechnology Associates, Inc., AL, USA) were used for detection of the immunoglobulins. The reaction was developed with a streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) and an O-phenylenediamine (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) solution in 0.1-M citrate buffer plus H_2O_2 . After addition of 0.2-M citric acid solution to stop the reaction, the plates were read at 450 nm in an automated ELISA reader.

Culture of splenocytes, dose cytokines and nitric oxide

The mice were anesthetized and euthanized 7 days after induction of the EAH and the spleens of animals of EAH, EAH+Asc and EAH+Asc+NAC groups were collected under aseptic conditions.

The splenocytes were cultured in RPMI 1640 plus antibiotics (penicillin and streptomycin 100 mg/L), HEPES 1 M and L-glutamine (200 mM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; WL. Immunochemistry, Rio de Janeiro/Brazil). The cells were cultured with RPMI, Asc (20 µg/ml), or ConA (5 ng/ml), for 24 ($2 \cdot 10^7$ cells/mL) and 72h ($12 \cdot 10^6$ cells/mL) at 37 °C and 5 % CO₂.

The cell culture supernatant was harvested, and the cytokine levels were measured using specific two-site sandwich ELISA with capture monoclonal antibodies anti-IL5 (BVD1D11) and anti-IL10 (2A5)] and biotinylated antibodies [anti-IL5 (BVD624G2) and anti-IL10 (SXC1)]. Binding of biotinylated antibodies was detected using a streptavidin-peroxidase conjugate (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) and an ABTS (2-2-azinobis (3-ethylbenzene-thiazoline-6-sulphonic acid) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo., USA) solution in 0.1-M citrate buffer plus H₂O₂. The plates were read at 405 nm in an automated ELISA reader. The samples were quantified by comparison with standard curves of the purified recombinant cytokines [rIL-5 (BD Pharmingen, Becton, Dickinson and Company, USA) and rIL-10 (BD Pharmingen, Becton, Dickinson and Company, USA)]. The levels of IL-13 (R&D, Minneapolis, USA) and TGF-β (Invitrogen, Novex, USA) were obtained using commercial kit

The levels of nitric oxide (NO) was determined in the culture supernatant by the Griess colorimetric reaction (Griess 1879). The supernatant was added to 96 well plates (3595, Costar, Cambridge, MA, USA) followed by the same volume of developer solution, Griess reagent (1% sulfonilamide and 0,1% naphthylethylenediamine) plus 2,5% of phosphoric acid. For production, a standard curve of sodium nitrite (NaNO₂) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA) solution was used a 100 µM, with a detection limit of 1,56 µM. The plates were read at 540 nm in an automated ELISA reader.

Obtaining the liver to anatomopathological analysis

After euthanasia, the livers of the animals were collected, examined macroscopically, weighed, and fixed in 10 % buffered formalin for histological analysis. Then, a longitudinal section of the central part of the larger lobe was performed and the a longitudinal section of the central part of the larger lobe was performed. Histological sections (4 µm) were obtained on a horizontal microtome Yamato (Japan). Fragments for the histopathological and morphometric study were stained with hematoxylin-eosin (HE) and Masson trichrome (TM; selective for collagen), respectively (Junqueira; Bignolos; Brentani, 1979)

Histological analysis was performed using the inflammatory infiltrate in the hepatic parenchyma and through lymphocyte count/field using the ImageJ software (National Institutes

of Health, Bethesda, MD). Morphometric study also was obtained using ImageJ software, by measuring the concentration of collagen from the blue stain intensity. At least 20 random photographs were taken by field (original magnification $\times$ 100) for analysis (Nascimento et al., 2014).

Statistical analysis

For statistical analysis, we used GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For comparison between the different groups, it was used the Analysis of Variance (ANOVA) for the parametric data. When ANOVA revealed a significant difference, it was used the Tukey test to identify which groups differed. All findings were considered significant at $p < 0,05$. All procedures were repeated three times to evaluate the reproducibility of the results.

RESULTS

Therapeutic treatment with NAC and Asc improve the evaluated parameters in the EAH

After administration of ConA, the hepatocellular damage may be evidenced by elevated serum transaminase levels and total immunoglobulins and increased liver weight (Fig. 1). Groups of animals therapeutically treated with the Asc and NAC had lower levels of ALT and AST as compared to EAH group, however, a significant decrease was observed only on the 7th day (Fig. 1a, b). The production of total Ig was reduced in EAH+Asc group in 7 days, while in EAH+Asc+NAC group this production was statistically lower in 8-24 hours (Fig. 1c). In relation to the liver weight, only the EAH+Asc+NAC group showed a significant reduction when compared with the HAE and HAE+Asc groups (Fig. 1d).

