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

ESTUDO DA AÇÃO IMUNORREGULATÓRIA DO EXTRATO SOLÚVEL DE *Ascaris suum* SOBRE A INJÚRIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL MEDIADA POR CÉLULAS IMUNES

WHEVERTON RICARDO CORREIA DO NASCIMENTO

RECIFE/PE
2012

WHEVERTON RICARDO CORREIA DO NASCIMENTO

ESTUDO DA AÇÃO IMUNORREGULATÓRIA DO EXTRATO SOLÚVEL DE *Ascaris suum* SOBRE A INJÚRIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL MEDIADA POR CÉLULAS IMUNES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical

Orientadora: Profª. Drª. Valdênia Maria Oliveira de Souza MD, PhD

Co-orientador: Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho MD,PhD

RECIFE/PE

2012

Catalogação na fonte
Bibliotecária Giseani Bezerra, CRB4-1738

N244e Nascimento, Wheverton Ricardo Correia do.
Estudo da ação imunorregulatória do extrato solúvel de Ascaris suum sobre a injúria hepática experimental mediada por células imunes / Wheverton Ricardo Correia do Nascimento. – Recife: O autor, 2012.
82 folhas: il. ; 30 cm.

Orientador: Valdênia Maria Oliveira de Souza.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Ascaris suum. 2. Hepatite autoimune. 3. Imunomodulação. 4. Tratamento. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de (Orientador). II. Título.

616.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-131)

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

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

José Thadeu Pinheiro

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Valdênia Maria Oliveira de Souza

CORPO DOCENTE

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

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

WHEVERTON RICARDO CORREIA DO NASCIMENTO

No dia 02 de março de 2012, às 14h00, no Auditório do Centro de Ciências Biológicas (CCB/UFPE), os Membros Doutores: **a Profª. Drª. Vláudia Maria Assis Costa – Presidente da Banca (UFPE), a Profª. Drª. Clarice Neuenschwander Lins de Morais (CPqAM) e o Prof. Dr. Luciano Tavares Montenegro (UFPE),** componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram o mestrando **WHEVERTON RICARDO CORREIA DO NASCIMENTO** sobre a sua Dissertação intitulada **"ESTUDO DA AÇÃO IMUNORREGULATÓRIA DO EXTRATO SOLÚVEL DE *Ascaris suun* SOBRE A INJÚRIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL MEDIADA POR CÉLULAS IMUNES",** o qual foi **orientado pela Profª. Dra. Valdênia Maria Oliveira de Souza (UFPE).** Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do mestrando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Vláudia Maria Assis Costa	**APROVADO**
Profª. Drª. Clarice Neuenschwander Lins de Morais	**APROVADO**
Prof. Dr. Luciano Tavares Montenegro	**APROVADO**

Profª. Drª. Vláudia Maria Assis Costa

Profª. Drª. Clarice Neuenschwander Lins de Morais

Prof. Dr. Luciano Tavares Montenegro

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Paulo e Graça e ao meu irmão Junior, por toda paciência e incentivo

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por ser misericordioso e sempre estar ao meu lado permitindo que alcançasse grandes realizações. Obrigado senhor por ter permitido que eu chegasse até aqui;

A meus pais e ao meu irmão que sempre me ajudaram nos momentos mais difíceis da vida. Pelo incentivo que sempre me deram, pela paciência e por me ensinarem a ser persistente e a lutar pelos meus ideais;

À minha orientadora Dra. Valdênia Souza, pela paciência e compreensão, pelo conhecimento transmitido e principalmente por ter me educado profissionalmente como uma "mãe científica". Pela dedicação a sua profissão de educador. Ao meu Co-orientador, Dr. Nicodemos Pontes Filho, pela grande contribuição e aos ensinamentos transmitidos sobre patologia;

A Roeckson, aluno do laboratório e amigo. Por todo o auxílio dado ao desenvolvimento do projeto e também fora do laboratório. Pela dedicação e pelas "horas-extras" no laboratório, que sem dúvida, foram cruciais para a conclusão do trabalho;

Às professoras que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Imunologia do LIKA: Mônica Albuquerque, Silvana Ferreira, Elizabeth Malagueño e Vlaudia Costa por todos os ensinamentos e confiança em mim;

A Prof.ª Rosângela Coêlho, Coordenadora da pós-graduação, pelo apoio e confiança. Obrigado aos funcionários Walter Galdino e a Alice Lourenço da secretaria da pós-graduação, pela disponibilidade, presteza e auxílio;

Agradeço também a Iana Rafaela e Patrícia d'Emery, que sempre se mostraram grandes companheiras de trabalho ajudando no que fosse possível;

A todos do Laboratório de Imunologia do LIKA: Érika, Rafaela, André, Roeckson, Conceição, Patrícia, Gabriela. Pela ajuda nos momentos de trabalho e pela descontração;

A Carmelita Cavalcante do laboratório de Patologia do LIKA, pela ajuda no processamento do material histológico;

A Isabella Macário e Natália Gomes que são para mim as irmãs que meus pais não me deram, mas que a vida se encarregou de trazer. Por toda a amizade que construímos e quero que dure pelo resto de nossas vidas;

A todos os meus companheiros de curso de graduação, e aos da pós-graduação, Fabiana, Tatiana, Marcelle, Emmily, Gabriela, Thiago, Armando, Bruno Galvão, Carlos Weber, que compartilharam momentos alegres e de aflição nessa trajetória;

Obrigado a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Aos órgãos de financiamento, CNPq e FACEPE, pelo auxílio financeiro.

“A verdade é que não há verdade”.

Pablo Neruda

RESUMO

O extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc) possui atividade imunossupressora em modelos vacinais, de asma alérgica e doenças auto-imunes. Neste estudo, foi verificado o efeito da administração do Asc, profilática ou terapêutica, no modelo de hepatite induzida por Com A (HAI). Para isto, camundongos BALB/c, receberam ConA, i.v., (20mg/kg corpóreo) e três grupos de animais foram formados (n=6). 1)HAI: recebeu apenas ConA; 2)Protocolo profilático HAI+Asc: tratados com Asc (1mg/mL), i.p., 30 minutos antes da indução da HAI; 3)protocolo terapêutico HAI+Asc: tratados com Asc 2 horas após indução da HAI. Como grupo controle animais receberam apenas PBS. Foram dosados transaminases e imunoglobulinas totais séricas, 8, 24 horas e 7 dias após tratamento. Cultivou-se esplenócitos estimulados com Asc e ConA. Níveis de IL-4, IL-10, IL-13 e IFN-γ dos sobrenadantes foram dosados por ELISA. Os fígados foram pesados e analisados histologicamente (hematoxilina-eosina e Tricômico de Masson). No grupo HAI, ocorreu aumento no peso do fígado, dos níveis de transaminases e Imunoglobulinas totais. Estes parâmetros foram reduzidos nas 8, 24 horas e 7º dia no grupo profilático, enquanto no terapêutico apenas no 7º dia. Em ambos os tratamento houve aumento de IL-4, IL-10 e IL-13. No grupo profilático, houve redução do infiltrado celular e aumento da fibrose hepática. A administração profilática do Asc preveniu, e a terapêutica reduziu o dano hepatocelular da lesão. Ambas estimularam a fibrose hepática a longo prazo, pela possível ação da IL-13. Desta forma, o Asc teria eficiência mais acentuada na fase inicial da doença hepática.

Palavras-chave: *Ascaris suum*; Hepatite Auto-imune; Imunomodulação; Tratamento.

ABSTRACT

The extract of adult Ascaris suum worms (Asc) has immunosuppressive activity in vaccine models, allergic asthma and autoimmune diseases. This study evaluated the prophylactic or therapeutic effect of administration of the Asc in a mouse model of Concanavalin A (Con A)-induced hepatitis. For this, BALB/c mice received ConA, i.v., (20mg/kg) and three groups of animals were formed (n=6). 1) IAH: received only ConA; 2) AIH+Asc prophylactic: treated with Asc (1mg/mL), i.p., 30 minutes before induction of the AIH; 3) AIH+Asc therapeutic: treated with Asc two hours after induction of AIH. The control group of animals received only PBS. Were measured transaminases and total immunoglobulins, in serum, 8, 24 hours and 7 days after treatment. Was cultivated splenocytes stimulated with ConA and Asc. IL-4, IL-10, IL-13 and IFN-γ were assayed in the supernatants by ELISA. The livers were weighed and examined histologically (hematoxylin-eosin and Masson's trichrome). In the AIH group, there was an increase in liver weight, transaminase levels and total immunoglobulins. These parameters were reduced in 8, 24 hours and 7 days in the prophylactic group, while the therapeutic treatment only on day 7. In both treatments increased IL-4, IL-10 and IL-13. In the prophylactic group, decreased cellular infiltration and increased liver fibrosis. The prophylactic administration of Asc prevented, and treatment reduced the damage of hepatocellular injury. Both stimulated liver fibrosis in long term by IL-13 action. Thus, the efficiency of Asc would more pronounced in the initial stage of liver disease.

Keywords: *Ascaris suum*, Autoimmune Hepatitis; Immunomodulation; treatment.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

DISSERTAÇÃO

Página

Figura 1: Organização dos grupos de estudo para avaliação do efeito profilático e terapêutico do Asc frente à indução da HAI. **32**

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO Página

Esquema 1: Procedimentos experimentais realizados para avaliar o efeito profilático e terapêutico do Asc frente a indução da HAI. **61**

Figura 1: Peso do fígado profilático (**A**) e terapêutico (**E**). Níveis de Imunoglobulinas totais profilático (**B**) e terapêutico (**F**), Níveis de AST profilático (**C**) e terapêutico (**G**) e ALT profilático (**D**) e terapêutico (**H**). **62**

Figura 2: Curva de sobrevida. Após a indução da HAI e tratamento com o Asc de maneira terapêutica. **63**

Figura 3: Níveis de citocinas produzida por esplenócitos no sétimo dia após tratamento com o Asc. Níveis da produção de IFN- γ profilático (**A**) e terapêutico (**E**). IL-4 profilático (**B**) e terapêutico (**F**). IL-10 profilático (**C**) e terapêutico (**G**). IL-13 profilático (**D**) e terapêutico (**H**). **64**

Figura 4: Histomorfometria do tratamento profilático com o Asc. Imagens representativas de cortes dos grupos controle (**A** e **D**), HAI (**B** e **E**) e HAI + Asc (**C** e **F**) corados com HE em aumento de 400x (**A, B e C**) e submetidos à coloração tricrômico de manson em aumento de 100x (**D, E e F**). **65**

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1: Histomorfometria dos animais do grupo controle, HAI e HAI + Asc corados com HE ou Tricrômico de Manson e analisados através de microscopia óptica. **66**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotranferease
Asc	Extrato do verme adulto de *Ascaris suum*
AST	Aspartato Aminotransferase
CD	"Cluster of Differentiation" (Grupo de diferenciação)
ConA	Concanavalina A
DCs	"Dendritc Cells" (Células dendríticas)
ELISA	"Enzyme Linked Immunosorbent Assay" (Ensaio imunoenzimático)
HAI	Hepatite Auto-Imune
IFN-γ	Interferon γ
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
MHC	"Major Histocompatibility Complex" (Moléculas do complexo de histocompatibilidade principal)
NO	Óxido nítrico
OVA	Ovalbumina
PAS-1	Proteína Solúvel de *Ascaris summ* - 1
TGF-β	*Transforming growth factor beta* (Fator de transformação do crescimento beta)
Th1	Linfócitos T "helper" tipo 1
Th2	Linfócitos T "helper" tipo 2
Th17	Linfócitos T "helper" tipo 17
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
Tregs	Linfócitos T regulatórios

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO..... -15-
2. REVISÃO DA LITERATURA..... -18-
2.1 Imunomodulação pelo extrato antigênico do *Ascaris suum*.... -19-
2.2 Imunomodulação por helmintos e as doenças auto-imunes.... -20-
2.3 Hepatite Auto-Imune..... -22-
3. HIPÓTESE..... -27-
4. OBJETIVOS..... -28-
4.1 Geral..... -29-
4.2 Específicos..... -30-
5. MATERIAIS E MÉTODOS..... -31-
5.1 Animais..... -32-
5.2 Extrato antigênico e lectina..... -32-
5.3 Indução da injúria hepática tecidual mediada por células imunes.... -33-
5.4 Formação dos Grupos de Estudo..... -33-
5.5 Categorização das Variáveis..... -35-
5.5.1 Variáveis dependentes..... -35-
5.5.2 Variáveis independentes..... -35-
5.6 Métodos de Coleta dos Dados..... -35-
5.6.1 Dosagem de transaminases..... -35-
5.6.2 Cultura Celular para Dosagem de Citocinas..... -36-
5.6.3 Dosagem de Citocinas..... -37-
5.6.4 Dosagem de imunoglobulinas..... -38-
5.6.5 Histopatologia..... -39-
6.6.6 Análise histomorfométrica..... -39-
5.7 Análise Estatística..... -40-
6. RESULTADO..... -41-
Artigo..... -43-
7. CONCLUSÕES..... -69-
8. REFERÊNCIAS..... -71-
9. ANEXO..... -77-
Anexo I..... -78-
Anexo II..... -79-

1. APRESENTAÇÃO

O extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* possui proteínas com atividades regulatórias que podem modular a resposta imune para antígenos homólogos ou heterólogos, no hospedeiro (SOUZA; JACYSYN; MACEDO, 2004; SOUZA; FAQUIM-MAURO; MACEDO, 2002). Com relação aos antígenos heterólogos, o extrato de *A. suum* demonstrou potente efeito anti-inflamatório e imunosupressivo frente à resposta a lipolissacarídeos bacterianos e em modelos de asma alérgica (OSHIRO et al., 2006; LIMA et al, 2002). Contudo, poucos são os estudos da ação imunorregulatória deste extrato em modelo de hipersensibilidade auto-imune.

Rocha e colaboradores (2008) observaram a capacidade imunossupressora do extrato de *A. suum* na diminuição da severidade da artrite auto-imune experimental, quando foi administrado por via intraperitoneal e oral, sendo capaz de levar a diminuição da produção de IL-1β e NO. Este efeito imunossupressor reduziu a hipernocicepção e a sinovite de maneira profilática e terapêutica, indicando que esta intervenção poderia ser eficaz em diversos espectros clínicos (ROCHA et al., 2008).

As respostas auto-imunes mediadas por células T são apontadas como peças chaves na patogênese da injúria tecidual, como a observada na Hepatite Auto-Imune (HAI) (ICHIKI et al., 2005; LONGHI et al., 2010). A tolerância hepática é promovida por diversos mecanismos, entre eles a preponderância de moléculas inibitórias e a abundância de citocinas imunossupressoras (CARAMBIA; HERKEL, 2010). Modelos de estudo em animais experimentais que mimetizem a HAI vêm sendo estabelecidos. Entre eles, um baseado na administração intravenosa da lectina, Concanvalina A (ConA), extraída de *Canavalia ensiformis* (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992; LONGHI et al., 2010; ANAND et al., 2006; CHEN et al., 2007; XU et al., 2009). A injúria hepática induzida por ConA necessita da ativação de linfócitos T

auxiliares e macrófagos. Após a administração da ConA, ocorre uma insuficiência hepática aguda. Este modelo permitiu o estudo da fisiopatologia das doenças hepáticas mediadas por componentes imunológicos, como a hepatite auto-imune aguda e crônica (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992).

O tratamento da HAI baseia-se na imunossupressão e pode culminar na remissão da doença, entretanto há relatos de falha terapêutica ou toxicidade aos fármacos utilizados (LEMOS; SCHIAVON; FERRAZ, 2007). Estudos têm demonstrado que a corticoterapia isolada ou em combinação com azatriopina induz a remissão em apenas 65% dos pacientes em 3 anos (CJAZA, 1991; CJAZA, 2002). Sendo assim, opções terapêuticas que utilizam mecanismos de tolerância hepática estão começando a surgir (CARAMBIA; HERKEL, 2010). Foi demonstrado que a IL-10, induzida em resposta ao *A. suum*, está comprometida com a atividade anti-inflamatória e supressão da resposta imune humoral e celular específica para antígenos heterólogos (FAQUIM-MAURO et al., 1998; SOUZA; JACYSYN; MACEDO, 2004; OSHIRO et al., 2006).

O extrato do verme adulto do *A. suum* (Asc) poderia desempenhar papel regulatório em doenças auto-imune hepáticas devido ao caráter anti-inflamatório e imunosupressivo apresentado. Componentes do Asc podem atuar diretamente no fígado ou em órgãos linfóides induzindo ou restaurando a homeostase, com produção de IL-10, e consequente melhora de marcadores teciduais e sorológicos do dano hepático.

Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito profilático e terapêutico da administração do Asc em camundongos quando submetidos à indução da hepatite auto-imune experimental.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Imunomodulação pelo extrato antigênico do *Ascaris suum*

Infecções por helmintos ou imunizações com extrato dos vermes ou seus produtos (secretados ou excretados) são capazes de alterar a indução e a função da resposta imune (BORKOW; BENTWICH, 2008; ERB, 2009; URBAN et al., 2007). Pesquisas experimentais mostraram que a infecção helmíntica ou imunização com extratos de vermes modificam a imunidade a antígenos homólogos e heterólogos (FERREIRA et al., 1995; DUNNE; COOKE, 2005; SOUZA; FAQUIM-MAURO; MACEDO, 2002). Estas observações são apoiadas por estudos em seres humanos que exibem as consequências das constantes infecções e reinfecções helmínticas, como a ascaridíase e outras geohelmintíases, sobre a eficácia da vacinação ou à tolerância aos transplantes alogênicos (COOPER *et al.*, 2000; ELIAS et al., 2001; LIWSKI et al., 2000; SABIN et al., 1996).