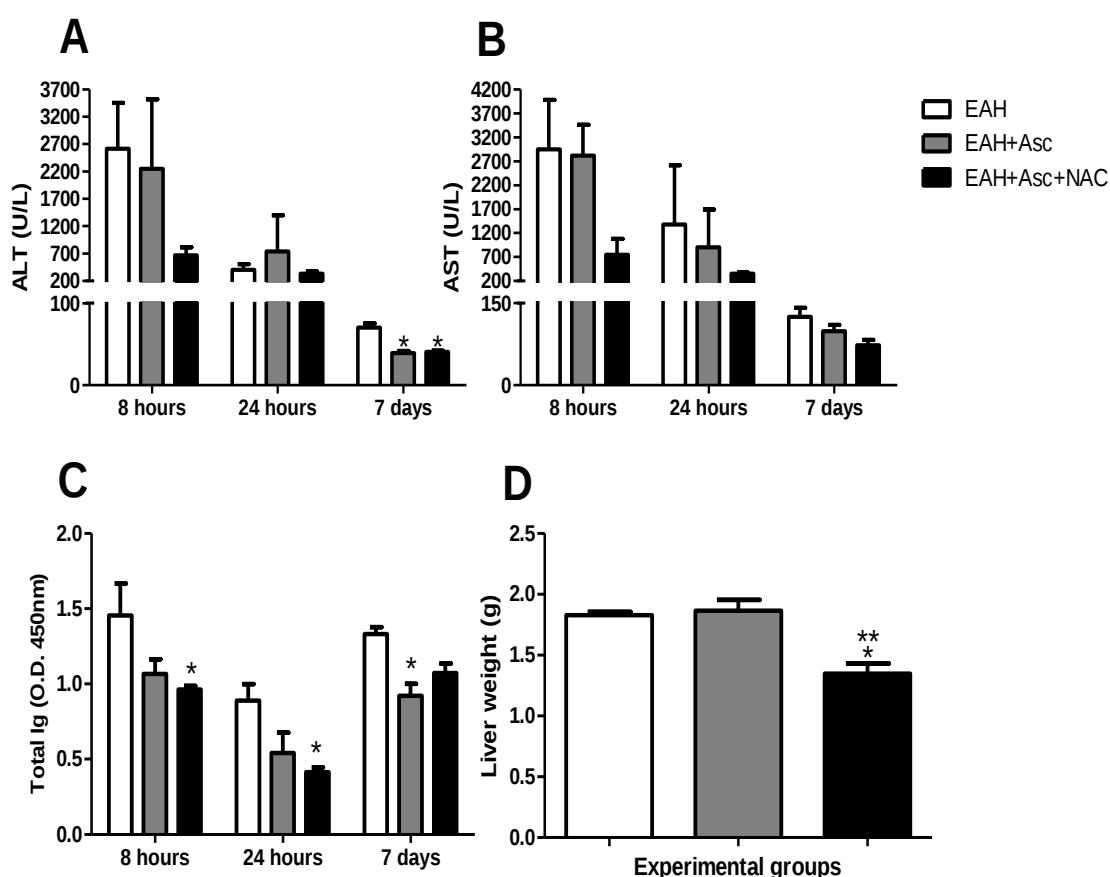


Figure 1. Transaminases levels, total immunoglobulins and liver weight after induction of EAH and therapeutic treatment with Asc and Asc+NAC. ALT (A) and AST (B) transaminases, total immunoglobulins (C) and liver weight (D). * $p < 0,05$ compared with the EAH group; ** $p < 0,05$ compared with the EAH+Asc group.

Cytokines and NO levels after the therapeutic treatment with NAC and Asc

Splenic cells of animals with EAH and the subjected to treatment were cultured with ASC or ConA and supernatants collected for measurement of cytokines and NO. The supernatant of cells cultured with medium alone was also evaluated culture (basal). In animals of EAH group are observed low baseline levels of IL-5, whereas in the treated animals was higher production, with a significant increase only in the EAH+Asc+NAC group. Under stimulation of ConA, the production of IL-5 was significantly lower in the EAH and EAH+Asc groups, but higher in EAH+Asc+NAC group. When stimulated by Asc, only the treated groups had increased their production, which was significant only in the EAH+Asc+NAC group (Fig. 2a).