A modulação da resposta imune pelo extrato bruto de vermes adultos de *A. suum* (Asc) foram comprovadas por uma série de experimentos realizados por Soares e colaboradores (1985, 1986, 1987, 1988, 1991, 1992). A administração subcutânea, conjunta do Asc com o antígeno heterólogo, ovalbumina (OVA), em adjuvante, levou à supressão da reação imediata e da reação tardia de hipersensibilidade, acompanhada da inibição da produção de IgE, IgG1 e IgG2a anti-OVA (FERREIRA et al., 1995). Posteriormente, foi demonstrado que componentes de alto peso molecular do Asc estiveram comprometidos com atividade imunossupressora a antígenos homólogos e heterólogos (FAQUIM-MAURO; MACEDO, 1998; SOUZA; MACEDO, 2009; SOUZA; JACYSYN; MACEDO, 2004; SOUZA; FAQUIM-MAURO; MACEDO, 2002). Adicionalmente, Silva e colaboradores (2006) relataram que os componentes de alto peso molecular do *Asc* inibem a expressão de moléculas co-estimulatórias (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.

Em um modelo experimental de asma alérgica, o Asc levou a 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). 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 proteína alergênicas do verme. Este componente diminuiu a eosinofília 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. O PAS-1 possui a habilidade de suprimir a produção de anticorpos anti-OVA, alterar a produção e a secreção de citocinas, e inibir a proliferação (OSHIRO et al., 2004).

Com relação à resposta imune inata, o PAS-1 também foi capaz de suprimir o infiltrado neutrofílico induzido por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), num modelo de bolsa de ar, onde 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).

2.2. Imunomodulação por helmintos e as doenças auto-imunes

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 aos micro-organismos, como os helmintos, durante a infância (YAZDANBAKHSH; KREMSNER; REE, 2002). Recentemente, este conceito tem sido cada vez mais aceito para as doenças auto-imunes inflamatórias, principalmente em modelos de estudos experimentais (OSADA; KANAZAWA, 2010).

De fato, estudos realizados por MELON e colaboradores (2010) demonstraram que camundongos infectados com *Hymenolepis diminuta* exibem um aumento da produção de IL-4 e IL-10 por células esplênicas de animais que sofreram 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 como a deposição de colágeno (MELON et al., 2010).

Foi observado que o trematódeo *Fasciola hepatica* suprimiu a apresentação de auto-antígenos relacionados às repostas Th1 e Th17, resultando em um efeito protetor sobre o desenvolvimento da Encefalomielite autoimune experimental (EAE) dependente de TGF-β e não de IL-10 (WALSH et al. 2009). A infecção pela *Taenia crassiceps*, gerou um efeito anti-diabético no modelo experimental de diabetes induzida por droga (estreptozotocina), enquanto a população de células T regulatórias não sofreu alteração (ESPINOZA-JIMÉNEZ et al., 2010).

Estudos utilizando a administração de antígenos brutos ou até a infecção com helmintos tem demonstrado efeito terapêutico sobre doenças auto-imunes humanas. Segundo Correale e colaboradores (2008), as células B de indivíduos infectados por diferentes helmintos podem exercer um efeito neuroprotetor sobre o sistema nervoso central de pacientes com esclerose múltipla através do aumento da produção de IL-10 e de fatores neurotróficos que participam da regulação da imunidade (CORREALE et al., 2008). Benzel e colaboradores (2011) utilizaram ovos de *Trichuris suis* frente à esclerose

múltipla em um ensaio clínico randomizado. O tratamento com ovos de *T. suis* durante seis meses induziu redução da resposta Th1 e aumento da Th2 acompanhada de melhora clínica associada à eosinofilia e alterações nas proporções de linfócitos T $CD4^+$, $CD8^+$ e NK (BENZEL et al., 2011). Além disso, pacientes portadores de doença de Crohn e infectados por *N. americanus* também exibiram melhora clínica (CROESE et al., 2008). Em todos os estudos foi observado melhora clínica sem a observação de reações adversas.

Com relação à imunomodulação pelo *Ascais suum*, o Asc, levou à diminuição da severidade da artrite auto-imune experimental. O Asc foi administrado por via intraperitoneal e oral, antes e depois da indução da artrite, levando a diminuição da produção de IL-1β e NO. Sendo, desta forma, comprovado o potencial profilático e terapêutico do extrato de *A. suum* frente a artrite auto-imune (ROCHA *et al.*, 2008).

2.3 Hepatite auto-imune

O fígado é um dos maiores órgãos do corpo e é responsável pelo metabolismo dos carboidratos, lipídeos, proteínas, secreção de bile e da desintoxicação do organismo. Sua estrutura anatômica e vascularização transformam este órgão num local de intercâmbio contínuo de informações imunológicas. O microambiente hepático é continuamente exposto aos antígenos alimentares e microbianos provenientes do intestino e funciona como barreira às exposições aos antígenos ambientais. Além disso, o fígado, como principal órgão do metabolismo, produz uma grande quantidade de neo-antígenos (KNOLLE; GERKEN, 2000; NEMETH; BAIRD; O'FARRELLY, 2009; TIEGS; LOHSE, 2010). Ao mesmo tempo, o fígado adquiriu mecanismos especializados de tolerância imunológica, a fim de evitar as auto-reações das respostas imune inata e adaptativa.

O efeito da tolerância hepática foi descrita inicialmente em 1969, com a demonstração de que enxertos de fígados são tolerados em meio à incompatibilidade de MHC em porcos e na ausência de imunossupressão (CALNE et al., 1969; TIEGS; LOHSE, 2010). Em contraste com outros órgãos, o fígado parece ser mais resistente a danos causados por mecanismos auto-imunes devido à indução local de tolerância via eliminação, inativação e apoptose de células T efetoras (LIMMER et al., 2000; CRISPE, 2003; CHEN et al., 2006).

A Hepatite Auto-Imune (HAI) é uma doença inflamatória progressiva crônica do fígado caracterizada pelo aumento das transaminases séricas, elevação de imunoglobulina G (auto-anticorpos do tipo IgG, principalmente órgão-específico) e um quadro histológico de hepatite de interface (infiltrado inflamatório excedendo o espaço porta), com maior ocorrência em indivíduos do sexo feminino (LEMOS; SCHIAVON; FERRAZ, 2007).

A etiologia da HAI é desconhecida, no entanto existe uma forte influência de componentes genéticos e fatores ambientais envolvidos na sua indução e expressão. A prevalência é superior em caucasianos europeus e indivíduos do sexo feminino (relação homem/mulher 1:4). A patogênese é provavelmente relacionada a uma reação imunológica contra antígenos hepatocelulares, mas os exatos mecanismos pelos quais os danos do fígado ocorrem não são totalmente compreendidos. Acredita-se que as respostas auto-imunes mediadas por células T efetoras auto-reativas são as peças chaves na patogênese da injúria tecidual (ICHIKI et al., 2005; LONGHI *et al.*, 2010; MEDINA; GARCÍA-BUEY; MORENO-OTERO, 2003).

A história natural da HAI apresenta um prognóstico pobre, com frequente progressão para cirrose e insuficiência hepática em pacientes não tratados. O carcinoma hepatocelular pode ocorrer na HAI, na ausência de infecção viral, embora seja rara e ocorre somente nos casos de falha terapêutica associada à progressão para cirrose. Porém,

tem sido descrito casos na literatura da associação da HAI e o hepatocarcinoma, onde o processo auto-imune pode ser considerado um fator predisponente para a patogênese do câncer hepático (FEHÉR, LENGYEL, 2010; MEDINA; GARCÍA-BUEY; MORENO-OTERO, 2003; PARK; NAGORNEY; CZAJA, 2000; AMAMOTO et al., 2011).

A HAI 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. Não existem dados epidemiológicos precisos sobre a HAI. Na Noruega e Suécia, a incidência média 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. Estudos mostraram que aproximadamente 40% dos pacientes com doença grave não tratada morrem dentro de 6 meses após o diagnóstico e que os sobreviventes frequentemente desenvolvem cirrose, varizes esofagiana e subsequente hemorragia (MANNS et al., 2010).

Dois tipos de HAI são reconhecidas de acordo com os auto-anticorpos encontrados em amostras de soro. HAI tipo 1 é caracterizada pela presença de auto-anticorpos anti-músculo liso e/ou anti-nuclear, enquanto o tipo 2 apresenta auto-anticorpos do tipo anti-microssoma de fígado e rim-1 e/ou anti-citosol de fígado tipo 1 (MARTINI et al., 1988; HOMBERG et al., 1987; MAGGIORE et al., 1993). O carcinoma hepatocelular (CHC) ocorre em 4% dos pacientes com HAI tipo 1, e a probabilidade de desenvolvimento desta neoplasia é de 2,9%. Em pacientes norte-americanos, o risco do CHC está relacionado ao sexo masculino, hipertensão portal manifestada por ascite, varizes esofagiana, ou trombocitopenia, tratamento com imunossupressores por pelo menos 3 anos, e cirrose pelo menos 10 anos de duração (MANNS et al., 2010).

O tratamento da HAI baseia-se na imunossupressão e pode culminar na remissão da doença, entretanto há relatos de falha terapêutica ou toxicidade aos fármacos utilizados. Estudos têm demonstrado que a corticoterapia isolada ou em combinação com azatriopina induz a remissão em apenas 65% dos pacientes em 3 anos de tratamento (LEMOS; SCHIAVON; FERRAZ, 2007; CJAZA, 1991; CJAZA, 2002). A progressão da HAI para o carcinoma hepatocelular em pacientes submetidos a longos períodos de tratamento é incomum. Porém, tem sido descrito casos na literatura da associação da HAI e o hepatocarcinoma, onde o processo auto-imune pode ser considerado um fator predisponente para a patogênese do câncer hepático (FEHÉR, LENGYEL, 2010; YAMAMOTO et al., 2011).

Devido à gravidade, opções terapêuticas que utilizam mecanismos de tolerância hepática estão começando a surgir, tais como a geração de células T regulatórias e citocinas imunossupressoras no fígado para tratamento de doenças auto-imunes (CARAMBIA; HERKEL, 2010).

A investigação sobre a patogênese da HAI tem sido dificultada pela falta de modelos animais reproduzindo fielmente a condição humana de dano hepatocelular. O modelo ideal para a HAI deve ter um caso bem definido de início, seguido por inflamação crônica levando a fibrose. A fim de investigar melhor a HAI, modelos de estudo em animais experimentais que mimetizem a doença vêm sendo estabelecidos (LONGHI et al., 2010). Entre eles, o modelo de administração intravenosa da lectina Concanvalina A (ConA), extraída de *Canavalia ensiformis* (conhecida popularmente como feijão de porco) (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992; ANAND et al., 2006; CHEN et al., 2007; XU et al., 2009).

Verificou-se que a injúria hepática induzida por esta lectina ocorre de maneira dose dependente e necessita da ativação de linfócitos T auxiliares por macrófagos. Após a

administração da ConA, ocorre uma insuficiência hepática aguda com aumento significativo das transaminases séricas, oito horas após sua administração, e evidenciaram-se pequenas áreas de necrose com um infiltrado difuso de leucócitos por microscopia óptica. Em seguida, foi constatada uma grave desintegração morfológica da micro-arquitetura hepática, através de microscopia eletrônica. Os linfócitos lesionam a superfície sinusoidal dos hepatócitos e a morte celular foi confirmada observando-se rupturas da membrana celular, vacuolização citoplasmática e perda de citoplasma. Este modelo permitiu o estudo da fisiopatologia das doenças hepáticas mediadas por componentes imunológicos, como a hepatite auto-imune aguda e crônica (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992).

Neste contexto e devido ao caráter anti-inflamatório e imunossupressor do Asc e do seu potencial terapêutico e profilático exibido pelo extrato em modelo de inflamação auto-imune, nos perguntamos sobre o papel imunomodulador durante HAI. Para isto, foram avaliados os parâmetros de injuria hepática induzida por Con A, quando administrada antes ou depois do Asc. O perfil de resposta imune celular sistêmico, induzido pela administração de ConA, bem como suas alterações após a administração do Asc foi também analisado.

3. HIPÓTESE

O tratamento profilático e terapêutico com o Asc restaura os níveis de transaminases, imunoglobulinas totais, inflamação hepática nos camundongos que receberam Concanavalina A.

4. OBJETIVOS

4.1. Geral

Verificar se a administração do extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc), por via intraperitoneal, antes (profilático) ou após (terapêutico) a indução da Hepatite Auto-Imune experimental (HAI) é capaz de prevenir ou atenuar a doença em camundongos isogênicos.

4.2. Específicos

- Descrever as alterações dos níveis de transaminases séricas (ALT e AST) após a indução da HAI e tratamento profilático ou terapêutico com o Asc;
- Determinar o peso do fígado dos camundongos após indução da HAI e tratamento profilático ou terapêutico com o Asc;
- Analisar a produção de imunoglobulinas séricas totais nos grupos de estudos;
- Descrever os níveis de produção de citocinas (IL-4, IL-10, IL-13 e IFN-γ) no sobrenadante de células esplênicas dos grupos de estudo;
- Verificar as alterações histomorfométricas hepáticas decorrentes da indução da HAI e tratamento com o Asc.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos machos, da linhagem BALB/c, com 8 semanas de idade, provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE). Os animais foram mantidos em instalações específicas isentos de agentes patogênicos e mantidos em gaiolas (8-10 animais por gaiolas), sob condições padronizadas de temperatura (22 a 23°C) e luminosidade (ciclos de 12 h de claro e 12 h de escuro) e recebiam água e comida *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Centro de Ciências Biológicas/UFPE (Processo Nº 23076.027221/2010-27).

5.2 Extrato de *Ascaris suum* e lectina

Para o tratamento dos camundongos com o Asc, foi utilizado o extrato de vermes adultos de *A. suum* que foi produzido segundo protocolo utilizado por Souza e colaboradores (2002), onde vermes vivos adultos de *A. suum*, obtidos a partir do intestino de suínos, foram lavadas várias vezes com solução salina, misturado com igual volume de solução salina de tampão borato (BBS) pH 8,0 e homogeneizadas em um aparelho de Ultra-Turrax (Janke e Kunkel, Staufen, Alemanha). O homogenato obtido foi centrifugado a 10.000 r.p.m. durante 1 h. Em seguida, o precipitado foi ressuspendido em 400 ml de BBS e agitado *"overnight"* a 4 °C. Esta suspensão foi centrifugada novamente e o sobrenadante dialisado contra água destilada *"overnight"* a 4 °C. O sobrenadante obtido, após centrifugação a 10.000 r.p.m. por 2 h, foi liofilizado em alíquotas. As alíquotas foram diluídas em solução tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M, pH 7.2, estéril.

A lectina Concanavalina A (ConA) foi adquirida comercialmente (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA).

5.3. Indução da injúria hepática tecidual mediada por células imunes

A ConA foi diluída em PBS estéril na concentração de 1mg/mL. A HAI foi induzida através da administração de ConA por via intravenosa (v.i.) através da artéria caudal em uma dose de 20 mg/Kg corpóreo. Foi considerada indução da HAI quando houve aumento das aminotransferases 3 vezes acima do limite superior do método (42 U/L para AST e acima de 41 U/L para ALT) e com a ocorrência de hipergamaglobulinemia (LEMOS; SCHIAVON; FERRAZ, 2007).

Como controle da indução da HAI, foi administrado aos animais do grupo controle apenas o veículo estéril (PBS) por v.i.

5.4. Formação dos Grupos de Estudo

Os camundongos isogênicos machos da linhagem BALB/c (8 semanas de idade) foram distribuídos em um grupo controle e grupos experimentais (6 animais por grupo). foram realizados dois protocolos experimentais relativos ao tempo de tratamento com o Asc: **Profilático** (antes da indução da HAI) e **Terapêutico** (após indução da HAI). O tempo de administração da Asc e ConA foi adaptado segundo TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992 e ROCHA *et al.*, 2008.

Sendo assim, os diferentes grupos de animais (**Figura 1**) foram submetidos aos seguintes protocolos:

Efeito profilático:

Controle P: recebeu PBS por via i.p., e 30 minutos após, 300µL de PBS por via i.v.; **HAI P:** recebeu PBS por via i.p., e 30 minutos após, 20mg/Kg corpóreo de ConA por via i.v; **HAI + Asc P:** recebeu 1mg de Asc por via i.p., e 30 minutos após, 20mg/Kg corpóreo de ConA por via i.v.

Efeito terapêutico:

Controle T: recebeu PBS por via i.v., e 2 horas após, PBS por via i.p.; **HAI T:** recebeu 20mg/Kg corpóreo de ConA por via i.v., e 2 horas após, PBS por via i.p.; **HAI + Asc T:** recebeu 20mg/Kg corpóreo de ConA por via i.v., e 2 horas após, 1mg de Asc por via i.p..

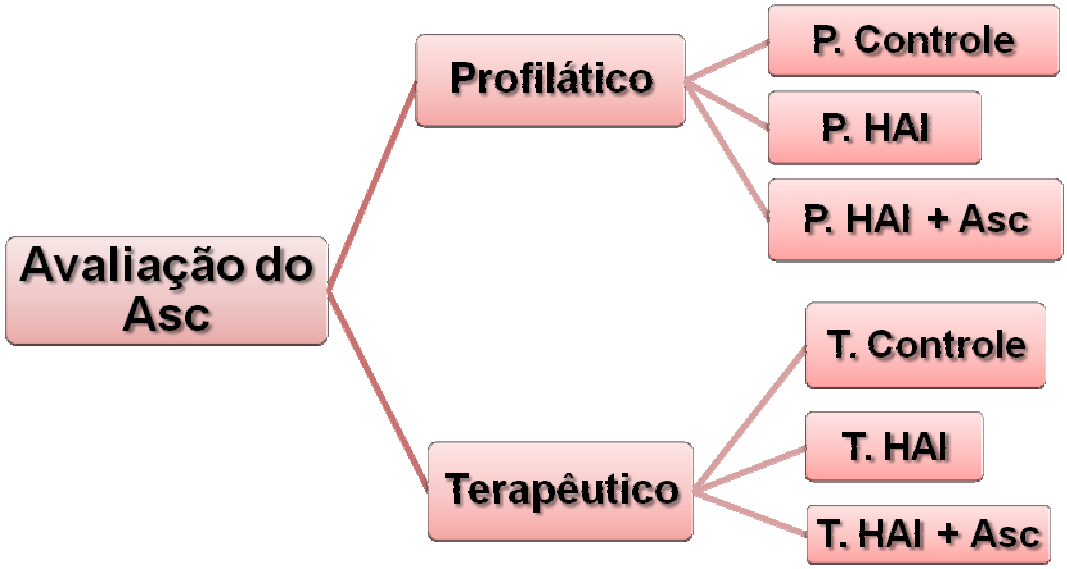


Figura 1: Organização dos grupos de estudo para avaliação do efeito profilático e terapêutico do Asc frente à indução da HAI

5.5. Categorização das Variáveis

5.5.1. Variável independente

Foi considerada como variável independente a administração profilática ou terapêutica do Asc frente à indução da HAI.

5.5.2. Variável dependente

Foram consideradas como variáveis dependentes os níveis de transaminases séricas (ALT e AST), o peso do fígado dos animais tratados, a produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e IFN-γ, os títulos de anticorpos totais no soro dos animais e a morfologia e morfometria do tecido hepático dos animais tratados com o Asc de maneira profilática ou terapêutica e/ou submetidos à HAI.

5.6. Métodos de Coleta dos Dados

5.6.1 Dosagem de transaminases

Após a administração do Asc e/ou ConA foi realizada a coleta de sangue 8, 24 horas e 7 dias após tratamento para a dosagem das transaminases séricas. Os níveis das transaminases séricas, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), foram obtidos através do uso de kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG, BR), o qual utiliza a metodologia de Reitmamm e Frankel, onde a atividade dessas enzimas mensurada através da formação de cor entre o piruvato e oxaloacetato e a dinitrofenilhidrazina para formar as hidrazonas correspondentes. A intensidade de coloração da hidrazona formada, em meio alcalino, é diretamente proporcional à conversão dos cetoácidos em hidroxiácidos. Os pontos da curva de calibração foram

realizados em triplicata e a leitura do resultado da reação foi realizada em espectrofotômetro Hitachi com cubetas de quartzo e filtro de 505nm.

5.6.2 Cultura Celular para Dosagem de Citocinas

Os baços dos camundongos, dos grupos controle e submetidos ao tratamento com Asc e/ou ConA, foram coletados de maneira asséptica e colocados em meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo/Brasil), acrescido de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina 100mg/L), HEPES 1M, 2-Mercaptoetanol 0,01M e aminoácido (L-glutamina 200mM) para transporte. Em fluxo laminar os baços foram macerados em placas de Petri junto ao meio RPMI 1640 e as suspensões de células esplênicas foram então centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm, a 4ºC.

Após a centrifugação, o sedimento foi ressuspendido e as hemácias lisadas pela adição de água estéril destilada ao precipitado por aproximadamente 18 segundos. As células foram então ressuspendidas em meio RPMI suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal; WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro/Brasil), e a viabilidade foi observada pelo emprego do *Trypan Blue* 0,2%, Diluindo-se a suspensão (1:10) e contando-se as células em câmara de Newbauer.

As suspensões de esplenócitos foram distribuídas em placas de cultura de 48 poços, em duplicata, na concentração de $5x10^6$ células/mL e submetidas a diferentes tratamentos: MEIO (ausência de estímulo), Asc (Extrato bruto de antígeno de *A. suum*) na concentração de 20 μg/mL, e ConA (mitógeno) na concentração de 5 μg/mL e cultivadas por 24 e 72 horas em estufa a 37ºC e 5% de CO_2, para obtenção de sobrenadante.

5.6.3 Dosagem de Citocinas

As placas para realização do ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) (2595, Costar, Cambridge, MA, USA) foram sensibilizadas com anticorpos de captura [anti-INFγ (XMG 1.2, a 8 μg/mL), anti-IL4 (BVD1D11 a 4 μg/mL), anti-IL10 (2A5, a 8 μg/mL)], diluídos em Tampão Carbonato (pH 9,6) sendo distribuídos 50 μl em cada poço da placa e incubadas à temperatura de 4°C por 18 h. Em seguida, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (Tampão salina fosfato com 0,05% de Tween 20) e posteriormente bloqueadas com 80 μl de uma solução de PBS-T-SBF a 10 % [Tampão salina fosfato com 0,05% de Tween 20 e 10% de soro bovino fetal (WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro/Brasil)] por 1 hora.

Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e, em seguida, adicionados 50 μL dos respectivos padrões recombinantes de camundongos: rIFN-γ, rIL-10 e rIL-4 diluídos nas concentrações indicadas pelo fabricante ou amostras dos sobrenadantes em duplicata de cada poço da cultura de células. Os padrões foram distribuídos no volume de 100 μL nos primeiros poços nas concentrações iniciais de 20 ng/mL para rIFN-γ, e de 10 ng/mL para rIL-10 e rIL-4. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas até as concentrações de 0.625 ng/mL e 0,3125 ng/mL, respectivamente para cada citocina com Meio RPMI 1640 suplementado com SBF a 10%. As placas foram incubadas a 4°C por 18 horas. Após esta incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e 50 μl dos segundos anticorpos biotinilados [anti-INFγ (AN18, a 1 μg/mL), anti-IL4 (BVD624G2, a 1 μg/mL), anti-IL10 (SXC1, a 2 μg/mL)] (cedidos pelo laboratório de Imunologia da Universidade de São Paulo), diluídos com PBS e 0,1 % de BSA (Soro Albumina Bovina; SIGMA Chemical, St. Louis, Mo., USA), foram adicionados seguidos de incubação à temperatura ambiente por uma hora e trinta minutos. Após esta incubação, cada placa foi novamente lavada

três vezes com PBS-T e o conjugado enzimático diluído 1:8000 (estreptoavidina marcada com peroxidase, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) em PBS contendo BSA 0,1% e incubadas à temperatura ambiente por uma hora. As placas foram lavadas e a reação revelada pela adição do substrato contendo H_2O_2 e o cromógeno ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvidos em tampão citrato 0,1 M e fosfato de sódio 0,2 M pH=5,5. A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2 M e a leitura realizada em leitor de ELISA (BIORAD), em comprimento de onda de 405 nm.

As concentrações de citocinas nos sobrenadantes foram calculadas a partir de curvas-padrão obtidas com concentrações de 1,25 a 20 ng/mL de rINF-γ, 0,3125 a 10 ng/mL de rIL-4 e 0,625 a 10 ng/mL de rIL-10. Os resultados foram apresentados como as médias aritméticas ± desvio padrão (DP).

5.6.4 Dosagem de imunoglobulinas

A dosagem de imunoglobulinas totais foi feita por ELISA direto, em placas de 96 poços (Nunc MaxiSorp, Roskilde, Denmark) que foram sensibilizadas "overnight" a 4ºC com os plasmas obtidos nas diluições 1:50 em PBS 0,01M/pH 7,2 (100µL/poço). Em seguida, foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem PBS-T (Tween 0,05%) e os poços bloqueados com 200µL/poço de PBS-T contendo 3% de leite por 3h a 37°C. Após nova lavagem, as placas foram incubadas por 1h a 37°C com 100µL de anticorpos de cabra específicos para Ig totais de camundongos conjugadas à biotina na diluição de 1:10.000 (Southern Biotechinology Associates, Inc, AL, USA). Após nova lavagem, o conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase (1:6.000) (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) foi acrescentado (100µL/poço) e as placas reincubadas por 1h a 37°C. Após nova lavagem, 100µL/poço do substrato (10mg de cromógeno OPD (Ortho-

phenyldiamine, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) em 10mL de tampão citrato 0,1M e pH 5,5 e 10μL de peróxido de hidrogênio foi adicionado a cada poço. Dez minutos depois, a reação foi parada pela adição de 100μL de ácido cítrico 0,2M e as placas lidas no leitor de ELISA (OD_{450}). Os resultados foram apresentados como as médias aritméticas das Densidades ópticas (D.O.) ± desvio padrão (DP).

5.6.5 Histopatologia

Os fígados dos animais submetidos ao tratamento com o Asc e/ou ConA foram coletados e pesados. Em seguida, foram fixados em formalina a 10% tamponada. Para os cortes histológicos, foram selecionados fragmentos do tecido hepático em cortes transversais de três lóbulos distintos do órgão e, em seguida, submetidos à rotina histológica. 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. Após essa etapa, as amostras foram diafanizadas em xilol e impregnadas em parafina histológica fundida a 60°C. Posteriormente, foram incluídas em parafina. Os cortes histológicos (4μm) foram obtidos em micrótomo horizontal Yamato (Japan). Os cortes destinados ao estudo histopatológico foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) e aqueles utilizados no estudo morfométrico, corados pela técnica de Tricômico de Masson, seletiva para colágeno (JUNQUEIRA; BIGNOLOS; BRENTANI, 1979).

5.6.6 Análise histomorfometrica

A análise histológica foi realizada através da categorização qualitativa da presença de necrose e de infiltrado inflamatório no parênquima hepático e através da contagem de linfócitos/campo utilizando-se o Software Mesurim®. O estudo

morfométrico foi obtido através do Software ImageJ® através da mensuração dos histogramas da concentração de intensidade da coloração azul (específica para o colágeno). Para realização das análises foram obtidas pelo menos 20 fotografias de campos aleatórios por lâmina nos aumentos de 100 e 400 vezes (CARDOSO-SILVA et al., 2007).

5.7 Análise Estatística

A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através de tabelas e gráficos, incluindo o uso de medidas descritivas como média aritmética e desvio padrão. Cada experimento foi repetido 3 vezes e todas as culturas, dosagens de transaminases, Imunoglobulinas totais e citocinas foram realizadas em duplicatas. O peso do fígado foi analisado por meio do Teste t de student e de Tukey. Os resultados das dosagens de citocinas, anticorpos e transaminases foram submetidos a uma Análise de variância (ANOVA) para dados paramétricos (Two-way).

Para a análise histomorfométrica do fígado, os resultados foram categorizados qualitativamente segundo a presença ou não de necrose, infiltrado inflamatório e fibrose hepática. Os valores obtidos pelos Softwares Mesurim®. e ImageJ® foram analisados por meio do Teste t de student e de Tukey. Para a execução das análises foi utilizado o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e todas as conclusões foram consideradas significativas ao nível de $\rho < 0,05$.

6. RESULTADOS

Os resultados obtidos serão apresentados na forma de artigo que será submetido à revista científica ***World Journal of Gastroenterology,*** ISSN 1007-9327 (print) e ISSN 2219-2840 (online), indexada na base de dados MEDLINE e possui Fator de impacto: 2,24. (Anexo II).

IMUNOPROTEÇÃO INDUZIDA PELO EXTRATO ANTIGÊNICO SOLÚVEL DE *Ascaris suum* EM UM MODELO DE INJÚRIA HEPÁTICA EXPERIMENTAL

Immunoprotection induced by the soluble antigenic extract *Ascaris suum* in a model of experimental liver injury

Wheverton Ricardo Correia do Nascimento[1,2], Roeckson Carlos Peixoto Silva[1], Nicodemos Teles de Pontes Filho[4], Valdênia Maria Oliveira Souza[1,5].

[*]Autor para correspondência:

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Laboratório de Imunopatologia Keizo Asmi-LIKA

Universidade Federal de Pernambuco.

Av. Prof. Moraes Rego, s/n. Cidade Universitária, Recife-PE-Brasil.

CEP: 50670-901.

Tel.: + 55 81 2126 8484
Fax: + 55 81 2126 8485
E-mail: valdenia.souza@gmail.com

[1] Setor de Imunologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil
[2] Departamento de Parasitologia do centro de Pesquisa Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, Recife -PE, Brasil
[3] Departamento de Medicina Tropical - Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil
[4] Departamento de Patologia - Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil
[5] Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco, Recife - PE, Brasil

RESUMO:

O extrato de vermes adultos de *Ascaris suum* (Asc) possui atividade imunossupressora em modelos vacinais, de asma alérgica e doenças auto-imunes. Neste estudo, foi verificado o efeito da administração do Asc, profilática ou terapêutica, no modelo de hepatite induzida por Com A (HAI). Para isto, camundongos BALB/c, receberam ConA, i.v., (20mg/kg corpóreo) e três grupos de animais foram formados (n=6). 1)HAI: recebeu apenas ConA; 2)Protocolo profilático HAI+Asc: tratados com Asc (1mg/mL), i.p., 30 minutos antes da indução da HAI; 3)protocolo terapêutico HAI+Asc: tratados com Asc 2 horas após indução da HAI. Como grupo controle animais receberam apenas PBS. Foram dosados transaminases e imunoglobulinas totais séricas, 8, 24 horas e 7 dias após tratamento. Cultivou-se esplenócitos estimulados com Asc e ConA. Níveis de IL-4, IL-10, IL-13 e IFN-γ dos sobrenadantes foram dosados por ELISA. Os fígados foram pesados e analisados histologicamente (hematoxilina-eosina e Tricômico de Masson). No grupo HAI, ocorreu aumento no peso do fígado, dos níveis de transaminases e Imunoglobulinas totais. Estes parâmetros foram reduzidos nas 8, 24 horas e 7º dia no grupo profilático, enquanto no terapêutico apenas no 7º dia. Em ambos os tratamento houve aumento de IL-4, IL-10 e IL-13. No grupo profilático, houve redução do infiltrado celular e aumento da fibrose hepática. A administração profilática do Asc preveniu, e a terapêutica reduziu o dano hepatocelular da lesão. Ambas estimularam a fibrose hepática a longo prazo, pela possível ação da IL-13. Desta forma, o Asc teria eficiência mais acentuada na fase inicial da doença hepática.

Palavras chave: Ascaris suum; Hepatite Auto-imune; Imunomodulação; Tratamento

ABSTRACT:

The extract of adult Ascaris suum worms (Asc) has immunosuppressive activity in vaccine models, allergic asthma and autoimmune diseases. This study evaluated the prophylactic or therapeutic effect of administration of the Asc in a mouse model of Concanavalin A (Con A)-induced hepatitis. For this, BALB/c mice received ConA, i.v., (20mg/kg) and three groups of animals were formed (n=6). 1) IAH: received only ConA; 2) AIH+Asc prophylactic: treated with Asc (1mg/mL), i.p., 30 minutes before induction of the AIH; 3) AIH+Asc therapeutic: treated with Asc two hours after induction of AIH. The control group of animals received only PBS. Were measured transaminases and total immunoglobulins, in serum, 8, 24 hours and 7 days after treatment. Was cultivated splenocytes stimulated with ConA and Asc. IL-4, IL-10, IL-13 and IFN-γ were assayed in the supernatants by ELISA. The livers were weighed and examined histologically (hematoxylin-eosin and Masson's trichrome). In the AIH group, there was an increase in liver weight, transaminase levels and total immunoglobulins. These parameters were reduced in 8, 24 hours and 7 days in the prophylactic group, while the therapeutic treatment only on day 7. In both treatments increased IL-4, IL-10 and IL-13. In the prophylactic group, decreased cellular infiltration and increased liver fibrosis. The prophylactic administration of Asc prevented, and treatment reduced the damage of hepatocellular injury. Both stimulated liver fibrosis in long term by IL-13 action. Thus, the efficiency of Asc would more pronounced in the initial stage of liver disease.

Descriptors: *Ascaris suum*, Autoimmune Hepatitis; Immunomodulation; treatment.

1. INTRODUÇÃO

A Hepatite Auto-Imune (HAI), hepatites virais, alcoólica e induzida por drogas são consideradas um grave problema de saúde, devido à progressão para a cirrose hepática e carcinoma hepático (YIN et al., 2010). A HAI é uma doença inflamatória progressiva crônica do fígado caracterizada pelo aumento das transaminases séricas, elevação de imunoglobulina G (auto-anticorpos do tipo IgG, principalmente órgão-específico) e um quadro histológico de hepatite de interface (LEMOS; SCHIAVON; FERRAZ, 2007).

O tratamento da HAI baseia-se na imunossupressão e pode culminar na remissão da doença, entretanto há relatos de falha terapêutica ou toxicidade aos fármacos utilizados. Estudos têm demonstrado que a corticoterapia isolada ou em combinação com azatriopina induz a remissão em apenas 65% dos pacientes em 3 anos de tratamento (LEMOS; SCHIAVON; FERRAZ, 2007; CJAZA, 1994; CJAZA, 2002). A progressão da HAI para o carcinoma hepatocelular em pacientes submetidos a longos períodos de tratamento é incomum. Porém, tem sido descrito casos na literatura da associação da HAI e o hepatocarcinoma, onde o processo auto-imune pode ser considerado um fator predisponente para a patogênese do câncer hepático (FEHÉR, LENGYEL, 2010; YAMAMOTO et al., 2011).

As respostas auto-imunes desencadeadas por células T auto-reativas são os principais componentes da patogênese da injúria tecidual observada na HAI (ICHIKI et al., 2005; LONGHI et al., 2010). A tolerância hepática é promovida por diversos mecanismos, entre eles a preponderância de moléculas inibitórias, abundância de citocinas imunossupressoras e a geração e expansão de células T regulatórias (CARAMBIA; HERKEL, 2010).