The basal production of IL-10 was higher in the treated animals compared to EAH group. The stimulation with Con A caused an increase of its production in all groups, but only EAH+Asc+NAC group showed significance. Under the stimulus Asc, its production was

significant only in the EAH+Asc+NAC group (Fig. 2B). The basal production of IL-13 reached high levels in HAE group as opposed to the low levels seen in groups treated. The stimulation induced by ConA elevated IL-13 levels in the EAH+Asc+NAC group, however stimulation with Asc inhibit its synthesis (Fig. 2C).

In relation he production of TGF-b was increasing its basal production in the treated animals compared to EAH group, however there was no statistical difference. The in vitro stimulation with ConA induced TGF- β levels higher than those induced by Asc only in the EAH and EAH+Asc+NAC groups (Fig. 2D).

Increased production of NO was observed only *in vitro* stimulation of ConA and and only in the HAE group. In the groups treated only with Asc, the basal production of NO was higher than the EAH and EAH+Asc+NAC groups, which showed similar levels (Fig. 2E).

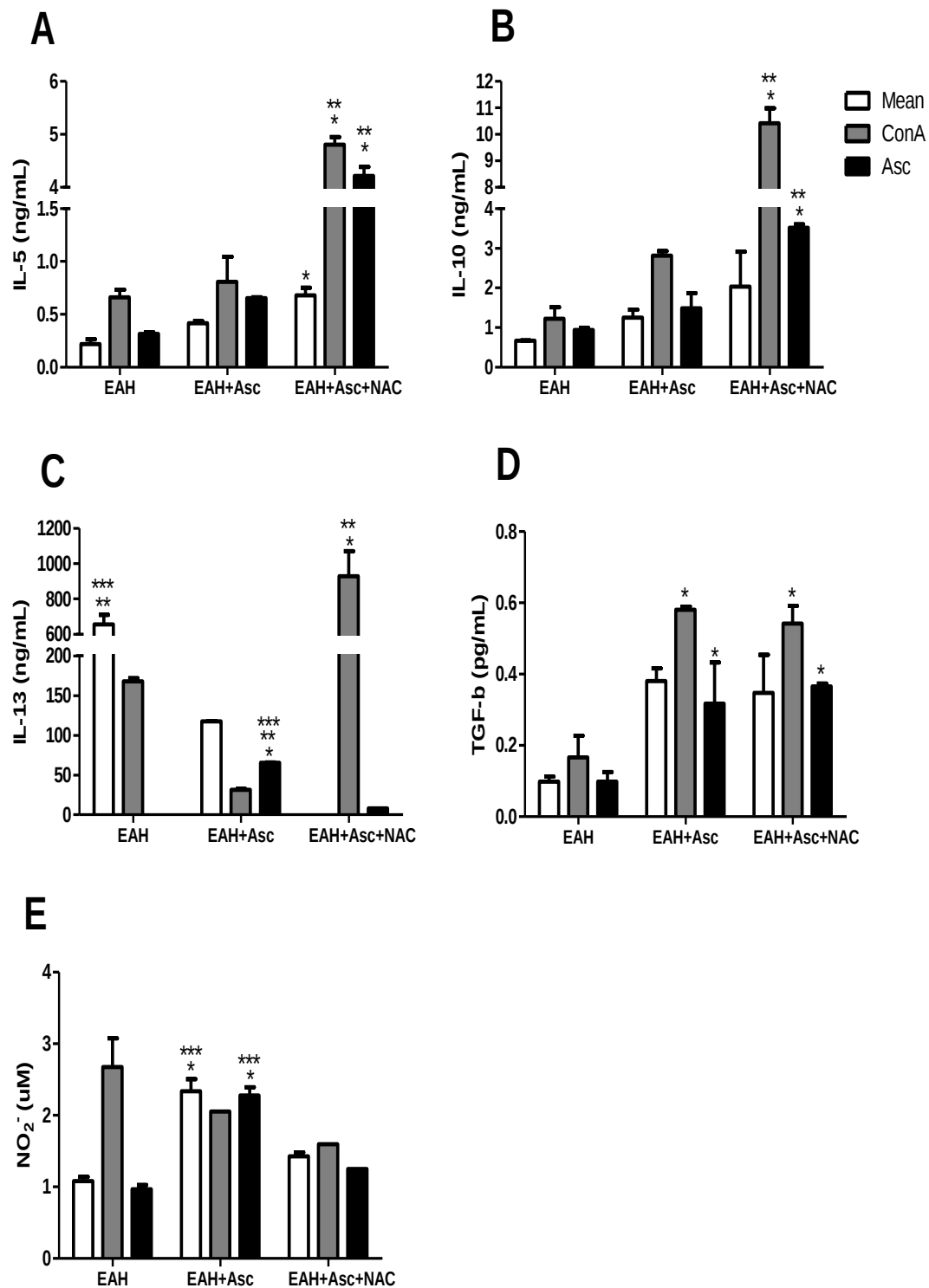


Figure 2. Levels of cytokines produced by spleen 7 days after induction of the EAH and and therapeutic treatment with Asc and Asc+NAC. The splenocytes were cultured *in vitro* without stimulus or stimulated with Asc (20μg/mL) and ConA (10μg/mL) in times of 24h (2.10⁷ células/mL) and 72h (12.10⁶ células/mL). The cytokines were measured in the supernatant in 24h (IL-10) and 72h (IL-5, IL-13 e TGF-β) for capture ELISA. The NO was mensured in the supernatant in 24h. Levels of IL-5 (A), IL-10 (B), IL-13 (C), TGF-β (D) and NO (E). *p < 0,05 compared with the EAH group; **p < 0,05 compared with the EAH+Asc group

Anatomopathological examination of the liver

In animals of the EAH group, in the macroscopic analysis of the liver, changes were observed in the liver parenchyma: white colored areas, slightly hardened palpation and without local adhesions, affecting larger proportions of the body, without defined borders and boundaries. However, in the treated animals are observed areas lesser extent, focus and well defined. The scar tissue can be observed in all groups (Fig. 3).

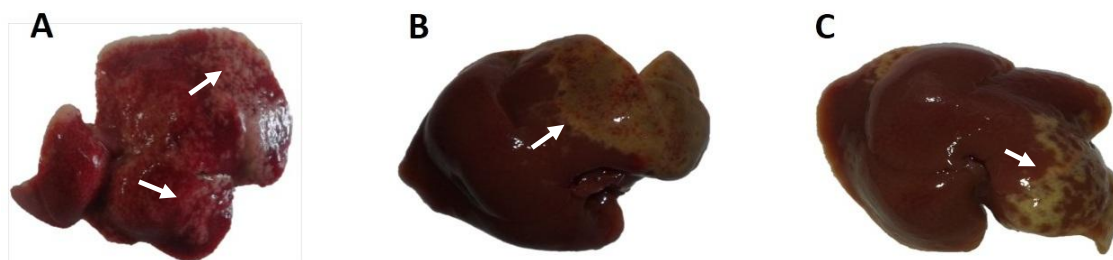


Figure 3. Macroscopic appearance of the mouse liver after 7 days after induction of HAE and therapeutic treatment with Asc and Asc+NAC. (A) EAH group; (B) EAH+Asc group and (C) Grupo EAH+Asc+NAC group. White arrows indicate areas of scar tissue.

The histomorphometric analysis of liver tissue showing the presence of collagen in leukocytes and EAH group, as well as in the EAH+Asc group. Although, in the EAH+Asc+NAC group there was significant reduction in the inflammatory infiltrate and induction less fibrosis as compared to the other groups (Table 1).

Table 1. Histomorphometric analysis of liver tissue

Grups	Histology	Morphometry
	Leukocytes/field ($\pm$ SD) [§]	Collagen/cm ² ($\pm$ SD) [¥]
EAH	962 (67,02)	126,51 (5,48)
EAH+Asc	767 (168,15)	127,36 (4,88)
EAH+Asc+NAC	587 (63,82)*	108 (10,37)* **

[§]Mean $\pm$ standard deviation of leukocytes counted by field from different groups using ImageJ software

[¥]Mean $\pm$ standard deviation ratio of collagen obtained from different groups using ImageJ software

*p < 0,05 compared with EAH group; **p < 0,05 compared with EAH+Asc group

DISCUSSION

In this study, we evaluated the therapeutic effects of Asc and its association with the NAC in an animal model that mimics the AIH in humans. The therapeutic administration of the Asc attenuated hepatocellular damage, causing a reduction in the levels of transaminases and total immunoglobulins by inducing an immune response Th2. When NAC was associated with the treatment regimen, this hepatoprotective effect was more evident, with early reduction of

serum markers and liver weight and support of a Th2 response, with elevated levels of IL-10, and a reduced production of NO and IL-13.