A investigação sobre a patogênese da HAI e novas opções terapêuticas tem sido dificultada pela falta de modelos animais reproduzindo o dano hepatocelular. O modelo ideal para a HAI deve ter um caso bem definido de início, seguido por inflamação crônica levando a fibrose. O modelo experimental de administração intravenosa de lectina, Concanvalina A (ConA), extraída de *Canavalia ensiformis*, vem permitindo o estudo da fisiopatologia das doenças hepáticas mediadas por componentes imunológicos, como a hepatite auto-imune aguda e crônica (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992; XU et al., 2009; LONGHI et al., 2010). A injúria hepática induzida por ConA ocorre de maneira dose dependente e necessita da ativação de linfócitos T auxiliares por macrófagos. Após a administração da ConA, ocorre uma insuficiência hepática aguda com aumento significativo das transaminases séricas, oito horas após sua administração, e evidenciaram-se pequenas áreas de necrose com um infiltrado difuso de leucócitos por microscopia óptica. Em seguida, foi constatada uma grave desintegração morfológica da micro-arquitetura 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.

Infecções por helmintos ou imunizações com extrato dos vermes ou seus produtos (secretados ou excretados) são capazes de alterar a indução e a função da resposta imune (BORKOW; BENTWICH, 2008; ERB, 2009; URBAN et al., 2007). 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; LIWSKI et al., 2000; SABIN et al., 1996).

Estudos realizados por MELON e colaboradores (2010) demonstraram que camundongos infectados com *Hymenolepis diminuta* exibem um aumento da produção de IL-4 e IL-10 por células esplênicas de animais que sofreram indução de colite química. A infecção pelo *H. diminuta* foi superior ao tratamento com dexametasona na prevenção da colite induzida e não resultou em deposição de colágeno.

O extrato do verme adulto de *Ascaris suum* (Asc) possui proteínas com atividades regulatórias que modulam a resposta imune para antígenos homólogos ou heterólogos, no hospedeiro. Com relação aos antígenos heterólogos, o extrato de *A. suum* demonstrou potente efeito antiinflamatório e imunosupressivo, em modelos experimentais, frente à resposta a lipolissacarídeos bacterianos e em modelos de asma alérgica (OSHIRO et al., 2006; LIMA et al, 2002). Foi demonstrado que a IL-10, induzida em resposta ao *A. suum*, está comprometida com a atividade antiinflamatória e supressão da resposta imune humoral e celular específica para antígenos heterólogos (FAQUIM-MAURO et al., 1998; SOUZA; JACYSYN; MACEDO, 2004; OSHIRO et al., 2006). SILVA e colaboradores (2006) relataram que são os componentes de alto peso molecular de *A. suum* também inibem a expressão de moléculas co-estimulatórias (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.

Entretanto, existem poucos estudos que demonstram o potencial imunorregulador do Asc em modelos de hipersensibilidade auto-imune. Rocha e colaboradores (2008) demonstraram a capacidade imunossupressora do Asc na atenuação da artrite auto-imune experimental. Quando o antígeno foi administrado por via intraperitoneal e oral, houve a diminuição da produção de mediadores inflamatórios como a IL-1β e NO. Além disso, o Asc reduziu a hipernocicepção e a sinovite de

maneira profilática e terapêutica, indicando que esta intervenção poderia ser eficaz em diversos espectros clínicos da artrite auto-imune (ROCHA et al., 2008).

Sendo assim, neste estudo, o papel anti-inflamatório e imunossupressor do Asc foi avaliado no modelo experimental da HAI. Foi observado que a administração do Asc, profilático e terapêuticamente, restabeleceu os níveis de transaminases, Ig totais, bem como restaurou o peso e reduz o nível de infiltrado inflamatório hepático. Embora, o nível de colágeno hepático da HAI, tenha sido maior na presença do Asc. Estes achados podem está associados com a presença de IL-10 e produção aumentada de IL-13 nos animais tratados co Asc.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 animais e Antígenos

Foram utilizados camundongos isogênicos machos da linhagem BALB/c (8 semanas de idade), provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami da Universidade Federal de Pernambuco (LIKA/UFPE). Os animais foram mantidos em instalações específicas isentos de agentes patogênicos e recebiam água e comida *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Centro de Ciências Biológicas/UFPE (Processo Nº 23076.027221/2010-27).

O extrato de vermes adultos de *A. suum* foi obtido a partir do protocolo utilizado Souza e colaboradores (2002). Em resumo, vermes vivos adultos de *A. suum*, foram lavados em solução salina e homogeneizadas em solução tampão salina borato (BBS) pH 8,0 num aparelho de Ultra-Turrax (Janke e Kunkel, Staufen, Alemanha) O homogenato obtido foi centrifugado a 10.000 r.p.m. durante 1 h. Em seguida, o

precipitado foi ressuspendido em 400 ml de BBS e agitado *"overnight"* a 4 °C. Esta suspensão foi centrifugada e o sobrenadante dialisado contra água destilada *"overnight"* a 4 °C e o sobrenadante obtido, após centrifugação a 10.000 rpm por 2 h, liofilizado. Para a administração nos animais, as alíquotas foram diluídas em solução tampão salina fosfato de sódio (PBS) 0,1M e pH 7.2 estéril. A lectina Concanavalina A (ConA) tipo IV foi adquirida comercialmente (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA).

2.2 Indução da injúria tecidual hepática, tratamento e formação dos grupos de estudo

A indução da injúria hepática mediada por células imunes (HAI) foi realizada segundo protocolo estabelecido por Tiegs e colaboradores (1992). A ConA foi diluída em PBS estéril na concentração de 1mg/mL e administrada por via intravenosa (v.i.) através da artéria caudal na dose de 20 mg/Kg corpóreoOs camundongos foram distribuídos em um grupo controle e grupos experimentais (6 animais por grupo). Foram realizados dois protocolos experimentais relativos ao tempo de tratamento com o Asc: **Profilático-P** (recebeu o Asc antes da indução da HAI) e **Terapêutico-T** (recebeu o Asc após a indução da HAI)**.** O tempo de administração da ConA para avaliação dos efeitos do Asc foi adaptado segundo Tiegs e colaboradores (1992) e Rocha e colaboradores (2008).

Os grupos de animais foram submetidos aos seguintes protocolos: **Profilático:** O **Controle** recebeu PBS i.p., e 30 minutos depois, PBS i.v.; **HAI:** recebeu PBS i.p., e 30 minutos depois, 20mg/Kg corpóreo de ConA i.v; **HAI + Asc:** recebeu 1mg de Asc i.p., e 30 minutos depois, ConA i.v. No protocolo **Terapêutico**: O **Controle:** recebeu PBS i.v., e 2 horas depois, PBS i.p.; **HAI:** recebeu 20mg/Kg corpóreo de ConA i.v., e 2

horas depois, PBS i.p.; e o **Grupo HAI + Asc:** recebeu ConA i.v., e 2 horas depois, 1mg de Asc i.p. (**Figura 1**).

2.3 Dosagem de Transaminases e Imunoglobulinas totais

Após a administração da ConA e do Asc, os animais foram acompanhados em relação as perdas e foram realizadas coletas de sangue 8, 24 horas e no 7º dia, para a dosagem das transaminases plasmáticas e de anticorpos. Os níveis de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) Foram obtidos através do uso de kit comercial (Bioclin, Quibasa, MG, Brasil), o qual utiliza a metodologia de Reitmamm e Frankel. A dosagem de Ig Total foi realizada através de ELISA direto do plasma dos animais.

A dosagem de imunoglobulinas totais foi feita por ELISA direto. Os plasmas obtidos foram diluídos 1:50 em PBS 0,01M/pH 7,2 (100µL/poço). Foram utilizados anticorpos de cabra específicos para Ig totais de camundongos biotinilado para detectar as Ig totais(Southern Biotechinology Associates, Inc, AL, USA). Para revelar a reação foi utilizado o conjugado enzimático de estreptoavidina-peroxidase (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) e o substrato (10mg de cromógeno OPD (Ortho-phenyldiamine, Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) em tampão citrato 0,1M e pH 5,5 e H_2O_2. a reação foi parada pela adição ácido cítrico 0,2M e as placas lidas no leitor de ELISA (OD_{450}). Os resultados foram apresentados como as médias aritméticas das Densidades ópticas (D.O.) ± desvio padrão (DP).

2.5 Cultura de células esplênicas e dosagem de citocinas

Os baços dos camundongos dos grupos HAI e HAI + Asc foram coletados 7 dias após tratamento profilático ou terapêutico com Asc e os esplenócitos foram cultivados

em meio RPMI 1640 (Cultilab, São Paulo/Brasil), acrescido de antibióticos (Penicilina e Estreptomicina 100mg/L), HEPES (1M), 2-Mercaptoetanol (0,01M) e L-glutamina (200mM) e suplementado com 10% de SBF (Soro Bovino Fetal; WL. Imunoquímica, Rio de Janeiro/Brasil), na concentração de $5x10^6$ células/mL, em duplicata, e submetidas a diferentes tratamentos: MEIO (sem estímulo), Asc (20 μg/mL) e ConA (5 ng/mL) e cultivadas por 24 e 72 horas em estufa a 37ºC e 5% de CO_2, para obtenção de sobrenadante para dosagem de citocinas.

Os níveis de citocinas foram obtidos através de ELISA *Sandwich*. Foram utilizados os anticorpos monoclonais de captura [anti-INF-γ (XMG 1.2), anti-IL4 (BVD1D11), anti-IL10 (2A5)], e os biotinilados [anti-INFγ (AN18), anti-IL4 (BVD624G2), anti-IL10 (SXC1)]. Os níveis de IL-13 foram obtidas através de Kit (R&D, Minneapolis, USA). A ligação de anticorpos biotinilados foi detectada utilizando-se o conjugado estreptoavidina marcada com peroxidase, (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA), o substrato contendo H_2O_2 e o cromógeno ABTS [2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], (Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) dissolvidos em tampão citrato 0,1 M e fosfato de sódio 0,2 M pH=5,5. A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2 M e a leitura realizada em leitor de ELISA (BIORAD), em comprimento de onda de 405 nm. As amostras foram quantificadas por comparação com curvas padrão de citocinas recombinantes purificadas.

2.6 Análise histomorfométrica.

Após a coleta de sangue no 7º dia após a indução da HAI e tratamento profilático ou terapêutico com o Asc, os camundongos foram anestesiados e submetidos à eutanásia. Em seguida, os fígados foram coletados, pesados e fixados em formalina tamponada a 10% para análise histológica. Três fragmentos do tecido hepático em

cortes transversais de três lóbulos distintos do órgão foram selecionados. Os cortes histológicos (4μm) foram obtidos em micrótomo horizontal Yamato (Japan). Os cortes destinados ao estudo histopatológico foram corados pela hematoxilina-eosina e aqueles utilizados no estudo morfométrico, foram submetidos ao Tricômico de Masson, seletiva para colágeno.

A análise histológica foi realizada através da categorização qualitativa da presença de necrose e de infiltrado inflamatório no parênquima hepático e através da contagem de linfócitos/campo utilizando-se o Software Mesurim®. O estudo morfométrico foi obtido através do Software ImageJ® através da mensuração dos histogramas da concentração de intensidade da coloração azul (específica para o colágeno). Para realização das análises foram obtidas pelo menos 20 fotografias de campos aleatórios por lâmina nos aumentos de 100 e 400 vezes.

2.7 Análise estatistica

Cada experimento foi repetido 3 vezes e todas as culturas, dosagens de transaminases, Imunoglobulinas totais e citocinas foram realizadas em duplicatas. A apresentação das variáveis mensuradas foi realizada através da média aritmética e desvio padrão. O peso do fígado foi analisado por meio do Teste t de student e de Tukey. Os resultados das dosagens de citocinas, anticorpos e transaminases foram submetidos a uma Análise de variância (ANOVA) para dados paramétricos (Two-way).

Os resultados da análise histomorfométrica foram categorizados qualitativamente segundo a presença ou não de necrose, infiltrado inflamatório e fibrose hepática. Os valores obtidos pelos Softwares Mesurim®. e ImageJ® foram analisados por meio do Teste t de student e de Tukey. Para a execução das análises foi utilizado o

software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e todas as conclusões foram consideradas significativas ao nível de $\rho < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 O tratamento profilático e terapêutico do Asc atenuou o dano hepatocelular induzido pela injúria mediada por células imunes

A HAI, induzida através da administração da ConA, provocou dano hepatocelular observado pelo aumento significativo no peso do fígado, transaminases e imunoglobulinas totais séricas, em relação ao grupo controle, durante a cinética realizada (**Figura 1**). Com relação aos animais que receberam Asc, o tratamento profilático e o terapêutico restauram o peso do fígado, a níveis semelhantes ao grupo controle, quando analisado no sétimo dia após indução da HAI (**Fig. 1A e 1E**). Pôde ser observado que ambos os protocolos de tratamento com Asc, também reduziram os níveis de imunoglobulinas totais, aos níveis do grupo controle, nas 24 horas e 7 dias da indução da HAI (**Fig. 1B e 1F**). Com relação às transaminases ALT e AST, o tratamento profilático com Asc levou uma diminuição dos níveis destas enzimas, nivelando-os aos níveis do grupo controle, durante toda a cinética (**Fig 1C e 1D**). O grupo HAI+Asc quando tratado terapeuticamente apresentou uma diminuição gradativa dos níveis destas enzimas, com redução parcial nas 24 horas e total no 7º dia após indução da HAI (**Fig 1G e 1H**).

3.2 Curva de sobrevivência dos animais com HAI submetidos aos tratamentos terapêutico e profilático com Asc

Foi realizada uma curva de sobrevida dos animais que receberam o tratamento terapêutico e profilático com o Asc. Embora seja observada diferença significativa apenas para o grupo HAI (**Figura 2**), em relação ao grupo controle, ocorrendo perda de 61,5% dos animais não tratados e de 33% dos camundongos que receberam Asc de maneira terapêutica. A sobrevida dos animais com HAI submetidos ao tratamento profilático foi de 100%.

3.3 Imunomodulação induzida pelo tratamento profilático e terapêutico com o Asc frente à injúria mediada por células imunes

A produção de citocinas por células esplênicas dos grupos de estudo foi avaliada, no sétimo dia, após os tratamentos profilático e terapêutico *in vivo* com Asc (**Figura 3**). No tratamento profilático, sob estímulo *in vitro* com ConA, pôde ser observado que a produção de IFN-γ foi semelhante nos animais do grupo HAI e HAI+Asc (**Fig. 3A**). Do contrário, os níveis de IL-4, IL-10 e IL-13 foram significativamente maiores no sobrenadante de células do grupo HAI + Asc, em relação aos níveis do grupo HAI (**Fig. 3B, 3C, 3D)**. Frente o estímulo *in vitro* com Asc, foram detectados níveis de IL-10 apenas nos animais HAI que receberam previamente o Asc (**Fig. 3C**). Com relação aos níveis de IL-13, estes foram significativamente maiores no sobrenadante de células do grupo HAI+Asc, em relação aos níveis do grupo HAI. Foram detectados níveis desta citocina no sobrenadante de células dos grupos na ausência de estímulo in vitro, sendo a produção do grupo HAI+Asc significativamente maior (**Fig. 3D).**

O perfil de produção de citocinas nos grupos tratados com Asc, de maneira terapêutica, em resposta *in vitro* com ConA ou Asc demonstrou uma maior produção de IL-4, IL-10 e IL-13 em relação aos níveis detectados no grupo HAI (**Fig 3F, 3G, 3H**). Com relação aos níveis de IFN-γ, frente ao estímulo com Con A, houve uma produção significativamente menor nos níveis desta citocina no grupo HAI+Asc, em relação ao HAI. Em resposta ao estímulo com Asc, pôde ser observada produção de IFN-γ no grupo HAI+Asc (**Fig. 3E**).

3.4 Análise histomorfometrica do fígado dos animais submetidos à HAI e tratados com Asc

Os cortes histológicos do fígado dos animais submetidos à HAI foram analisados no 7º dia, após indução da HAI, e corados com HE e TM. Desta forma foi possível identificar um intenso dano hepatocelular ocasionado por infiltrado inflamatório e necrose, com predomínio de linfócitos e deposição de fibras colágenas (**Fig 4B e 4E**). O tratamento profilático com o Asc ocasionou uma diminuição do infiltrado inflamatório e da necrose hepática (**Fig. 4C**), acompanhado de um aumento da fibrose (**Fig 4F**) nos animais HAI+Asc, em relação aos animais HAI. Este mesmo perfil histológico foi observado no fígado dos animais submetidos ao tratamento terapêutico com Asc (dados não mostrados).

A análise histomorfométrica, do tratamento profilático, foi realizada por meio da mensuração de colágeno e da contagem de linfócitos/campo. Foi possível verificar um aumento significativo de deposição de colágeno e do número de linfócitos no grupo HAI e no HAI+Asc, em relação ao grupo controle. Contudo, no grupo HAI+Asc a deposição de colágeno é mais acentuada que a observada no grupo HAI. Com relação

ao número de linfócitos, a administração do Asc reduziu significativamente o infiltrado em relação ao HAI (**Tabela 1**).

4. DISCUSSÃO

Neste trabalho, foi demonstrado que a administração do extrato bruto de *A. suum*, em uma única dose, seja de maneira profilática ou terapêutica atenuou a injúria hepática, mediada por células imunes, presente num modelo experimental, que visa mimetizar as alterações encontradas na HAI humana (TIEGS et al., 1992). Os níveis de transaminases e imunoglobulinas totais foram restaurados, bem como houve uma diminuição do infiltrado inflamatório. Ao mesmo tempo, o Asc exacerbou a produção de colágeno hepático, bem como a produção de IL-4, IL-10 e IL-13.

O extrato total do *A. suum* apresenta proteínas e glicoproteínas que induzem efeitos pró- e antiinflamatórios (ARAÚJO et al., 2008). A IL-10 e TGF-β induzida pela administração do Asc ou frações glicoproteícas, em diferentes modelos experimentais, foi relacionada com a supressão da produção de citocinas pró-inflamatórias, influxo neutrofílico e IFN-γ (LIMA et al., 2002; OSHIRO et al., 2004; OSHIRO et al., 2006). No nosso estudo, a presença do Asc nos animais submetidos à HAI, induziu uma maior produção de IL-10. É sabido do efeito anti-proliferativo da IL-10 (YANG et al., 2009), que pode minimizar a proliferação dos linfócitos nos sinusóides hepáticos prevenindo a agressão hepatocelular e, portanto, restaurar os níveis de transaminases. Estudos tem demonstrado que no modelo HAI-ConA ocorre elevação precoce de IFN-γ, IL-2, IL-4, IL-6 e TNF-α, e este aumento pode levar a ativação policlonal de linfócitos B (GOVE, et al., 2009; TAKAHASHI et al., 2011; MILLER et al., 2009). É possível que a IL-10 induzida pela Asc, esteja modulando negativamente a proliferação de linfócitos e, consequentemente, reduza os níveis de imunoglobulinas totais (WANG et al., 2012).

A geração de Treg, no fígado e sangue periférico, foi evidenciada durante a ascaridíase, reforçando o potencial imunossupressor do helminto e seus antígenos (CARAMBIA; HERKEL, 2010; DAWSON et al., 2009; MATERA et al., 2008). A função regulatória das Treg é essencial para a manutenção da auto-tolerância, pois a diminuição da frequência dessas células no fígado tem sido associada à ocorrência da HAI (JONULEIT; SCHMITT, 2003; LONGHI et al., 2004). Componentes do Asc poderiam atuar diretamente no fígado ou em órgãos linfóides induzindo ou restaurando a resposta de células Treg, com produção de IL-10, e consequente melhora de marcadores teciduais e sorológicos do dano hepático.

Estudos realizados com o modelo de injúria hepática induzida por ConA tem relacionado a melhora da HAI com a redução dos níveis de IFN-γ. Yin e colaboradores (2010) relataram o efeito protetor do Lactoferrina, que foi atribuído à inibição da ativação de células T e, portanto, produção de IFN-γ, bem como IL-4 por hepatócitos e células NKT (YIN et al., 2010). Da mesma forma, o estudo de YAMASHITA et al., 2011 relacionou o efeito protetor da apolipoprotein A-II com a redução de IFN-γ, do infiltrado inflamatório e do dano hepatocelular, nas primeiras 24 horas, após indução da HAI-ConA.

Embora tenha sido observada a redução de IFN-γ nos animais HAI+Asc, submetidos ao protocolo terapêutico, ocorreu produção desta citocina frente ao estímulo com Asc. No tratamento profilático, não foi observada diferença nos níveis desta citocina, entretanto houve prevenção do dano hepático. Portanto, o mecanismo de melhora devido à presença do Asc não seria depende da inibição da produção de IFN-γ. Como avaliamos a produção de citocinas ao nível sistêmico e tardiamente (7º dia), seria necessário investigar a ação do Asc frente a outros fatores, como IL-6, TNF-α e IFN-γ em um tempo mais precoce da cinética.

Ao mesmo tempo, o Asc induz uma resposta Th2 predominante (FERREIRA et al., 1995), corroborado aqui pelo aumento da IL-4 e IL-13. Esta última citocina possui relação com a fibrose, pois foi observada elevação dos seus níveis nas doenças fibroproliferativas e por exercer efeitos reguladores na expressão no pró-colágeno tipo I (WYNN, 2003; WYNN, 2004; WYNN, 2008). A produção do colágeno presente no processo fibrogênico, no perfil de resposta tipo Th2, é dependente de macrófagos alternativamente ativados (MAAs). Os MAAs atuam no processo de reparação tecidual com participação da IL-4 e IL-13 e estimulam a ativação da enzima arginase envolvida na indução da fibrose em diferentes modelos com helmintos (SUGAWARA et al., 2011; WILSON, et al., 2004).

Os nossos resultados divergem dos diferentes estudos em humanos, que já utilizaram a administração de ovos ou infecção com helmintos. Nestes estudos, foi relatada a melhora clínica de doenças auto-imunes humanas sem a observação de reações adversas (BENZEL et al., 2011; MORTIMER et al., 2006). Ao utilizar diferentes frações do Asc em um modelo CFA+OVA experimental , Faquim-Mauro e colaboradores (1999) demonstraram que a ação imunogênica Th2 da fração de baixo peso molecular (PIII) foi suprimida pela fração de alto peso molecular, imunossupressora (PI). Da mesma forma, Itami e colaboradores (2005), no modelo de asma induzida por PIII, descreveram a ação supressora do PI. Então, é possível que a utilização de componentes com atividade antiinflamatória, previamente purificados do Asc, poderia restaurar o dano hepático, e ao mesmo tempo, evitar a fibrose observada quando utilizamos extrato total.

Durante o processo inflamatório agudo, induzido por ConA, ocorre intenso dano hepático e a consequencia é o surgimento de um processo de reparação para compensar a destruição tecidual (LONGHI, et al., 2010). Nós acreditamos que no grupo HAI+Asc

a fibrose foi exacerbada pelo Asc, devido à produção acentuada de IL-13. Atualmente, os níveis de IL-13 estão sendo avaliados, a longo prazo, a fim de relacionar com os níveis de fibrose e possível disfunção hepática nos animais tratados com o Asc. Desta forma, será possível comprovar se o Asc tem sua eficiência apenas na fase mais inicial da doença hepática.

Em conclusão, a administração profilática e terapêutica do Asc, foi capaz de reduzir o dano hepatocelular provocado pela ConA no modelo de injúria hepática mediada por células imunes. Apesar da proteção no início da lesão, possivelmente dependente da IL-10, a fibrose hepática foi estimulada em longo prazo. Sendo assim, este trabalho ressalta o potencial do *Ascaris* em atenuar danos hepáticos agudos e traz à tona a necessidade do uso de frações ou proteínas recombinantes e a avaliação dos seus efeitos imunomodulatórios na indução da Hepatite Auto-imune.

REFERÊNCIAS

Araújo CA, Perini A, Martins MA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein from *Ascaris suum*, modulates allergic inflammation via IL-10 and IFN-gamma, but not IL-12. Cytokine. 2008; 44(3):335-41. 2008.

Benzel F, Erdur H, Kohler S, Frentsch M, Thiel A, Harms L, Wandinger KP, Rosche B. Immune monitoring of Trichuris suis egg therapy in multiple sclerosis patients. *J Helminthol*. 2011 15:1-9.

Borkow G, Bentwich Z. Chronic parasite infections cause immune changes that could affect successful vaccination. *Trends Parasitol.* 2008. 24(6): 243-245.

Erb K J. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? *Trends Immunol*. 2009; 30(2):75-82.

Carambia A, Herkel J. CD4 T cells in hepatic immune tolerance. *J Autoimmun*. 2010;34(1)23-8.

Cooper PJ, Chico ME, Sandoval C, Espinel I, Guevara A, Kennedy MW, et al. Human infection with Ascaris lumbricoides is associated with a polarized cytokine response. *J Infect Dis*. 2000; 182(4):1207-13.

Czaja AJ. Autoimmune liver disease. *Curr Opin Gastroenterol*. 2002;18(3):334-44.

Czaja AJ, Nishioka M, Morshed SA, Hachiya T. Patterns of nuclear immunofluorescence and reactivities to recombinant nuclear antigens inautoimmune hepatitis. *Gastro*. 1994; 107(1):200-7.

Elias D, Wolday D, Akuffo H, Petros B, Bronner U, Britton S. Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacille Calmette–Guerin (BCG) vaccination. *Clin Exp Immunol*. 2001; 123(2):219-25.

Faquim-Mauro, EL, Macedo, MS. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. *Clin Exp Immunol***,** 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.

Fehér, J.; Lengyel, G. Hepatocellular carcinoma: occurrence, risk factors, biomarkers. *Orv Hetil***, v.** 151, n. 23, p. 933-940, 2010.

Finney CA, Taylor MD, Wilson MS, Maizels RM, Expansion and activation of CD4+CD25+ regulatory T cells in Heligmosomoides polygyrus infection, *Eur J Immunol*. 2007 Jul;37(7):1874-86.

Ichiki Y, Aoki CA, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. T cell immunity in autoimmune hepatitis. *Autoimmun Rev*. 2005; 4(5):315-21.

Itami DM, Oshiro TM, Araujo CA, et al. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. *Clin Exp Allergy*, 2005; 35(7):873-9,.

Lemos, LVB, Schiavon, JLN, Ferraz MLG. Hepatite Auto-imune. *Prat hosp*. 2007; 9(52): 75-80.

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. *Clin Exp Allergy*, 2002; 32(11):1659-1666.

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*. 2000; 69(9):1912-22.

Longhi MS, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. J Autoimmun. 2010; 34(1): 7-14.

Melon A, Wang A, Phan V, MCKAY DM. Infection with Hymenolepis diminuta is more effective than daily corticosteroids in blcking chemically induced colitis in mice. *J Biomed Biotechnol*.; 2010:384523, 2010

Mortimer K, Brown A, Feary J, Jagger C, Lewis S, Antoniak M, Pritchard D, Britton J. Dose-ranging study for trials of therapeutic infection with Necator americanus in humans. *Am J Trop Med Hyg*. 2006 Nov;75(5):914-20.

Oshiro TM, Rafael A, Enobe CS, et al. Comparison of different monoclonal antibodies against immunosuppressive proteins of *Ascaris suum*. *Braz J Med Biol Res***.** 2004; 37:223-6.

Oshiro TM, Enobe CS, Araújo CA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. Immunol Cell Biol. 2006; 84(2):138-44.

Rocha FA, Leite AK, Pompeu MM, Cunha TM, Verri WA Jr, Soares FM, et al. Protective Effect of an Extract from *Ascaris suum* in Experimental Arthritis Models. Infect. immun. 2008; 76(6):2736-45.

Ferreira AP, Faquim ES, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. Cell Immunol. 1995; 162(2):202-10.

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.* 1996; 173(1):269-72.

Silva SR, Jacysyn JF, Macedo MS, Faquim-mauro EL. 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*, v. 36, p. 3227-37, 2006.

Souza VM, Faquim-Mauro EL, Macedo MS. Extracts of Ascaris suum egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. Braz J Med Biol Res. 2002; 35(1):81-9

Souza VM, Jacysyn JF, Macedo MS. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from Ascaris suum. Cytokine. 2004; 28(2):92-100.

Sugawara Y, Azuma N, Onodera S, Tsunoka Y, Morimoto M. Th2 immune responses and alternatively activated macrophages (AAMacs) in helminth infection inaged mice. *J Vet Med Sci*. 2011;73(4):511-6.

Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T Cell-dependent Experimental Liver Injury in Mice Inducible by Concanavalin A. J Clin Invest. 1992; 90(1):196-203

Gove ME, Rhodes DH, Pini M, van Baal JW, Sennello JA, Fayad R, Cabay RJ, Myers MG, Fantuzzi G. Role of leptin receptor-induced STAT3 signaling in modulation of intestinal and hepatic inflammation in mice. *J Leukoc Biol* 2009; **85**: 491-496

Takahashi K, Murakami M, Kikuchi H, Oshima Y, Kubohara Y. Derivatives of Dictyostelium differentiation-inducing factors promote mitogen-activated IL-2 production via AP-1 in Jurkat cells. *Life Sci* 2011; **88**: 480-485

Miller ML, Sun Y, Fu YX. Cutting edge: B and T lymphocyte attenuator signaling on NKT cells inhibits cytokine release and tissue injury in early immune responses. *J Immunol* 2009; **183**: 32-36

Urban, JFJr. Steenhard, NR. Solano-aguilar, GI.; et al. Infection with parasitic nematodes confounds vaccination efficacy. *Vet Parasitol***,** v. 148, n. 1, p. 14-20, 2007.

Wang HX, Liu M, Weng SY, Li JJ, Xie C, He HL, Guan W, Yuan YS, Gao J. Immune mechanisms of Concanavalin A model of autoimmune hepatitis. *World J Gastroenterol*. 2012 Jan 14;18(2):119-25.

Yang SH, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, Nam HY, Kim YH, Kim B, Park CG. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. Exp Mol Med. 2009 31;41(5):315-24.

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.

Yamamoto K, Hiura M, Tabaru A, Honma Y, Narita R, Abe S, Shimajiri S, Okamoto K, Yamaguchi K, Harada M. Rapid progression of hepatocellular carcinoma in a patient with autoimmune hepatitis. *Intern Med*. 2011;50(13):1409-13.

Yin H, Cheng L, Agarwal C, Agarwal R, Ju C. Lactoferrin protects against Concanavalin A-induced liver injury in mice. *Liver Int*. 2010;30(4):623-32.

Wilson MS, Elnekave E, Mentink-Kane MM, Hodges MG, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson RW, Kamanaka M, Flavell RA, Keane-Myers A, Cheever AW,Wynn TA. IL-13Ralpha2 and IL-10 coordinately suppress airway inflammation, airway-hyperreactivity, andfibrosis in mice. *J Clin Invest.* 2007;117(10):2941-51.

Wilson MS, Mentink-Kane MM, Pesce JT, Ramalingam TR, Thompson R, Wynn TA. Immunopathology of schistosomiasis. *Immunol Cell Biol*. 2007;85(2):148-54.

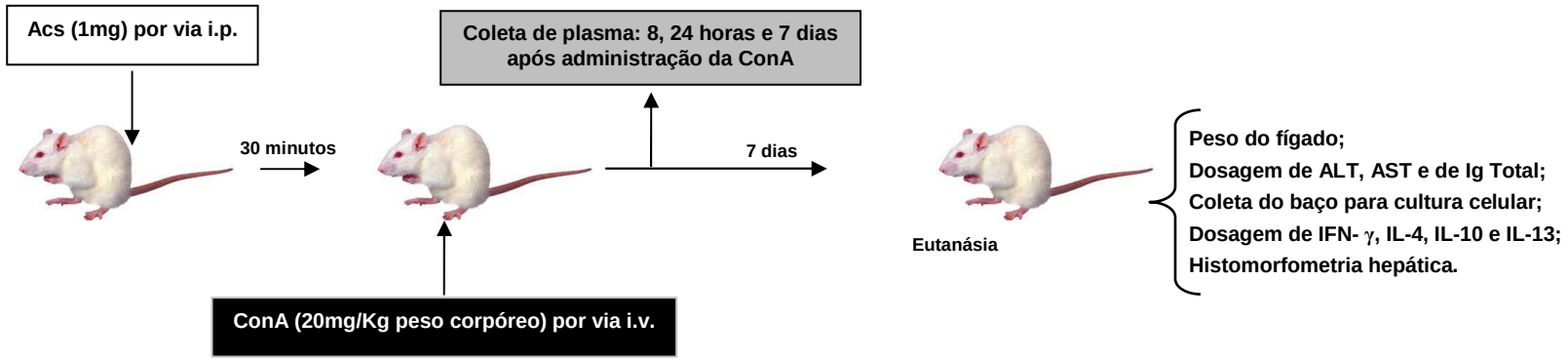
Wynn TA. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol*. 2008

Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol*. 2004; 4(8):583-94

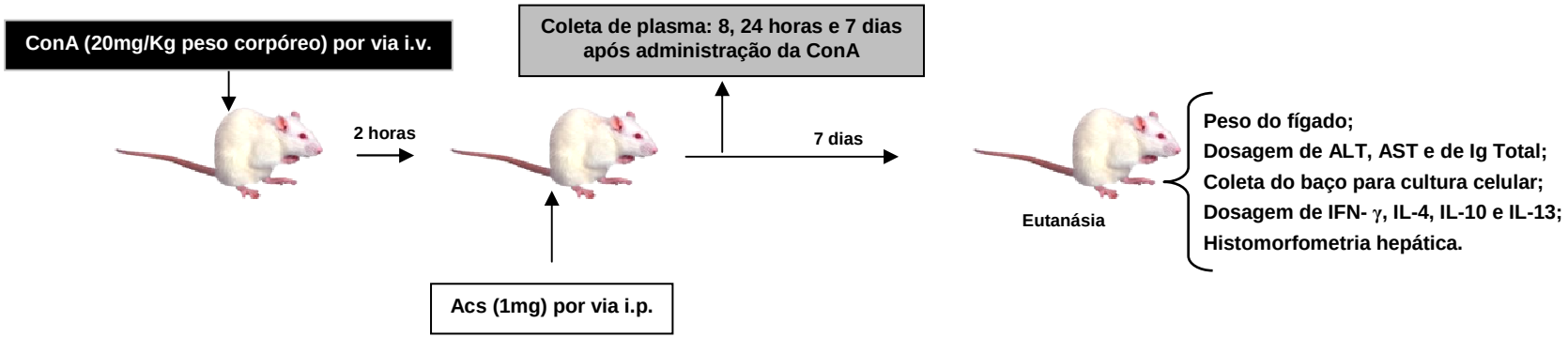
Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:425-56.

Yamashita J, Iwamura C, Sasaki T, Mitsumori K, Ohshima K, Hada K, Hara N, Takahashi M, Kaneshiro Y, Tanaka H, Kaneko K, Nakayama T. Apolipoprotein A-II suppressed concanavalin A-induced hepatitis via the inhibition of CD4 T cell function. *J Immunol* 2011; 186: 3410-3420.