The administration of the Asc induces an increase in the IL-4, IL-10 and IL-13 in animal EAH (Nascimento et al. 2014). These cytokines production has increased during the helminths and are, together with IL-5, important in controlling infection. (Girgis et al. 2013). Here, we noted the increased production of IL-5 and TGF- β . These results together suggest a Th2/regulatory T(Treg) profile. This polarization of the immune response into a Th2 profile can have inhibitory functions under the proinflammatory profile observed in the EAH, where IL-10 and IL-4 are important cytokines by inhibiting the production and proliferation of Th1 cells. Helminth infections also induce the expansion of Treg lymphocytes, which may limit immune assault by the production of IL-10 and TGF- β . These cells are essential for the maintenance of self-tolerance and its deficiency is common in autoimmune diseases. (Wang et al. 2012; Carambia and Herkel 2010).

TGF- β cytokine maintains the homeostatic control of innate and cellular immune responses by inhibiting the function and activation of T cells, macrophages and dendritic cells. However, it is cytokine can have complex effects on differentiated functionally distinct subsets of T cells, mediating pro-inflammatory or anti-inflammatory responses (Schon and Weiskirchen, 2014). In the presence of TGF- β and IL-6 is induced a classic profile Th17 lymphocytes, producing IL-21, IL-9 and IL-10. However, in the absence of TGF- β and presence of IL-6 and IL-23, are generated more pathogenic Th17 cells, produtoras de IL-22, fator estimulador de colônias granulocíticas-monocíticas (GM-CSF) e IFN- γ (Akdis et al. 2012). Moreover, it has been shown that in the absence of IL-6, the TGF- β promotes the generation of Treg lymphocytes (Bettelli et al. 2006). Here, believe that the Th2 profile induced by the Asc can counteract IL-6 action and favor the TGF- β anti-inflammatory action, with possible generation of Treg cells.

The hepatoprotective potential of Asc may be related to its ability to suppress the humoral and cellular immune response, whose properties are mediated by high molecular weight components, which have a suppressive effect by inducing the production of TGF- β and IL-10 (Antunes et al. 2014; Araújo et al. 2008; Oshiro et al. 2005; Souza et al. 2002). Increased levels of these cytokines in EAH+Asc and EAH+Asc+NAC groups can be related to the control of the inflammatory response and limitation of hepatocellular damage, reflected in the reduction of transaminases, total immunoglobulins in the liver weight.

The cytokine profile observed in the EAH+Asc and EAH+Asc+NAC groups suggesting that the Asc induced differentiation of Treg lymphocytes, as observed in the allergic asthma,

where protein 1 from *A. suum* (PAS-1) inhibited their development by inducing a significant increase in regulatory T lymphocytes and IL-10/TGF- β secretion (Araújo et al. 2010). Its expansion and functional increased during helminth infections may be responsible for immune suppression in different models of inflammatory diseases (Yang et al. 2014; Carranza et al. 2012; Wilson et al. 2005).

The inflammatory response in HAE is characterized by a polarization of a Th1 profile (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-1) and involves participation of lymphocytes, sinusoidal endothelial cells, KC and HSC (Sclavons et al. 2013; Zheng et al. 2009; Wang et al. 2012). The Asc can change the expression of molecules of major histocompatibility complex(MHC) class II and costimulatory (cluster differentiation(CD)40, CD80 and CD86) in antigen presenting cells(APCs), affecting T-cell activation and reducing cell hyperresponsiveness pathway-dependent mechanisms IL-10 (Silva et al. 2006; Faquim-Mauro; Macedo, 1998). In conjunction with Asc, the NAC can reduce the gene expression of the nuclear transcription factor(NF)- κ B in T lymphocytes, limiting the production of pro-inflammatory cytokines, and modulating the expression of induced nitric oxide synthase(iNOS) in KC, limiting apoptosis in hepatocytes, by reducing the production of NO and ROS (Oliveira et al. 2008; Majano et al. 2004; Zafarullah et al. 2003). In addition to disrupt dendritic cell maturation, altering the expression of surface molecules (human leukocyte antigen(HLA)-DR, CD86 and CD40) and the primary responses of T lymphocytes (Verhasselt et al. 1999).