Protocolo Profilático



Protocolo Terapêutico



Esquema 1: Procedimentos experimentais realizados para avaliar o efeito profilático e terapêutico do Asc frente a indução da HAI.

Figuras

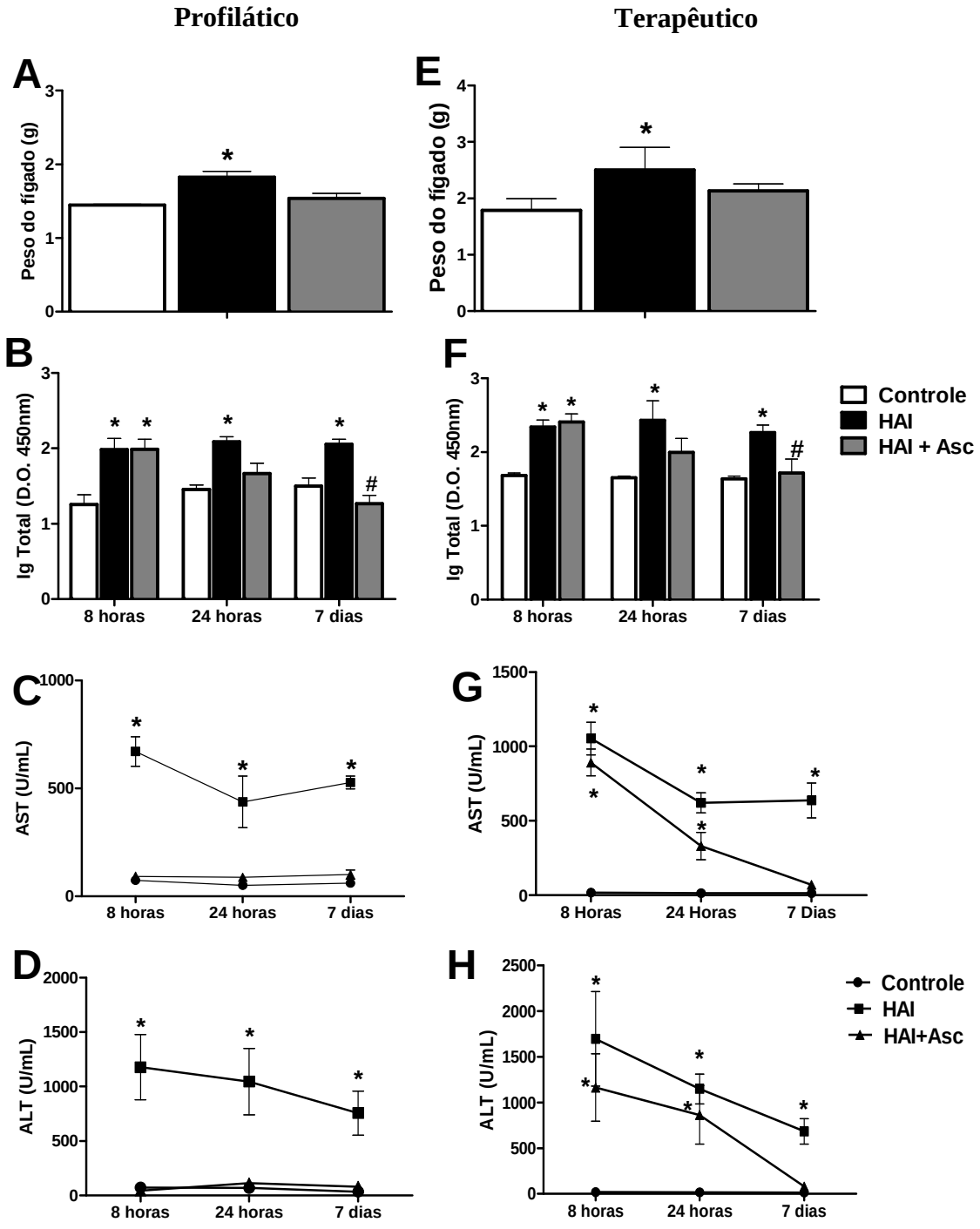


Figura 1: Peso do fígado profilático (**A**) e terapêutico (**E**). Níveis de Imunoglobulinas totais profilático (**B**) e terapêutico (**F**) 8h, 24h e 7 dias após tratamento. Níveis de AST profilático (**C**) e terapêutico (**G**) e ALT profilático (**D**) e terapêutico (**H**) 8h, 24h e 7 dias após tratamento.***** diferença significativa com $\rho < 0,05$ em relação ao Controle. # diferença significativa com $\rho < 0,05$ em relação ao HAI.

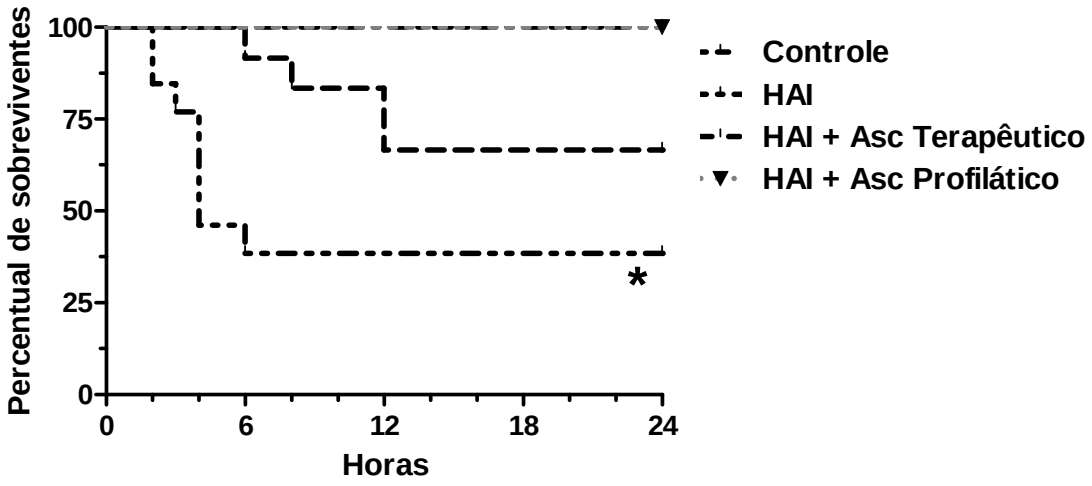


Figura 2: Curva de sobrevida. Após a indução da HAI e tratamento com o Asc de maneira terapêutica. * diferença significativa com $\rho < 0,05$ em relação ao grupo controle.

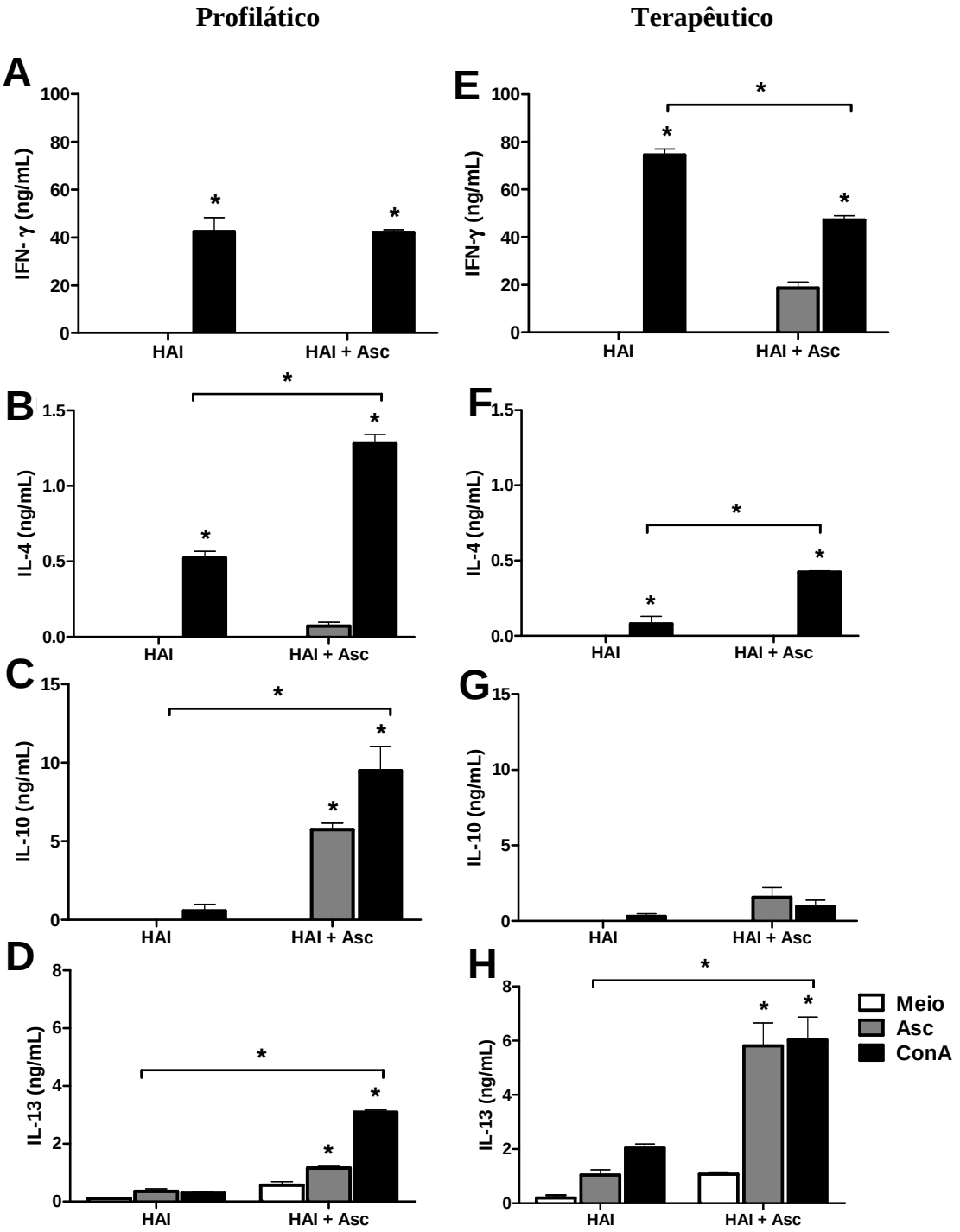


Figura 3: Níveis de citocinas produzida por esplenócitos no sétimo dia após tratamento com o Asc. Níveis da produção de IFN- γ profilático (**A**) e terapêutico (**E**). IL-4 profilático (**B**) e terapêutico (**F**). IL-10 profilático (**C**) e terapêutico (**G**). IL-13 profilático (**D**) e terapêutico (**H**). * diferença significativa com $\rho < 0,05$ em relação aos controles.

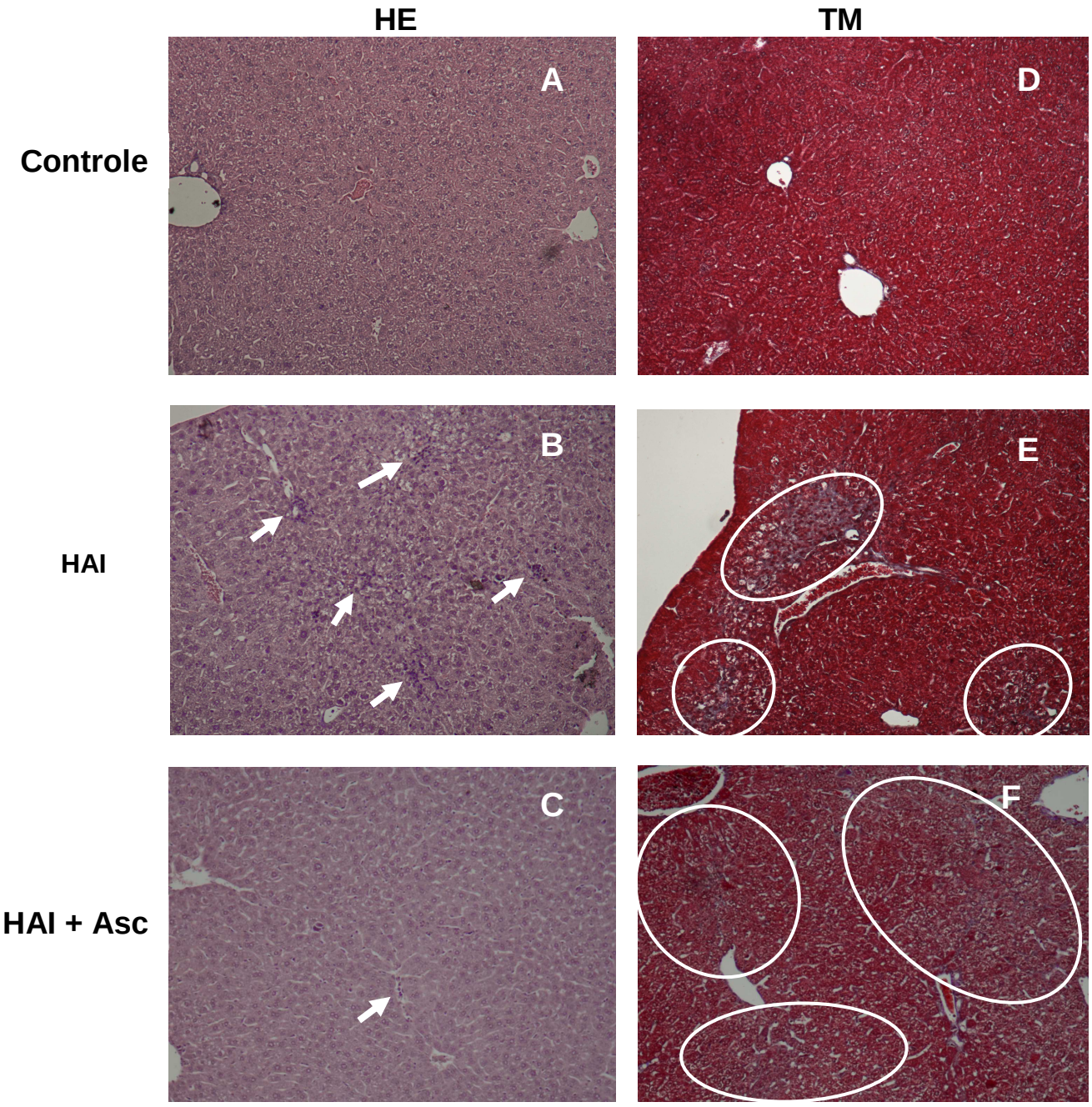


Figura 4: Histomorfometria do tratamento profilático com o Asc. Imagens representativas de cortes dos grupos controle (**A** e **D**), HAI (**B** e **E**) e HAI + Asc (**C** e **F**). Cortes corados com HE e aumento de 100x (**A, B e C**); Cortes submetidos à coloração tricrômico de manson e aumento de 100x (**D, E e F**). Infiltrado inflamatório (seta branca – **Fig. B** e **C**) e fibrose (círculo branco – **Fig. E** e **F**).

Tabela 1: Histomorfometria dos animais do grupo controle, HAI e HAI + Asc corados com HE ou Tricrômico de Manson e analisados através de microscopia óptica.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	MORFOMETRIA		HISTOLOGIA		
	Colágeno (±DP)*	SEM	Necrose	linfócitos/campo (±DP)#	SEM
Controle	51,70 (±9,702)	1,128	Ausente	154,1 (±28,11)	7,259
HAI	69,29 (±23,45) §	2,672	Presente	436,4 (±32,18) §	8,310
HAI +Asc	91,33 (±20,72) § **	2,393	Presente	315,2 (±50,62) § **	13,07

***** Média ± desvio padrão da proporção de colágeno obtido a partir do software ImageJ. # Média ± desvio padrão da contagem de linfócitos por campo dos diferentes grupos obtido através do software Mesurim. § Diferença significativa com $\rho < 0,05$ em relação ao controle.** Diferença significativa com $\rho < 0,05$ em relação ao HAI.

7. CONCLUSÕES

- A administração profilática e terapêutica do Extrato bruto de *Ascaris suum* reduziu o peso do fígado dos animais submetidos à injúria hepática induzida por células imunes a níveis normais;

- O tratamento profilático com o Extrato bruto de *Ascaris suum* preveniu a elevação das transaminases na injúria hepática induzida por células imunes. o tratamento terapêutico reduziu os níveis de transaminases no sétimo dia;

- A administração profilática e terapêutica do Asc levou a redução dos níveis de Imunoglobulinas séricas totais;

- Há um processo de imunomodulação com predominância do perfil Th2 com aumento de IL-4, IL-10 e IL-13 nos grupos HAI+Asc dos tratamentos profilático e terapêutico;

- Ocorreu aumento da fibrose hepática nos animais submetidos à HAI e tratados profilaticamente, que pode está relacionada ao aumento da IL-13 pela presença do Asc.

8. REFERÊNCIAS

Anand S, Wang P, Yoshimura K, Choi IH, Hilliard A, Chen YH, et al. Essential role of TNF family molecule LIGHT as a cytokine in the pathogenesis of hepatitis. J Clin Invest. 2006; 116(4):1045-51.

Araújo JV, Braga FR, Silva AR, Araujo JM, Tavela AO. In vitro evaluation of the effect of the nematophagous fungi Duddingtonia flagrans, Monacrosporium sinense, and Pochonia chlamydosporia on Ascaris suum eggs. Parasitol Res. 2008; 102(4):787-90.

Barriga OO. Immunomodulation by nematodes: a review. Vet. Parasitol. 1984; 14(3-4):299-320.

Buxbaum J, Qian P, Khuu C, Shneider BL, Daikh DI, Gershwin ME, et al. Novel model of antigen-specific induction of bile duct injury. Gastroenterology 2006; 131(6):1899-906.

Borkow G, Bentwich Z. Chronic parasite infections cause immune changes that could affect successful vaccination. Trends Parasitol. 2008; 24(6):243-5.

Calne RY, Sells RA, Pena RJ, Davis DR, Millard PR, Herbertson PM, et al. Induction of immunological tolerance by porcine liver allografts. Nature. 1969; 223(5205):472-6.

Cardoso-Silva CD, Melo-Júnior MR, Patu VJRM, Araújo-Filho JLS, Machado MCFPM, Pontes-Filho NT. A exposição crônica ao álcool e a desnutrição interferem no desenvolvimento do fígado durante o período perinatal? Rev Bras Nutr Clin 2007; 22(3):220-5.

Chen Y, Wei H, Sun R, Dong Z, Zhang J, Tian Z. Increased Susceptibility to Liver Injury in Hepatitis B Virus Transgenic Mice Involves NKG2D-Ligand Interaction and Natural Killer Cells. Hepatology. 2007; 46(3):706-15.

Carambia A, Herkel J. CD4 T cells in hepatic immune tolerance. J Autoimmun. 2010; 34(1)23-8.

Chen CH, Kuo LM, Chang Y, Wu W, Goldbach C, Ross MA, et al. In vivo immune modulatory activity of hepatic stellate cells in mice. Hepatology. 2006; 44(5):1171-81.

Cooper PJ, Chico ME, Sandoval C, Espinel I, Guevara A, Kennedy MW, et al. Human infection with Ascaris lumbricoides is associated with a polarized cytokine response. J Infect Dis. 2000; 182(4):1207-13.

Crispe IN. Hepatic T cells and liver tolerance. Nat. Rev. Immunol. 2003; 3(1):51-62.

Dunne DW, Cooke A. A worm's eye view of the immune system: consequences for evolution of human autoimmune diseases. Nat. Rev. Immunol. 2005; 5(5):420-6.

Elias D, Wolday D, Akuffo H, Petros B, Bronner U, Britton S. Effect of deworming on human T cell responses to mycobacterial antigens in helminth-exposed individuals before and after bacille Calmette–Guerin (BCG) vaccination. Clin Exp Immunol. 2001; 123(2):219-25.

Erb K J. Can helminths or helminth-derived products be used in humans to prevent or treat allergic diseases? Trends Immunol. 2009; 30(2):75-82.

Espinoza-Jiménez A, Rivera-Montoya I, Cárdenas-Arreola R, Morán L, Terrazas LI. Taenia crassiceps Infection attenuates multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. J biomed biotechnol. 2010; 2010:850541.

Faquim-Mauro EL, Macedo MS. The immunosuppressive activity of *Ascaris suum* is due to high molecular weight components. Clin Exp Immunol. 1998; 114(2):245-51.

Ferreira AP, Faquim ES, Abrahamsohn IA, Macedo MS. Immunization with *Ascaris suum* extract impairs T cell functions in mice. Cell Immunol. 1995; 162(2):202-10.

Homberg JC, Abuaf N, Bernard O, Islam S, Alvarez F, Khalil SH, et al. Chronic active hepatitis associated with antiliver/kidney microsome antibody type 1: a second type of "autoimmune" hepatitis. Hepatology. 1987; 7(6):1333-9.

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. 2009; 39(2):191-200.

Ichiki Y, Aoki CA, Bowlus CL, Shimoda S, Ishibashi H, Gershwin ME. T cell immunity in autoimmune hepatitis. Autoimmun Rev. 2005; 4(5):315-21.

Itami DM, Oshiro TM, Araujo CA, Perini A, Martins MA, Macedo MS. Modulation of murine experimental asthma by *Ascaris suum* components. Clin Exp Allergy. 2005; 35(7):873-9.

Junqueira LCU, Bignolos G, Brentani RR. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue section. Histochemical Journal, Londres, 1979; 11: 447-55.

Knolle PA, Gerken G. Local control of the immune response in the liver. Immunol Rev. 2000; 174:21-34.

Lemos, LVB, Schiavon, JLN, Ferraz MLG. Hepatite Auto-imune. Prat hosp. 2007; 9(52): 75-80.

Lima C, Perini A, Garcia ML, Martins MA, Teixeira MM, Macedo MS. Eosinophilic inflammation and airway hyper-responsiveness are profoundly inhibited by a helminth (Ascaris suum) extract in a murine model of asthma. Clin Exp Allergy. 2002; 32(11):1659-66.

Limmer A, Ohl J, Kurts C, Ljunggren HG, Reiss Y, Groettrup M, et al. Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8+ T cells results in antigen-specific T-cell tolerance. Nat Med. 2000; 6(12):1348-54.

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. 2000; 69(9):1912-22.

Longhi MS, Ma Y, Mieli-Vergani G, Vergani D. Aetiopathogenesis of autoimmune hepatitis. J Autoimmun. 2010; 34(1): 7-14.

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. 1985; 78(4):449-51.

Maggiore G, Veber F, Bernard O, Hadchouel M, Homberg JC, Alvarez F, et al. Autoimmune hepatitis associated with anti-actin antibodies in children and adolescents. J Pediatr Gastroenterol Nutr. 1993; 17(4):376-81.

Manns MP, Czaja AJ, Gorham JD, Krawitt EL, Mieli-Vergani G, Vergani D, et al. Diagnosis and management of autoimmune hepatitis. Hepatology. 2010 Jun;51(6):2193-213.

Martini E, Abuaf N, Cavalli F, Durand V, Johanet C, Homberg JC. Antibody to liver cytosol (anti-LC1) in patients with autoimmune chronic active hepatitis type 2. Hepatology. 1988; 8(6):1662-6.

Matera G, Giancotti A, Scalise S, Pulicari MC, Maselli R, Piizzi C, et al. *Ascaris lumbricoides*-induced suppression of total and specific IgE responses in atopic subjects is interleukin 10-independent and associated with an increase of CD25(+) cells. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008; 62(3):280-6.

Medina J, García-Buey L, Moreno-Otero R. Review article: immunopathogenetic and therapeutic aspects of autoimmune hepatitis. Aliment Pharmacol Ther. 2003; 17(1):1-16.

Melon A, Wang A, Phan V, McKay DM. Infection with Hymenolepis diminuta is more effective than daily corticosteroids in blcking chemically induced colitis in mice. J Biomed Biotechnol. 2010; 2010:384523.

Nemeth E, Baird AW, O'Farrelly C. Microanatomy of the liver immune system. Semin Immunopathol. 2009; 31(3):333-343.

Osada Y, Kanazawa T. Parasitic helminths: new weapons against immunological disorders. J Biomed Biotechnol. 2010; 2010:743758.

Oshiro TM, Enobe CS, Araújo CA, Macedo MS, Macedo-Soares MF. PAS-1, a protein affinity purified from *Ascaris suum* worms, maintains the ability to modulate the immune response to a bystander antigen. Immunol Cell Biol. 2006; 84(2):138-44.

Oshiro TM, Macedo MS, Macedo-Soares MF. Anti-inflammatory activity of PAS-1, a protein component of *Ascaris suum*. Inflamm Res. 2005; 54(1):17-21.

Oshiro TM, Rafael A, Enobe CS, Fernandes I, Macedo-Soares MF. Comparison of different monoclonal antibodies against immunosuppressive proteins of *Ascaris suum*. Braz J Med Biol Res. 2004; 37(2):223-6.

Park SZ, Nagorney DM, Czaja AJ. Hepatocellular carcinoma in autoimmune hepatitis. Dig Dis Sci. 2000; 45(10):1944-8.

Rocha FA, Leite AK, Pompeu MM, Cunha TM, Verri WA Jr, Soares FM, et al. Protective Effect of an Extract from *Ascaris suum* in Experimental Arthritis Models. Infect. immun. 2008; 76(6):2736-45.

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. 1996; 173(1):269-72.

Sakakibara A, Baba K, Niwa S, Yagi T, Wakayama H, Yoshida K, et al. Visceral larva migrans due to *Ascaris suum* which presented with eosinophilic pneumonia and multiple intra-hepatic lesions with severe eosinophil infiltration - outbreak in a Japanese area other than Kyushu. Intern Med. 2002; 41(7):574-9.

Silva SR, Jacysyn JF, Macedo MS, Faquim-Mauro EL. 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. 2006; 36(12):3227-37.

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. 1986; 79(2):196-201.

Soares MF, Macedo MS, Mota I. Suppressive effect of an *Ascaris suum* extract on IgE and IgG antibody responses in mice. Braz J Med Biol Res. 1987; 20(2):203-11.

Soares MF, Oliveira EB, Mota I, Macedo MS. Suppression of IgE antibody production by *Ascaris suum* extract: characterization of suppressive component(s). Braz J Med Biol Res. 1988; 21(3):527-9.

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 Med Biol Res. 1990; 23(6-7):589-92.

Soares MF, Mota I, Macedo MS. Suppression of the IgE antibody response by *Ascaris suum* components: effect of X-irradiation. Braz J Med Biol Res. 1991; 24(6):587-90.

Soares MF, Mota I, Macedo MS. Isolation of *Ascaris suum* components which suppress IgE antibody responses. Int Arch Allergy Immunol. 1992; 97(1):37-43.

Souza VM, Faquim-Mauro EL, Macedo MS. Extracts of Ascaris suum egg and adult worm share similar immunosuppressive properties. Braz J Med Biol Res. 2002; 35(1):81-9.

Souza VM, Jacysyn JF, Macedo MS. IL-4 and IL-10 are essential for immunosuppression induced by high molecular weight proteins from Ascaris suum. Cytokine. 2004; 28(2):92-100.

Souza VM, Macedo MS. Boosting the suppressive effects of Ascaris suum components in IFN-gamma-deficient mice. Rev Soc Bras Med Trop. 2009; 42(3):345-7.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. BMJ. 1989; 299(6710):1259-60.

Tiegs G, Lohse AW. Immune tolerance: what is unique about the liver. J Autoimmu. 2010; 34(1):1-6.

Tiegs G, Hentschel J, Wendel A. A T Cell-dependent Experimental Liver Injury in Mice Inducible by Concanavalin A. J Clin Invest. 1992; 90(1):196-203

Urban JF Jr, Steenhard NR, Solano-Aguilar GI, Dawson HD, Iweala OI, Nagler CR, et al. Infection with parasitic nematodes confounds vaccination efficacy. Vet Parasitol. 2007; 148(1):14-20.

Walsh KP, Brady MT, Finlay CM, Boon L, Mills KH. Infection with a helminth parasite attenuates autoim-munity through TGF-β-mediated suppression of Th17 and Th1 responses. J Immunol. 2009; 183(3):1577-86.

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. 2009; 132(3):412-419.

Yamashita J, Iwamura C, Sasaki T, Mitsumori K, Ohshima K, Hada K, Hara N, Takahashi M, Kaneshiro Y, Tanaka H, Kaneko K, Nakayama T. Apolipoprotein A-II suppressed concanavalin A-induced hepatitis via the inhibition of CD4 T cell function. *J Immunol* 2011; 186: 3410-3420

Yazdanbakhsh M, Kremsner PG, van Ree R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. Science. 2002; 296(5567):490-4.

9. ANEXOS

ANEXO I

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, 30 de junho de 2010.

Ofício nº 289/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª: Valdênia Maria Oliveira de Souza**
Departamento Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 027221/2010-27

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, ***"ESTUDO DA AÇÃO IMUNORREGULATÓRIA DO EXTRATO SOLÚVEL DE HELMINTO (Ascaris suum) SOBRE A HEPATITE AUTO-IMUNE 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.

Observação:
Origem dos animais: Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - UFPE; Animais: Camundongos, Linhagem: BALB/c, Sexo: machos; Peso: machos - 20-25g; Número de animais previsto no projeto: 150 (cento e cinqüenta).

Atenciosamente,

Profa. Maria Teresa Jansem
Presidente do CEEA
UFPE

ANEXO II

World Journal of Gastroenterology

Online Submissions: http://www.wjgnet.com/1007-9327office
wjg@wjgnet.com
www.wjgnet.com

World J Gastroenterol 2010 March 7; 16(9): I-IV
ISSN 1007-9327 (print)
© 2010 Baishideng. All rights reserved.

Instructions to authors

GENERAL INFORMATION

World Journal of Gastroenterology (*World J Gastroenterol*, *WJG*, print ISSN 1007-9327, DOI: 10.3748) is a weekly, open-access (OA), peer-reviewed journal supported by an editorial board of 1096 experts in gastroenterology and hepatology from 60 countries.

The biggest advantage of the OA model is that it provides free, full-text articles in PDF and other formats for experts and the public without registration, which eliminates the obstacle that traditional journals possess and usually delays the speed of the propagation and communication of scientific research results. The open access model has been proven to be a true approach that may achieve the ultimate goal of the journals, i.e. the maximization of the value to the readers, authors and society.

The role of academic journals is to exhibit the scientific levels of a country, a university, a center, a department, and even a scientist, and build an important bridge for communication between scientists and the public. As we all know, the significance of the publication of scientific articles lies not only in disseminating and communicating innovative scientific achievements and academic views, as well as promoting the application of scientific achievements, but also in formally recognizing the "priority" and "copyright" of innovative achievements published, as well as evaluating research performance and academic levels. So, to realize these desired attributes of *WJG* and create a well-recognized journal, the following four types of personal benefits should be maximized. The maximization of personal benefits refers to the pursuit of the maximum personal benefits in a well-considered optimal manner without violation of the laws, ethical rules and the benefits of others. (1) Maximization of the benefits of editorial board members: The primary task of editorial board members is to give a peer review of an unpublished scientific article via online office system to evaluate its innovativeness, scientific and practical values and determine whether it should be published or not. During peer review, editorial board members can also obtain cutting-edge information in that field at first hand. As leaders in their field, they have priority to be invited to write articles and publish commentary articles. We will put peer reviewers' names and affiliations along with the article they reviewed in the journal to acknowledge their contribution; (2) Maximization of the benefits of authors: Since *WJG* is an open-access journal, readers around the world can immediately download and read, free of charge, high-quality, peer-reviewed articles from *WJG* official website, thereby realizing the goals and significance of the communication between authors and peers as well as public reading; (3) Maximization of the benefits of readers: Readers can read or use, free of charge, high-quality peer-reviewed articles without any limits, and cite the arguments, viewpoints, concepts, theories, methods, results, conclusion or facts and data of pertinent literature so as to validate the innovativeness, scientific and practical values of their own research achievements, thus ensuring that their articles have novel arguments or viewpoints, solid evidence and correct conclusion; and (4) Maximization of the benefits of employees: It is an iron law that a first-class journal is unable to exist without first-class editors, and only first-class editors can create a first-class academic journal. We insist on strengthening our team cultivation and construction so that every employee, in an open, fair and transparent environment, could contribute their wisdom to edit and publish high-quality articles, thereby realizing the maximization of the personal benefits of editorial board members, authors and readers, and yielding the greatest social and economic benefits.

The major task of *WJG* is to report rapidly the most recent results in basic and clinical research on esophageal, gastrointestinal, liver, pancreas and biliary tract diseases, *Helicobacter pylori*, endoscopy and gastrointestinal surgery, including: gastroesophageal reflux disease, gastrointestinal bleeding, infection and tumors; gastric and duodenal disorders; intestinal inflammation, microflora and immunity; celiac disease, dyspepsia and nutrition; viral hepatitis, portal hypertension, liver fibrosis, liver cirrhosis, liver transplantation, and metabolic liver disease; molecular and cell biology; geriatric and pediatric gastroenterology; diagnosis and screening, imaging and advanced technology.

The columns in the issues of *WJG* will include: (1) Editorial: To introduce and comment on the substantial advance and its importance in the fast-developing areas; (2) Frontier: To review the most representative achievements and comment on the current research status in the important fields, and propose directions for the future research; (3) Topic Highlight: This column consists of three formats, including (A) 10 invited review articles on a hot topic, (B) a commentary on common issues of this hot topic, and (C) a commentary on the 10 individual articles; (4) Observation: To update the development of old and new questions, highlight unsolved problems, and provide strategies on how to solve the questions; (5) Guidelines for Basic Research: To provide Guidelines for basic research; (6) Guidelines for Clinical Practice: To provide guidelines for clinical diagnosis and treatment; (7) Review: To systemically review the most representative progress and unsolved problems in the major scientific disciplines, comment on the current research status, and make suggestions on the future work; (8) Original Article: To originally report the innovative and valuable findings in gastroenterology and hepatology; (9) Brief Article: To briefly report the novel and innovative findings in gastroenterology and hepatology; (10) Case Report: To report a rare or typical case; (11) Letters to the Editor: To discuss and make reply to the contributions published in *WJG*, or to introduce and comment on a controversial issue of general interest; (12) Book Reviews: To introduce and comment on quality monographs of gastroenterology and hepatology; and (13) Guidelines: To introduce Consensuses and Guidelines reached by international and national academic authorities worldwide on basic research and clinical practice gastroenterology and hepatology.

CSSN
ISSN 1007-9327 (print)
CN 14-1219/R

Indexed and Abstracted in
Current Contents®/Clinical Medicine, Science Citation Index Expanded (also known as SciSearch®), Journal Citation Reports®, Index Medicus, MEDLINE, PubMed, PubMed Central, Digital Object Identifer, and EMBASE/Excerpta Medica. ISI, Thomson Reuters, 2008 Impact Factor: 2.081 (32/55 Gastroenterology and Hepatology).