A liver microenvironment with high IL-13 levels promotes fibrosis as part of the tissue repair phase, by stimulating fibroblasts and alternatively activated macrophages (M2) to synthesize collagen (Sugawara et al. 2011; Benzel et al. 2012). Indeed, the Asc induced synthesis of IL-13 accompanied by increased fibrosis in the EAH group (Nascimento et al. 2014). Here, in the EAH+Asc+NAC group the production of IL-13 was less than EAH group and associated with reduced levels of NO, the inflammatory infiltrate and the collagen production. By reducing NO synthesis by KC and decreasing the rate of apoptosis of hepatocytes, the NAC limit HSC activation (CZAJA, 2014b). In addition to reducing contractility and migration ability of fibroblasts, as well as their responsiveness to TGF- β and differentiation into myofibroblasts (Shi-Wen et al. 2012; Sugiura et al. 2009). Thus, the association of NAC to Asc has been able to control the inflammatory process and fibrogenesis.

CONCLUSION

The treatment strategy for HAE was improved when NAC was associated with Asc in the therapeutic regimen. The control of fibrosis and inflammatory infiltrate in liver tissue may be dependent of reduced levels of NO and IL-13.

CONFLICT OF INTEREST

Roeckson Carlos P. Silva was in receipt of a Masters fellowship from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERENCES

- Aires A.L., Albuquerque M.C.A., Silva RA, Schirato G. V., Pontes-Filho N.T., Araújo S.B., Souza V.M., Costa V.M., & Malagueño E. (2012) Immunohistopathological changes in murine *Schistosomiasis mansoni* under the influence of N-acetyl-L-cysteine. *Parasitol Res* 111(4) 1569–1578
- Alturfan E. I., Beceren A., Şehirli A.O., Demiralp Z.E., Şener G., & Omurtag G.Z. (2012) Protective effect of N-acetyl-L-cysteine against acrylamide-induced oxidative stress in rats. *Vet Anim Sci* 36(4), 438-445
- Akdis, M., Palomares, O., Van de Veen, W., Van Splunter, M. \$ Akdis C.A. (2012). Th17 and Th22 cells: A confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection. *J Allergy Clin Immunol* 129, 1438-1449.
- Antunes M.F.P., Titz T.O., Batista I.F.C., Marques-Porto R., Oliveira C.F., Araujo C.A.A., & Macedo-Soares M.F. (2014). Immunosuppressive PAS-1 is an excretory/secretory protein released by larval and adult worms of the ascarid nematode *Ascaris suum*. *J helminthol* 2, 1–8.
- Araújo C.A., Perini A., Martins M.A., Macedo M.S., & Macedo-Soares M.F. (2008) PAS-1, a protein from *Ascaris suum*, modulates allergic inflammation via IL-10 and IFN-gamma, but not IL-12. *Cytokine* 44(3), 335–341
- Araujo C.A.A., Perini A., Martins M.A., Macedo M.S. & Macedo-Soares M.F. (2010). PAS-1, an *Ascaris suum* protein, modulates allergic airway inflammation via CD8+ $\gamma\delta$ TCR+ and CD4+CD25+FoxP3+ T cells. *Scand J Immunol* 72(6), 491-503.
- Benzel F., Erdur H., Kohler S., Frentsch M., Thiel A., Harms L., Wandinger K.P., & Rosche B. (2012) Immune monitoring of *Trichuris suis* egg therapy in multiple sclerosis patients. *J Helminthol* 86(3) 339-347
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L. & Kuchroo, V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235-238.

Carambia A., & Herkel J. (2010) CD4 T cells in hepatic immune tolerance. *J Autoimmun* 34(1):23–28

Carranza F., Falcón C.R., Nuñez N., Knubel C., Correa S.G., Bianco I., Maccioni M., Fretes R., Triquell M.F., Motrán C.C., & Cervi L. (2012). Helminth antigens enable CpG-activated dendritic cells to inhibit the symptoms of collagen-induced arthritis through Foxp3⁺ regulatory T cells. *PloS one* 7(7), e40356.

Cho E-S., Park B-K., & Son H-Y (2011) Effects of *Ascaris suum* extract and sulfamethoxazole on allergic airway inflammation. *Biomolecules and Therapeutics* 19 (4), 466-471.

Cohen-Naftaly M., & Friedman S.L. (2011). Current status of novel antifibrotic therapies in patients with chronic liver disease. *Ther adv in gastroenterol* 4(6), 391–417.