Published by
Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Ltd.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be typed in 1.5 line spacing and 12 pt. Book Antiqua with ample margins. Number all pages consecutively, and start each of the following sections on a new page: Title Page,

Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, References, Tables, Figures, and Figure Legends. Neither the editors nor the publisher are responsible for the opinions expressed by contributors. Manuscripts formally accepted for publication become the permanent property of Beijing Baishideng BioMed Scientific Co., Ltd, and may not be reproduced by any means, in whole or in part, without the written permission of both the authors and the publisher. We reserve the right to copy-edit and put onto our website accepted manuscripts. Authors should follow the relevant guidelines for the care and use of laboratory animals of their institution or national animal welfare committee. For the sake of transparency in regard to the performance and reporting of clinical trials, we endorse the policy of the International Committee of Medical Journal Editors to refuse to publish papers on clinical trial results if the trial was not recorded in a publicly-accessible registry at its outset. The only register now available, to our knowledge, is http://www. clinicaltrials.gov sponsored by the United States National Library of Medicine and we encourage all potential contributors to register with it. However, in the case that other registers become available you will be duly notified. A letter of recommendation from each author's organization should be provided with the contributed article to ensure the privacy and secrecy of research is protected.

Authors should retain one copy of the text, tables, photographs and illustrations because rejected manuscripts will not be returned to the author(s) and the editors will not be responsible for loss or damage to photographs and illustrations sustained during mailing.

Online submissions

Manuscripts should be submitted through the Online Submission System at: http://www.wjgnet.com/1007-9327office. Authors are highly recommended to consult the ONLINE INSTRUCTIONS TO AUTHORS (http://www.wjgnet.com/1007-9327/Instructions-toAuthprs.asp) before attempting to submit online. For assistance, authors encountering problems with the Online Submission System may send an email describing the problem to wjg@wjgnet.com, or by telephone: +86-10-5908-0039. If you submit your manuscript online, do not make a postal contribution. Repeated online submission for the same manuscript is strictly prohibited.

MANUSCRIPT PREPARATION

All contributions should be written in English. All articles must be submitted using word-processing software. All submissions must be typed in 1.5 line spacing and 12 pt. Book Antiqua with ample margins. Style should conform to our house format. Required information for each of the manuscript sections is as follows:

Title page

Title: Title should be less than 12 words.

Running title: A short running title of less than 6 words should be provided.

Authorship: Authorship credit should be in accordance with the standard proposed by International Committee of Medical Journal Editors, based on (1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and (3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2, and 3.

Institution: Author names should be given first, then the complete name of institution, city, province and postcode. For example, Xu-Chen Zhang, Li-Xin Mei, Department of Pathology, Chengde Medical College, Chengde 067000, Hebei Province, China. One author may be represented from two institutions, for example, George Sgourakis, Department of General, Visceral, and Transplantation Surgery, Essen 45122, Germany; George Sgourakis, 2nd Surgical Department, Korgialenio-Benakio Red Cross Hospital, Athens 15451, Greece

Author contributions: The format of this section should be: Author contributions: Wang CL and Liang L contributed equally to this work; Wang CL, Liang L, Fu JF, Zou CC, Hong F and Wu XM designed the research; Wang CL, Zou CC, Hong F and Wu XM performed the research; Xue JZ and Lu JR contributed new reagents/analytic tools; Wang CL, Liang L and Fu JF analyzed the data; and Wang CL, Liang L and Fu JF wrote the paper.

Supportive foundations: The complete name and number of supportive foundations should be provided, e.g., Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30224801

Correspondence to: Only one corresponding address should be provided. Author names should be given first, then author title, affiliation, the complete name of institution, city, postcode, province, country, and email. All the letters in the email should be in lower case. A space interval should be inserted between country name and email address. For example, Montgomery Bissell, MD, Professor of Medicine, Chief, Liver Center, Gastroenterology Division, University of California, Box 0538, San Francisco, CA 94143, United States. montgomery.bissell@ucsf.edu

Telephone and fax: Telephone and fax should consist of +, country number, district number and telephone or fax number, e.g., Telephone: +86-10-59080039 Fax: +86-10-85381893

Peer reviewers: All articles received are subject to peer review. Normally, three experts are invited for each article. Decision for acceptance is made only when at least two experts recommend an article for publication. Reviewers for accepted manuscripts are acknowledged in each manuscript, and reviewers of articles which were not accepted will be acknowledged at the end of each issue. To ensure the quality of the articles published in *WJG*, reviewers of accepted manuscripts will be announced by publishing the name, title/position and institution of the reviewer in the footnote accompanying the printed article. For example, reviewers: Professor Jing-Yuan Fang, Shanghai Institute of Digestive Disease, Shanghai, Affiliated Renji Hospital, Medical Faculty, Shanghai Jiaotong University, Shanghai, China; Professor Xin-Wei Han, Department of Radiology, The First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, China; and Professor Anren Kuang, Department of Nuclear Medicine, Huaxi Hospital, Sichuan University, Chengdu, Sichuan Province, China.

Abstract

There are unstructured abstracts (no more than 256 words) and structured abstracts (no more than 480). The specific requirements for structured abstracts are as follows:

An informative, structured abstracts of no more than 480 words should accompany each manuscript. Abstracts for original contributions should be structured into the following sections. AIM (no more than 20 words): Only the purpose should be included. Please write the aim as the form of "To investigate/study/…; MATERIALS AND METHODS (no more than 140 words); RESULTS (no more than 294 words): You should present *P* values where appropriate and must provide relevant data to illustrate how they were obtained, e.g. 6.92 ± 3.86 *vs* 3.61 ± 1.67, $P < 0.001$; CONCLUSION (no more than 26 words). Available from: http://www.wjgnet.com/wjg/help/8.doc; Writing requirements of abstract at: http://www.wjgnet.com/1007-9327/links/Abstract.doc.

Key words

Please list 5-10 key words, selected mainly from *Index Medicus*, which reflect the content of the study.

Text

For articles of these sections, original articles, rapid communication and case reports, the main text should be structured into the following sections: INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS and DISCUSSION, and should include appropriate Figures and Tables. Data should be presented in the

main text or in Figures and Tables, but not in both. The main text format of these sections, editorial, topic highlight, case report, letters to the editors, can be found at: http://www.wjgnet.com/wjg/help/instructions.jsp.

Illustrations

Figures should be numbered as 1, 2, 3, *etc.*, and mentioned clearly in the main text. Provide a brief title for each figure on a separate page. Detailed legends should not be provided under the figures. This part should be added into the text where the figures are applicable. Figures should be either Photoshop or Illustrator files (in tiff, eps, jpeg formats) at high-resolution. Examples can be found at: http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4520.pdf; http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4554.pdf; http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4891.pdf; http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4986.pdf; http://www.wjgnet.com/1007-9327/13/4498.pdf. Keeping all elements compiled is necessary in line-art image. Scale bars should be used rather than magnification factors, with the length of the bar defined in the legend rather than on the bar itself. File names should identify the figure and panel. Avoid layering type directly over shaded or textured areas. Please use uniform legends for the same subjects. For example: Figure 1 Pathological changes in atrophic gastritis after treatment. A:...; B:...; C:...; D:...; E:...; F:...; G: …*etc.* It is our principle to publish high resolution-figures for the printed and E-versions.

Tables

Three-line tables should be numbered 1, 2, 3, *etc.*, and mentioned clearly in the main text. Provide a brief title for each table. Detailed legends should not be included under tables, but rather added into the text where applicable. The information should complement, but not duplicate the text. Use one horizontal line under the title, a second under column heads, and a third below the Table, above any footnotes. Vertical and italic lines should be omitted.

Notes in tables and illustrations

Data that are not statistically significant should not be noted. $^{a}P < 0.05$, $^{b}P < 0.01$ should be noted ($P > 0.05$ should not be noted). If there are other series of P values, $^{c}P < 0.05$ and $^{d}P < 0.01$ are used. A third series of P values can be expressed as $^{e}P < 0.05$ and $^{f}P < 0.01$. Other notes in tables or under illustrations should be expressed as ^{1}F, ^{2}F, ^{3}F; or sometimes as other symbols with a superscript (Arabic numerals) in the upper left corner. In a multi-curve illustration, each curve should be labeled with ●, ○, ■, □, ▲, △, *etc.*, in a certain sequence.

Acknowledgments

Brief acknowledgments of persons who have made genuine contributions to the manuscript and who endorse the data and conclusions should be included. Authors are responsible for obtaining written permission to use any copyrighted text and/or illustrations.

REFERENCES

Coding system

The author should number the references in Arabic numerals according to the citation order in the text. Put reference numbers in square brackets in superscript at the end of citation content or after the cited author's name. For citation content which is part of the narration, the coding number and square brackets should be typeset normally. For example, "Crohn's disease (CD) is associated with increased intestinal permeability[1,2]". If references are cited directly in the text, they should be put together within the text, for example, "From references[19,22-24], we know that..."

When the authors write the references, please ensure that the order in text is the same as in the references section, and also ensure the spelling accuracy of the first author's name. Do not list the same citation twice.

PMID and DOI

Pleased provide PubMed citation numbers to the reference list, e.g. PMID and DOI, which can be found at http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed and http://www.crossref.org/SimpleTextQuery/, respectively. The numbers will be used in E-version of this journal.

Style for journal references

Authors: the name of the first author should be typed in bold-faced letters. The family name of all authors should be typed with the initial letter capitalized, followed by their abbreviated first and middle initials. (For example, Lian-Sheng Ma is abbreviated as Ma LS, Bo-Rong Pan as Pan BR). The title of the cited article and italicized journal title (journal title should be in its abbreviated form as shown in PubMed), publication date, volume number (in black), start page, and end page [PMID: 11819634 DOI: 10.3748/wjg.13.5396].

Style for book references

Authors: the name of the first author should be typed in bold-faced letters. The surname of all authors should be typed with the initial letter capitalized, followed by their abbreviated middle and first initials. (For example, Lian-Sheng Ma is abbreviated as Ma LS, Bo-Rong Pan as Pan BR) Book title. Publication number. Publication place: Publication press, Year: start page and end page.

Format

Journals

English journal article (list all authors and include the PMID where applicable)

1 **Jung EM**, Clevert DA, Schreyer AG, Schmitt S, Rennert J, Kubale R, Feuerbach S, Jung F. Evaluation of quantitative contrast harmonic imaging to assess malignancy of liver tumors: A prospective controlled two-center study. *World J Gastroenterol* 2007; **13**: 6356-6364 [PMID: 18081224 DOI: 10.3748/wjg.13.6356]

Chinese journal article (list all authors and include the PMID where applicable)

2 **Lin GZ**, Wang XZ, Wang P, Lin J, Yang FD. Immunologic effect of Jianpi Yishen decoction in treatment of Pixu-diarrhoea. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 1999; **7**: 285-287

In press

3 **Tian D**, Araki H, Stahl E, Bergelson J, Kreitman M. Signature of balancing selection in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; In press

Organization as author

4 **Diabetes Prevention Program Research Group**. Hypertension, insulin, and proinsulin in participants with impaired glucose tolerance. *Hypertension* 2002; **40**: 679-686 [PMID: 12411462 PMCID:2516377 DOI:10.1161/01.HYP.0000035706.28494.09]

Both personal authors and an organization as author

5 **Vallancien G**, Emberton M, Harving N, van Moorselaar RJ; Alf-One Study Group. Sexual dysfunction in 1, 274 European men suffering from lower urinary tract symptoms. *J Urol* 2003; **169**: 2257-2261 [PMID: 12771764 DOI:10.1097/01.ju.0000067940.76090.73]

No author given

6 21st century heart solution may have a sting in the tail. *BMJ* 2002; **325**: 184 [PMID: 12142303 DOI:10.1136/bmj.325.7357.184]

Volume with supplement

7 **Geraud G**, Spierings EL, Keywood C. Tolerability and safety of frovatriptan with short- and long-term use for treatment of migraine and in comparison with sumatriptan. *Headache* 2002; **42** Suppl 2: S93-99 [PMID: 12028325 DOI:10.1046/j.1526-4610.42.s2.7.x]

Issue with no volume

8 **Banit DM**, Kaufer H, Hartford JM. Intraoperative frozen section analysis in revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* 2002; (**401**): 230-238 [PMID: 12151900 DOI:10.1097/00003086-200208000-00026]

No volume or issue

9 Outreach: Bringing HIV-positive individuals into care. *HRSA Careaction* 2002; 1-6 [PMID: 12154804]

Books

Personal author(s)

10 **Sherlock S**, Dooley J. Diseases of the liver and billiary system. 9th ed. Oxford: Blackwell Sci Pub, 1993: 258-296

Chapter in a book (list all authors)

11 **Lam SK**. Academic investigator's perspectives of medical treatment for peptic ulcer. In: Swabb EA, Azabo S. Ulcer disease: investigation and basis for therapy. New York: Marcel Dekker, 1991: 431-450

Author(s) and editor(s)

12 **Breedlove GK**, Schorfheide AM. Adolescent pregnancy. 2nd ed. Wieczorek RR, editor. White Plains (NY): March of Dimes Education Services, 2001: 20-34

Conference proceedings

13 **Harnden P**, Joffe JK, Jones WG, editors. Germ cell tumours V. Proceedings of the 5th Germ cell tumours Conference; 2001 Sep 13-15; Leeds, UK. New York: Springer, 2002: 30-56

Conference paper

14 **Christensen S**, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editors. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer, 2002: 182-191

Electronic journal (list all authors)

15 Morse SS. Factors in the emergence of infectious diseases. Emerg Infect Dis serial online, 1995-01-03, cited 1996-06-05; 1(1): 24 screens. Available from: URL: http//www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm

Patent (list all authors)

16 **Pagedas AC**, inventor; Ancel Surgical R&D Inc., assignee. Flexible endoscopic grasping and cutting device and positioning tool assembly. United States patent US 20020103498. 2002 Aug 1

Statistical data

Write as mean ± SD or mean ± SE.

Statistical expression

Express *t* test as *t* (in italics), *F* test as *F* (in italics), chi square test as χ^2 (in Greek), related coefficient as *r* (in italics), degree of freedom as υ (in Greek), sample number as *n* (in italics), and probability as *P* (in italics).

Units

Use SI units. For example: body mass, m (B) = 78 kg; blood pressure, p (B) = 16.2/12.3 kPa; incubation time, t (incubation) = 96 h, blood glucose concentration, c (glucose) 6.4 ± 2.1 mmol/L; blood CEA mass concentration, p (CEA) = 8.6 24.5 μg/L; CO_2 volume fraction, 50 mL/L CO_2, not 5% CO_2; likewise for 40 g/L formaldehyde, not 10% formalin; and mass fraction, 8 ng/g, *etc.* Arabic numerals such as 23, 243, 641 should be read 23 243 641.

The format for how to accurately write common units and quantums can be found at: http://www.wjgnet.com/wjg/help/15.doc.

Abbreviations

Standard abbreviations should be defined in the abstract and on first mention in the text. In general, terms should not be abbreviated unless they are used repeatedly and the abbreviation is helpful to the reader. Permissible abbreviations are listed in Units, Symbols and Abbreviations: A Guide for Biological and Medical Editors and Authors (Ed. Baron DN, 1988) published by The Royal Society of Medicine, London. Certain commonly used abbreviations, such as DNA, RNA, HIV, LD50, PCR, HBV, ECG, WBC, RBC, CT, ESR, CSF, IgG, ELISA, PBS, ATP, EDTA, mAb, can be used directly without further explanation.

Italics

Quantities: *t* time or temperature, *c* concentration, *A* area, *l* length, *m* mass, *V* volume.

Genotypes: *gyrA*, *arg* 1, *c myc*, *c fos*, *etc.*

Restriction enzymes: *EcoRI*, *Hin*dI, *Bam*HI, *Kbo* I, *Kpn* I, *etc.*

Biology: *H. pylori*, *E coli*, *etc.*

RESUBMISSION OF THE REVISED MANUSCRIPTS

Please revise your article according to the revision policies of *WJG*. The revised version includes manuscript and high-resolution image figures. The author should re-submit the revised manuscript online, along with printed high-resolution color or black and white photos; Copyright transfer letter, and responses to the reviewers, and science news are sent to us *via* email.

Editorial Office

World Journal of Gastroenterology
Editorial Department: Room 903, Building D,
Ocean International Center,
No. 62 Dongsihuan Zhonglu,
Chaoyang District, Beijing 100025, China
E-mail: wjg@wjgnet.com
http://www.wjgnet.com
Telephone: +86-10-5908-0039
Fax: +86-10-85381893

Language evaluation

The language of a manuscript will be graded before it is sent for revision. (1) Grade A: priority publishing; (2) Grade B: minor language polishing; (3) Grade C: a great deal of language polishing needed; and (4) Grade D: rejected. Revised articles should reach Grade A or B.

Copyright assignment form

Please download a Copyright assignment form from http://www.wjgnet.com/1007-9327/news/10.doc.

Responses to reviewers

Please revise your article according to the comments/suggestions provided by the reviewers. The format for responses to the reviewers' comments can be found at: http://www.wjgnet.com/1007-9327/news/12.doc.

Proof of financial support

For paper supported by a foundation, authors should provide a copy of the document and serial number of the foundation.

Science news releases

Authors of accepted manuscripts are suggested to write a science news item to promote their articles. The news will be released rapidly at EurekAlert/AAAS (http://www.eurekalert.org). The title for news items should be less than 90 characters; the summary should be less than 75 words; and main body less than 500 words. Science news items should be lawful, ethical, and strictly based on your original content with an attractive title and interesting pictures.

Publication fee

Authors of accepted articles must pay a publication fee.
EDITORIAL, TOPIC HIGHLIGHTS, BOOK REVIEWS and LETTERS TO THE EDITOR are published free of charge.