Czaja A.J. (2014). Hepatic inflammation and progressive liver fibrosis in chronic liver disease. *World J Gastroenterol* 20(10), 2515-2532.

Czaja A.J., (2009) Rapidity of treatment response and outcome in type 1 autoimmune hepatitis. *J hepatol* 51(1), 161–167.

Faquim-Mauro E.L., & Macedo M.S. (1998) The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clin Exp Immunol* 114, 245–251.

Girgis N.M., Gundra U.M. & Loke P. (2013). Immune regulation during helminth infections. *PLoS pathogens* 9(4), e1003250.

Griess P. (1879) Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedil "Ueber einige azoverbindungen." *Chem Ber* 12,426-428.

Hagiwara S.; Ishii Y.; & Kitamura S. (2000) Aerosolized of N-acetylcysteine attenuates lung fibrosis induced by bleomycin in mice. *AmJ Respir Crit Care Med* 162, 225–31.

Junqueira L.C.U.; Bignolos G.; Brentani R.R. (1979) Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. *Histochemical Journal*. Londres, v. 11: p. 447-55.

Majano P.L., Medina J., Zubía I., Sunyer L., Lara-Pezzi E., Maldonado-Rodríguez A., López-Cabrera M., & Moreno-Otero R. (2004) N-Acetyl-cysteine modulates inducible nitric oxide synthase gene expression in human hepatocytes. *J hepatol* 40(4) 632-637.

Makol A., Watt K.D., & Chowdhary, V.R. (2011) Autoimmune hepatitis: a review of current diagnosis and treatment. *Hepat. Res. Treat.* 2011, 1-11.

Manns M.P, Czaja A.J., Gorham J.D., Krawitt E.L., Mieli-Vergani G., Vergani D., & Vierling J.M. (2010) Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. *Hepatology* 51(6) 2193-2213.

Nascimento W.C., Silva R.P., Fernandes E.S., Silva M.C., Holanda G.C., Santos P.A., Albuquerque M.P., Costa V.A., Pontes-Filho N.T., & Souza V.O. (2014) Immunomodulation

of liver injury by *Ascaris suum* extract in an experimental model of autoimmune hepatitis. *Parasitol Res* 113(9), 3309-3317.

Oliveira, C.P.M.S., Stefano J.T., Siqueira E.R.F., Silva L.S., Mazo D.F.C., Lima V.M.R., Furuya C.K., Mello E.S., Souza F.G., Rabello F., Santos T.E., Nogueira M;A., Caldwell S.H.,

Alves V.A.F., & Carrilho F.J. (2008). Combination of N-acetylcysteine and metformin improves histological steatosis and fibrosis in patients with non-alcoholic steatohepatitis. *Hepatol res* 38(2), 159–165.

Oshiro, T.M., Macedo, M.S. & Macedo-Soares, M.F., 2005. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. *Inflamm res* 54(2005), 17–21.

Pesce J. T. Ramalingam T.R., Mentink-Kane M.M., Wilson M.S., El Kasmi K.C., Smith A.M., Thompson R.W., Cheever A.W., Murray P.J., & Wynn T.A. (2009) Arginase-1–Expressing Macrophages Suppress Th2 Cytokine–Driven Inflammation and Fibrosis. *PLoS Pathog* 5(4), 1-15.

Rocha F.A., Leite A.K., Pompeu M.M., Cunha T.M., VerriWA Jr., Soares F.M., Castro R.R., & Cunha F.Q. (2008) Protective effect of an extract from *Ascaris suum* in experimental arthritis models. *Infect Immun* 76(6) 2736-2745

Schon H-T., & Weiskirchen R. Immunomodulatory effects of transforming growth factor- β in the liver. *Hepatobiliary Surg Nutr* 3(6), 386-406

Slavons C., Burtea C., Boutry S., Laurent S., Elst L.V., & Muller R.N., 2013. Phage Display Screening for Tumor Necrosis Factor- α -Binding Peptides: Detection of Inflammation in a Mouse Model of Hepatitis. *Hindawi* 2013, 1-9.

Shi-wen X., Thompson K., Khan K., Liu S., Murphy-Marshman H., Baron M., Denton C.P., Leask A., & Abraham D.J. (2012) Focal adhesion kinase and reactive oxygen species contribute to the persistent fibrotic phenotype of lesional scleroderma fibroblasts. *Rheumatology* 51 (12), 2146-2154.

Silva S.R., Jacysyn J.F., Macedo M.S. & Faquim-Mauro E.L. (2006) Immunosuppressive components of *Ascaris suum* down-regulate expression of costimulatory molecules and function of antigen-presenting cells via an IL-10-mediated mechanism. *Eur J immunol* 36(12) 3227-3237.

Souza V.M., Faquim-Mauro E.L., & Macedo M.S. (2002) Extracts of *Ascaris suum* egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. *Braz J Med Biol Res* 35(1), 81–89.

Sugawara Y., Azuma N., Onodera S., Tsunoka Y., & Morimoto M. (2011) Th2 immune responses and alternatively activated macrophages (AAMacs) in helminth infection in aged mice. *J Vet Med Sci* 73(4) 511–516.

Sugiura H., Ichikawa T., Liu X., Kobayashi T., Wang X.Q., Kawasaki S., Togo S., Kamio K., Mao L., Ann Y., Ichinose M., & Rennard S.I. (2009) N-acetyl-L-cysteine inhibits TGF- β 1-induced profibrotic responses in fibroblasts. *Pulm Pharmacol Ther* 22(6), 487-491.

- Teufel A., Weinmann A., Centner C., Piendl A., Lohse A.W., Galle P.R., & Kanzler S. (2009) Hepatocellular carcinoma in patients with autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 15(5), 578-582.
- Tiegs, G., Hentschel J., & Wendel A. (1992) A T Cell-dependent Experimental Liver Injury in Mice Inducible by Concanavalin A. *J Clin Invest* 90(1), 196-203.
- Verhasselt V., Vanden B.W., Vanderheyde N., Willems F., Haegeman G., & Goldman M. (1999) N-Acetyl-L-Cysteine Inhibits Primary Human T Cell Responses at the Dendritic Cell Level: Association with NF-kB Inhibition. *J Immunol* 162(5), 2569–2574
- Wilson M.S., Taylor M.D., Balic A., Finney C.A.M., Lamb J.R., & Maizels R.M., (2005). Suppression of allergic airway inflammation by helminth-induced regulatory T cells. *J exp med*, 202(9), 1199–1212.
- Yang X., Yang Y., Wang Y., Zhan B, Gu Y., Cheng Y., & Zhu X. (2014) Excretory/Secretory Products from Adult Worms *Thichinella spirales* Ameliorate DSS-Induced Colitis in Mice. *PLoS ONE* 9(5) e96454.
- Yang S.H., Park M.J., Yoon I.H., Kim S.Y., Hong S.H., Shin J.Y., Nam H.Y., Kim Y.H., Kim B., & Park C.G. (2009) Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 41(5) 315-324.
- Yeoman A.D., Al-Chalabi T., Karani J.B., Quaglia A., Devlin J., Mieli-Vergani G., Bomford A., O’Grady J.G., Harrison P.M., & Heneghan M. (2008) Evaluation of risk factors in the development of hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis: Implications for follow-up and screening. *Hepatology* 48(3), 863-870.
- Zafarullah M., Li W.Q., Sylvester J., & Ahmad M. (2003) Cellular and Molecular Life Sciences Molecular mechanisms of N -acetylcysteine actions. *Cell Mol Life Sci* 60, 6-20.
- Zheng Z., Y., WENG S. Y., & YU Y. (2009) Signal molecule-mediated hepatic cell communication during liver regeneration. *World J Gastroenterol* 15(46), 5776-5783.
- Wang H.X., Liu M., Weng S.Y., Li J.J., Xie C., He H.L., Guan W., Yuan Y.S., & Gao J. (2012) Immune mechanisms of concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol* 18(2), 119-125.

Anexo C: Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

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, 25 de setembro de 2013.

Ofício nº 626/13

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

Para: **Prof.^a Valdênia Maria Oliveira de Souza**

Departamento de Medicina Tropical – CCS

Universidade Federal de Pernambuco

Processo nº 23076.041797/2013-40

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, “**Avaliação dos mecanismos de imunoregulação do extrato solúvel de *Ascaris suum* em associação com N-acetil-L-cisteína na hepatite autoimune experimental.**”

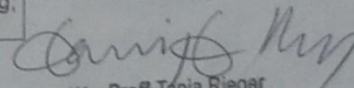
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals 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 Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE; Animais: camundongos isogênicos; Linhagem: BALB/c; Sexo: machos; Idade: 8 semanas; Peso: 250g; Nº total de animais: 180.

Atenciosamente,


Prof.^a Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306324

CCB: Integrar para desenvolver